



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

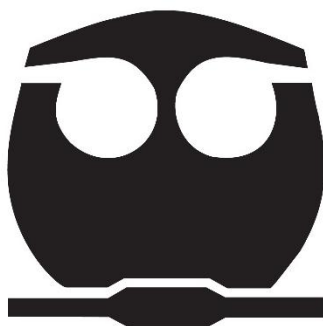
**“Análisis computacional de la estabilidad, flexibilidad
y conectividad de la familia de proteínas
periplásmicas de unión a aminoácidos básicos”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

TANIA RAQUEL BERROCAL GAMA



México, D.F. 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: J. ELEAZAR MARTINEZ BARAJAS

VOCAL: Profesor: MIREYA RODRIGUEZ PENAGOS

SECRETARIO: Profesor: ALEJANDRO SOSA PEINADO

1er. SUPLENTE: Profesor: VANESSA REBECA MAYA AMPUDIA

2° SUPLENTE: Profesor: PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMENEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE FISICOQUÍMICA E INGENIERÍA DE PROTEÍNAS, TORRE DE INVESTIGACIÓN,
FACULTAD DE MEDICINA.**

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA:

ALEJANDRO SOSA PEINADO

SUSTENTANTE:

TANIA RAQUEL BERROCAL GAMA

Índice

| | |
|--|----|
| Abreviaturas..... | 4 |
| Resumen..... | 5 |
| Introducción..... | 6 |
| <i>Estructura primaria</i> | 7 |
| <i>Estructura secundaria</i> | 9 |
| <i>Estructura terciaria y cuaternaria</i> | 10 |
| <i>La importancia de la relación estructura-función</i> | 12 |
| <i>Proteínas periplásmicas de unión: modelos de estudio de los cambios de flexibilidad en función de su unión a ligandos</i> | 13 |
| Hipótesis..... | 24 |
| Objetivos generales..... | 24 |
| Objetivos particulares..... | 24 |
| Metodología..... | 25 |
| <i>Obtención y mejora de la estructura cristalográfica de la proteína LAO/ArtJ con y sin ligando</i> | 25 |
| <i>Análisis de la rigidez/flexibilidad de la proteína LAO y ArtJ con y sin ligando</i> | 27 |
| Resultados..... | 29 |
| <i>La proteína LAO sin ligando</i> | 29 |
| <i>La proteína LAO con arginina</i> | 34 |
| <i>La proteína ArtJ con arginina</i> | 46 |
| <i>La proteína Art J con histidina</i> | 52 |
| <i>Cambios de rigidez/flexibilidad: LAO sin ligando vs LAO con ligando</i> | 58 |
| Discusión..... | 63 |
| Conclusiones..... | 68 |
| Bibliografía..... | 68 |

Abreviaturas.

LAO: Proteína de unión a L-Lisina, L-Ornitina y L-Arginina.

PBP: Proteína Periplásmica de Unión (Periplasmic Binding Protein).

PDB: Banco de Datos de Proteínas (Protein Data Bank).

CNA: Análisis de Restricciones de Red (Constraint Network Analysis).

P_i : Índice de percolación.

R_i : Índice de rigidez.

H: Entropía.

T_m : Temperatura media de desnaturalización.

P: Rigidez.

Arg= arginina

His= histidina

CPG= Clúster Gigante de Percolación.

E_{hb} = Energía del puente de hidrógeno.

$E_{cut, hb}$ = Energía de corte del puente de hidrógeno.

MD= Dinámica Molecular (de sus siglas en inglés Molecular Dynamics).

RMN= Resonancia Magnética Nuclear.

Resumen.

El problema del plegamiento de proteínas ha sido abordado desde hace 50 años y hasta nuestros días, sin embargo, aún no podemos explicar cómo es que las proteínas adquieren su estructura nativa a partir de su secuencia de aminoácidos.

Las proteínas periplásmicas de unión (PBP) son una familia cuyas características estructurales y fisicoquímicas han permitido estudiar el plegamiento. Previamente, en nuestro laboratorio, se realizaron estudios termodinámicos y cinéticos de la proteína de unión a lisina, arginina y ornitina (LAO), la cual está formada por 238 amino ácidos divididos en dos dominios (lóbulo A o discontinuo y lóbulo B o continuo), cada uno formado por 5 hebras β rodeadas por 4 hélices α .

En este trabajo hemos abordado la pregunta del plegamiento utilizando herramientas computacionales y las estructuras cristalográficas de la proteína periplásmica de unión LAO con y sin ligando, así como de su homóloga termófila Art J, con la finalidad de conocer la dinámica con la que ocurre su desplegamiento mediante simulaciones de desnaturalización térmica. Para ello utilizamos el servidor web CNA (Constratint Network Analysis) cuyos algoritmos permiten realizar la simulación de desnaturalización térmica a partir la estructura cristalográfica dada, asignando valores de energía a cada residuo y señalando mediante una gama de colores que tan rígida o flexible es cada región de la proteína. Una vez asignados los colores a la estructura podemos tener una secuencia de qué regiones pierden su estructura secundaria primero y cuáles después.

De manera general pudimos concluir que existe preferencia para iniciar la desnaturalización por el lóbulo discontinuo para la proteína LAO con y sin ligando, además, las hojas β requieren menor energía para perder su estructura que las α -hélices. Regiones importantes para la función de LAO, como son la zona de bisagra y el sitio de unión, sufren cambios específicos de flexibilidad al cambiar de conformación. El sitio de unión se vuelve más rígido en presencia de los ligandos y los valores de energía para estos residuos son valores intermedios. En lo que respecta a Art J, no existe un patrón detallado de rigidez/flexibilidad en comparación a LAO, que permita inferir las bases que determinan la termoestabilidad.

Introducción.

Las proteínas son las macromoléculas más abundantes y versátiles, en los seres vivos realizan diversas funciones desde el reconocimiento molecular hasta la catálisis. Existen diversas clases, desde péptidos pequeños hasta polímeros de gran tamaño. La información requerida para que cada una de las proteínas adquiera su estructura, está contenida en la secuencia de los 20 aminoácidos que las conforman, los cuales se unen covalentemente para formar un polipéptido unido por enlaces covalentes (enlace peptídico) entre cada amino ácido. Cada amino ácido contiene una cadena lateral con propiedades químicas específicas. De esta manera se genera una secuencia específica de aminoácidos, y de alguna manera la información contenida en esta secuencia determina la estructura proteica y su función. Resulta sorprendente como es que estos mismos 20 amino ácidos son los que le dan estructura a las miles de proteínas existentes, desde enzimas, hormonas, anticuerpos, pasando por fibras musculares, pelo, venenos, antibióticos, etc. (Creighton, 1997).

Existen varios niveles estructurales en las proteínas, la estructura primaria consiste en la secuencia de aminoácidos que forman la proteína (Figura 1a), la estructura secundaria se refiere a patrones estructurales que son estables y se repiten (dando lugar a α -hélices y hojas β plegadas, Figura 1b), la estructura terciaria describe los aspectos del plegamiento tridimensional (Figura 1c), por último, cuando una proteína tiene dos o más subunidades polipeptídicas su acomodo en el espacio se denomina estructura cuaternaria (Figura 1d). (Creighton, 1997).

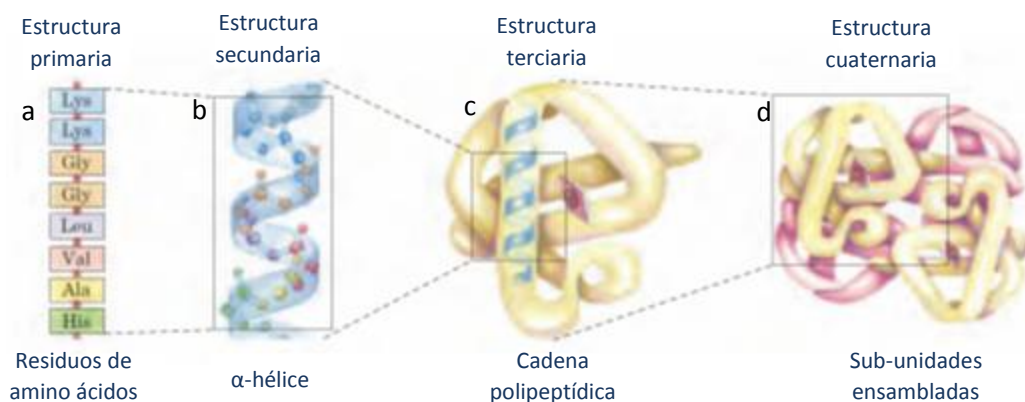


Figura 1. Las cuatro estructuras que puede adoptar una proteína. (a) Estructura primaria, (b) estructura secundaria, (c) estructura terciaria, (d) estructura cuaternaria. (Nelson, D et al, 2008).

Estructura primaria

- **Los aminoácidos.**

Las proteínas son polímeros de aminoácidos que se unen a través de un tipo específico de enlace covalente llamado enlace peptídico. De los 20 aminoácidos, sólo 19 tienen una estructura general y sólo difieren en la estructura de las cadenas laterales **R**. El aminoácido restante, la prolina, es diferente debido a que tiene la cadena lateral unida al nitrógeno, produciendo un iminoácido (Figura 3). (Creighton, 1997).

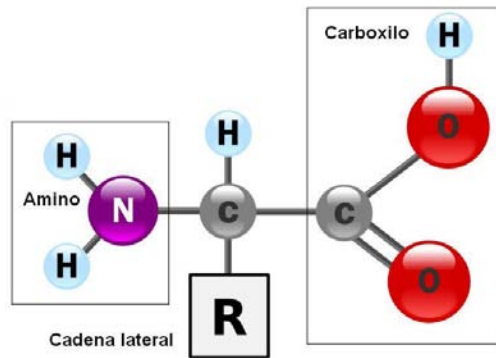


Figura 3. Enlace peptídico.

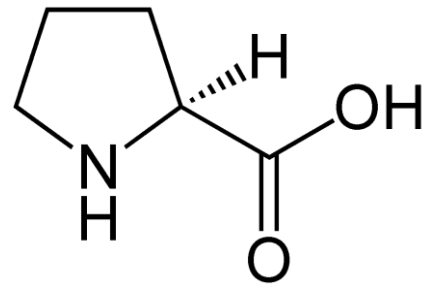


Figura 2. La prolina, nótese como el nitrógeno del extremo amino se cicliza con la cadena lateral.

A excepción de la glicina, cuya cadena lateral es un hidrógeno, los demás aminoácidos tienen un carbono central asimétrico que se encuentran en la conformación L en la naturaleza. (Creighton, 1997).

Los 20 aminoácidos se unen para formar a las proteínas mediante el enlace peptídico (Figura 2), el cual se forma por deshidratación del grupo α -carboxilo de un aminoácido y el grupo α -amino del otro (Figura 4). Cuando se unen algunos aminoácidos la estructura resultante es un oligopéptido. Al unirse muchos aminoácidos el producto se denomina polipéptido (Figura 5). (Creighton, 1997).

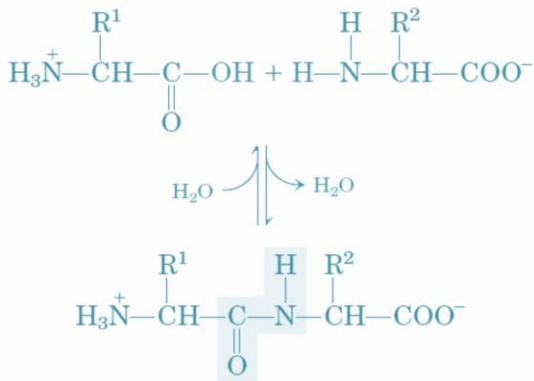


Figura 4. Formación del enlace peptídico entre dos aminoácidos. Nótese la pérdida de agua durante el proceso. (Nelson, D., 2008).

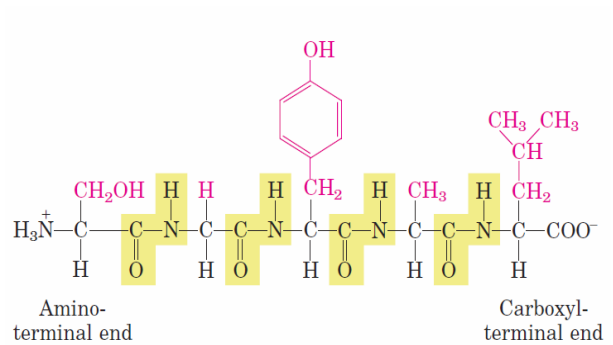


Figura 5. El enlace peptídico en una cadena de varios aminoácidos. (Nelson, D., 2008).

El esqueleto de un polipéptido lineal se conforma de una secuencia repetida de aminoácidos: el enlace se da entre el nitrógeno del grupo amino, el C^α y el carbono del grupo carboxilo. Estos átomos se representan generalmente como N_i, C_i^α Y C_i['], donde i es el número del residuo comenzando por el amino terminal de la cadena.

Inicialmente, la rotación podría ocurrir en cualquiera de los tres enlaces de cada residuo en el esqueleto de la cadena polipeptídica, sin embargo, el enlace peptídico tiene carácter de doble enlace debido a la resonancia que presenta. De esta manera, el enlace peptídico es 1.33 Å más corto que el enlace usual C-N, cuya distancia es de 1.45 Å, igual que el enlace C^α-N. De cualquier manera, es más largo que el enlace C=N, cuyo valor promedio es de 1.25 Å. Por lo tanto, el enlace peptídico resulta tener carácter de doble enlace y su rotación está restringida, tendiendo a ser coplanar. Existen dos configuraciones posibles para el enlace peptídico, una donde los átomos del C^α están en *trans* y otra donde están en *cis*. La forma *trans* esta favorecida energéticamente, probablemente debido a que existe menor repulsión entre átomos que no están unidos covalentemente entre sí. Sin embargo, si el residuo contiguo es una prolina, su cadena cíclica disminuye la repulsión entre los átomos y la estabilidad intrínseca de la configuración *cis* es comparable con la del isómero *trans*. (Creighton, 1997).

Estructura secundaria.

Cuando se hace referencia a la estructura secundaria hablamos del acomodo local de algunas zonas de la proteína. Solo unas pocas estructuras secundarias son muy estables y están ampliamente distribuidas en las proteínas, las más notables son las hélices α y las hojas β .

- ***α -Hélice.***

La conformación más sencilla que puede asumir una cadena polipeptídica es una hélice α , cuyo esqueleto se encuentra enrollado y compacto alrededor de un eje longitudinal imaginario de la molécula y los grupos R de los residuos de los amino ácidos sobresalen del esqueleto helicoidal.

Entre cada giro existe una distancia de 5.4 Å e incluye 3.6 residuos aminoácidos. Existen varios tipos de hélices en las proteínas, sin embargo, la α -hélice dextrógira es la conformación más favorecida y por lo tanto, más frecuente (Figura 6).

- ***Hojas β .***

El segundo tipo de estructura repetitiva son las hojas β cuya cadena polipeptídica se acomoda en el espacio en *zigzag*, lo anterior permite que dichas cadenas se dispongan de manera adyacente formando una estructura que semeja pliegues. Los grupos R de los aminoácidos se acomodan de manera opuesta y esto les permite interactuar alternadamente. Las cadenas polipeptídicas pueden ser paralelas o antiparalelas, dependiendo de la orientación amino-carboxilo en el polipéptido (Figura 7).

Sucede que algunas estructuras proteicas limitan ciertos aminoácidos a hojas β , siendo aquello con grupos R relativamente pequeños los que predominan en esta estructura secundaria.

Además de patrones repetitivos en la estructura secundaria como lo son las α y β , existen estructuras no repetitivas como los bucles o giros que son elementos de conexión entre α -hélices y hojas β , los cuales provocan cambios en la dirección de la cadena polipeptídica y permiten que la proteína tenga una estructura compacta. Hay dos tipos principales, I y II

que se diferencian en los ángulos phi y psi de los residuos $i+1$ e $i+2$. En los giros abunda el aminoácido glicina.

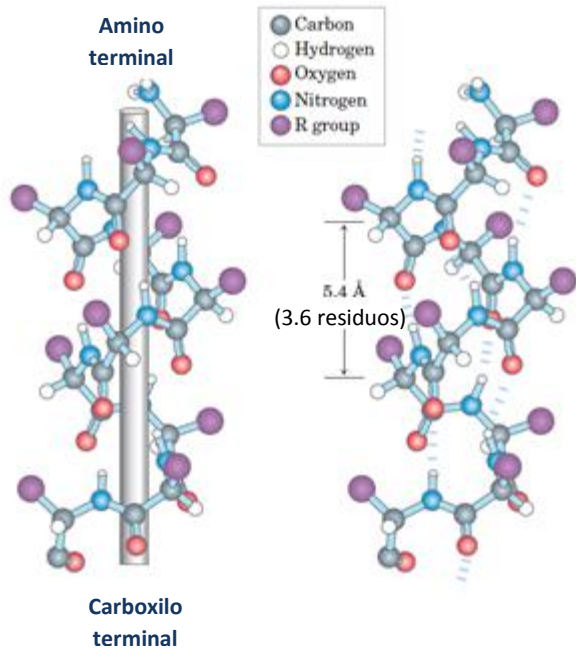


Figura 6. α -hélice dextrógira. Los enlaces peptídicos rígidos son paralelos al eje longitudinal (a). α hélice representada por bolas y varillas donde se muestran los enlaces de hidrogeno intracatenarios, así como la distancia entre los aminoácidos por vuelta (b) (Nelson, D., 2008).

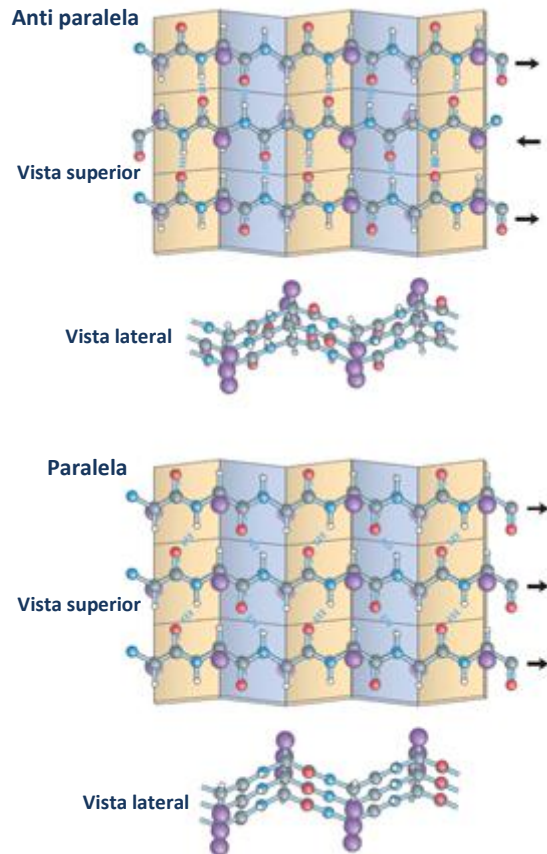


Figura 7. Vista superior y lateral de los puentes de hidrogeno entre cadenas adyacentes antiparalelas (a) y entre cadenas adyacentes paralelas (b) (Nelson, D., 2008).

Estructura terciaria y cuaternaria.

Cuando hablamos de estructura terciaria nos referimos a la disposición tridimensional global de todos los átomos que forman a una proteína. Incluso aquellos residuos que se encuentran en los extremos de la estructura proteica interactúan en la estructura plegada de la proteína. Ejemplos de estructura terciaria son el plegamiento barril α - β (Figura 8) y el tipo Rossmann (Figura 9).

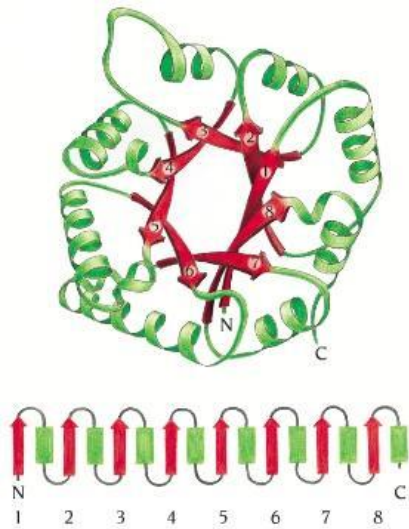


Figura 8. La proteína TIM es un ejemplo del plegamiento barril α - β . (Alberts 2007)

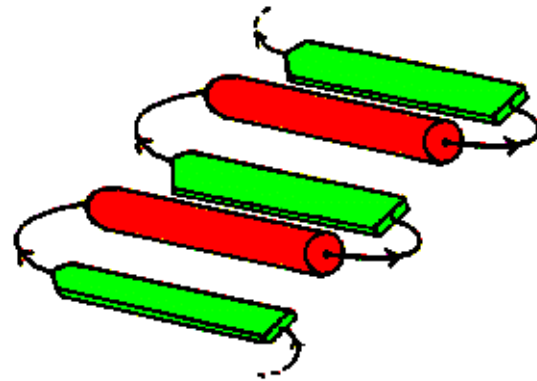


Figura 9. Patrón del plegamiento tipo Rossmann, la estructura está compuesta por tres o más hojas beta (color verde) paralelas unidas por dos hélices alfa (color rojo) en el orden topológico de beta-alfa-beta-alfa-beta. (Alberts, 2007)

Por otra parte, la estructura cuaternaria indica la disposición de las subunidades proteicas, las cuales pueden ser idénticas o diferentes. Los motivos son elementos conservados en la secuencia de los aminoácidos y que se relacionan con una función concreta. Un dominio se refiere a una región de la proteína con interés biológico, funcional o estructural cuya cadena polipeptídica se pliega de manera independiente.

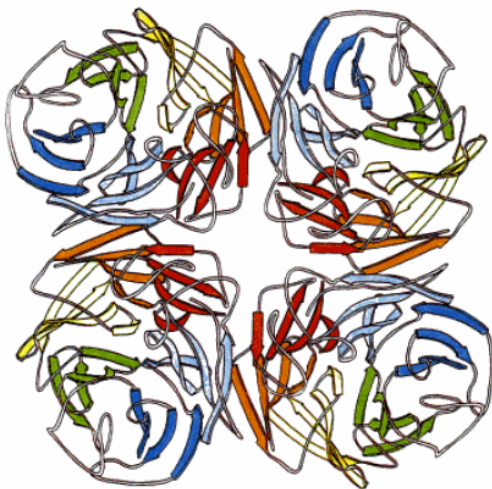


Figura 10. La neuroamidasa es un tetrámero simétrico. Presenta un anillo de cuatro cadenas polipeptídicas idénticas. (Alberts, 2007)

La importancia de la relación estructura-función.

Las proteínas llevan a cabo diversas funciones biológicas interactuando con otras biomacromoléculas o moléculas pequeñas que requieren cierto grado de adaptación conformacional. De esta manera, la flexibilidad estructural de las proteínas está ligada al reconocimiento molecular y a la catálisis. Además, la flexibilidad (y su opuesto, la rigidez) juegan un papel importante para la estabilidad de las proteínas. Por ejemplo, las proteínas termófilas son en general más rígidas que sus homólogas mesófilas para mantener su conformación a altas temperaturas. Por lo tanto, conocer aquellas regiones móviles en una proteína, o bien el balance entre regiones rígidas y flexibles es importante para poder relacionar la estructura con su función, así como el dilucidar las bases de la termoestabilidad. (Krüger, 2013).

Dado que la flexibilidad y la rigidez, son características importantes para la función y estabilidad, la heterogeneidad en la estructura proteica es un pre-requisito para el que dichas macromoléculas mantengan su estado nativo y funcionen adecuadamente. Por lo anterior, la distribución de las zonas rígidas y flexibles se sugiere que es altamente conservada entre proteínas homólogas.

Ser capaz de identificar los cambios de rigidez/flexibilidad en la estructura de una proteína debido a cambios en su ambiente (i.e. unión de ligando, temperatura o cambios en el solvente) resulta esencial para poder entender las bases que rigen la relación estructura-función. Desde un punto de vista práctico, tener acceso a este tipo de información nos permite buscar alternativas para optimizar las características estructurales y funcionales de las proteínas mediante métodos de ingeniería con fines biotecnológicos. (Krüger, 2013)

La flexibilidad y rigidez son características estáticas que denotan la posibilidad de movimiento pero no proporcionan información acerca de la dirección y magnitud del mismo. Es complicado determinar la flexibilidad de una biomolécula, es por eso que los métodos computacionales proporcionan herramientas complementarias para el análisis de la flexibilidad y rigidez de las biomoléculas. Por una parte, los métodos computacionales se utilizan para analizar unidades conformacionales determinadas por cristalografía o (RMN), o mediante dinámica molecular (MD). En este sentido, en el

laboratorio estamos interesados en modelos tanto experimentales como teóricos que nos permitan estudiar el problema de la flexibilidad/rigidez. (Krüger, 2013).

Proteínas periplásmicas de unión: modelos de estudio de los cambios de flexibilidad en función de su unión a ligandos.

Los sistemas de transporte periplásmico bacteriano presentan un mecanismo general de cambio conformacional asociado a la unión del ligando, lo que cambia sus interacciones no covalentes, y por lo tanto su flexibilidad local, por esta razón hemos tomado a este sistema como modelo de estudio. Estas proteínas, también llamadas permeasas, transportan moléculas como iones inorgánicos, aminoácidos, péptidos, azúcares, vitaminas, entre otros. Dichos sistemas están constituidos por una proteína periplásmica de unión (PBP) y un complejo de membrana, que a su vez está formado por dos proteínas integrales y una o varias proteínas de unión a nucleótido asociadas a la membrana. Una vez que la PBP está unida a su ligando, interactúa con el complejo de membrana, generando cambios conformacionales acoplados a la hidrólisis de ATP, los cuales permiten la translocación del sustrato, de tal manera que las dos funciones principales de las PBPs son las siguientes: la unión del sustrato y la asociación al complejo de membrana. Dichas funciones se ubican en diferentes zonas de la proteína.

Las PBP's comparten ciertas características, entre ellas: estructura bilobular, (los dos lóbulos están unidos por dos o tres segmentos polipeptídicos), sitio de unión al ligando, que se ubica entre los dos dominios, y que cada dominio se compone de una hoja β rodeada por hélices α . (Figura 11)

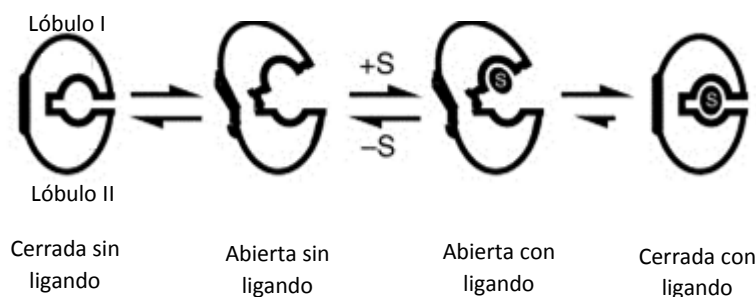


Figura 11. Estados conformacionales de una proteína periplásmica de unión (PBP). (Paas, Y., 1998).

Además, las PBPs unen su ligando con gran afinidad (del orden de nanomolar a micromolar) y se han caracterizado PBPs desde los 23 a los 52kDa. Una PBP sin ligando se encuentra en un estado conformacional abierto, mientras que cuando está unida a su ligando se encuentra en estado cerrado, es decir, los lóbulos se acercan “encerrando” al ligando. El movimiento de apertura y cierre ha sido comparado y descrito como un modelo de apertura y cierre basado en la caricatura “Pac-Man” (Oh, B. H, 1993).

Existen dos clasificaciones de PBPs basadas en su estructura, una de ellas depende del número y posición de las hojas β (Dwyer, 2004), y la otra se basa en la cantidad de segmentos polipeptídicos que unen los dominios (Shi, 2009). La primera clasificación se divide a su vez en dos categorías, la tipo I está formada por proteínas con seis hojas β , mientras que la tipo II contiene proteínas con solo cinco hojas β en el mismo orden que la tipo I. La segunda clasificación está formada por tres grupos: el grupo I contiene proteínas con tres segmentos polipeptídicos que unen ambos lóbulos, el grupo II está formado por proteínas que tienen sólo dos segmentos, mientras que el grupo III son proteínas con sólo un segmento.

LAO y Art J: Nuestros modelos de estudio de cambio conformacional asociado a la unión de ligando.

Para este trabajo se utilizaron las estructuras cristalográficas de LAO con arginina (1LAF) e histidina (1LAG) y sin ligando (LAO), además de su homóloga termófila, Art J, con arginina (2Q2A) e histidina (2Q2C).

LAO es una proteína periplásmica de unión (PBP) de *Salmonella typhimurium*, de tipo II formada por 238 residuos, cuya estructura es bilobular (lóbulo A y lóbulo B) y ambos dominios están unidos por dos segmentos peptídicos; el lóbulo A está formado por los aminoácidos 1-89 y 191-238, mientras que el lóbulo B abarca del residuo 90 al 190 (figura 12). El lóbulo A es más grande que el B, lo cual es diferente a lo observado en la mayoría de las PBPs, donde ambos tienen tamaños similares. Dichos dominios están conectados por dos segmentos polipeptídicos, constituidos por los residuos 89-92 y 186-194. Cada

dominio está formado a su vez por 5 hebras β , cuatro paralelas y una anti paralela, rodeadas por 4 hélices α ; esta topología se conoce como plegamiento de unión a nucleótido (o plegamiento tipo *Rossmann*). Además, tiene un puente disulfuro entre los residuos 38 y 45, y dos triptófanos en las posiciones 47 y 130.

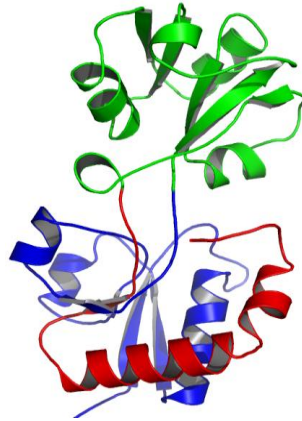


Figura 12. Estructura cristalográfica de LAO. Los residuos en verde (90-190) representan el lóbulo continuo (B), mientras que los de color azul (1-89, extremo amino) y rojo (191-238, extremo carboxilo) al lóbulo continuo (A).

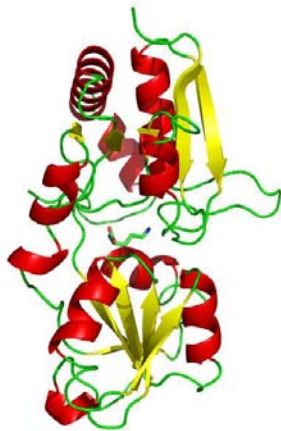


Figura 13. Estructura cristalográfica de LAO en estado cerrado con arginina como ligando.

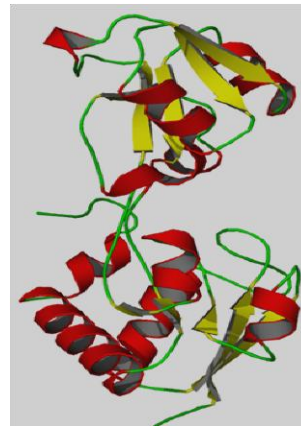


Figura 14. Estructura cristalográfica de LAO en estado abierto.

Por su parte, Art J es el receptor en el transportador ABC de la bacteria termófila *Geobacillus stearothermophilus*. Dicha proteína une arginina, lisina e histidina, sin embargo, se tiene reportado que el ligando con mayor afinidad es la arginina ($K_d = 0.0039 \pm 0.014 \mu\text{M}$). Art J es una proteína bilobular unida por una región de bisagra y cuya interface entre ambos lóbulos forma un hueco de unión al substrato, el cual se encuentra perfectamente conservado para los tres complejos Art J-ligando. Estudios de mutagénesis mostraron que la región carboxilo terminal del lóbulo es importante, ya que hace contacto con el transportador Art (MP)₂, y que los residuos Gln132 y Trp68 son de suma importancia para la unión de ligandos. Al mutar Gln132Leu disminuyó notablemente la afinidad para la unión de ligandos. Al mutar Gln132Leu disminuyó notablemente la afinidad por arginina y no hubo unión de lisina e histidina, mientras que la variante Trp68Leu perdió afinidad por los tres ligandos (figura 15). (Vahedi-Faridi, 2008).

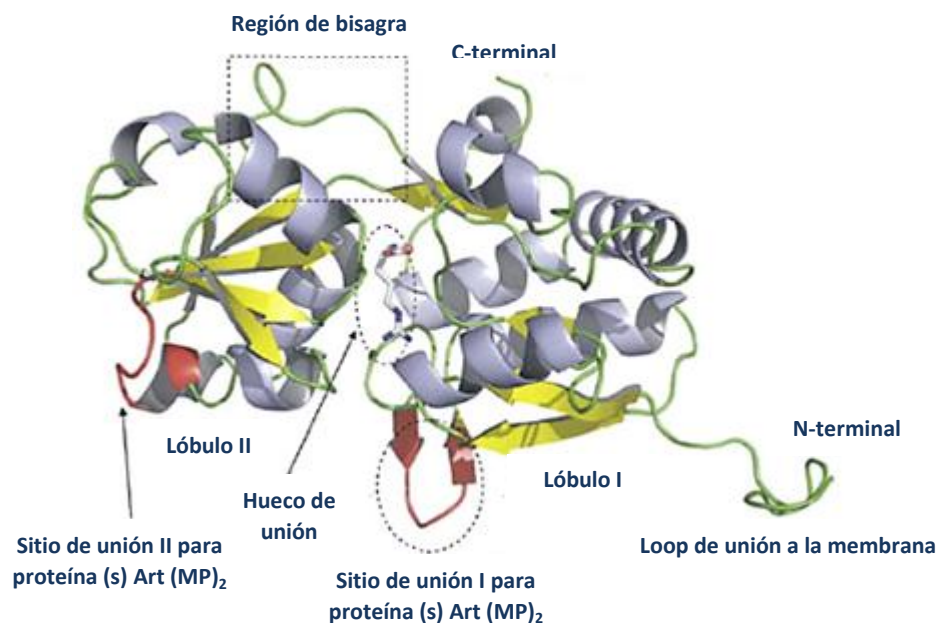


Figura 15. Estructura secundaria de Art J uniendo L-arginina. Las hojas β se presentan en color amarillo y las α -hélice en azul-gris. (Vahedi-Faridi, 2008)

En la figura 16, se muestra el alineamiento de secuencias entre las proteínas Art J, LAO e HisJ (homóloga mesófila de LAO Art J), sin tomar en cuenta el péptido señal. En cajas verdes se muestran los residuos que interactúan con el receptor de membrana.

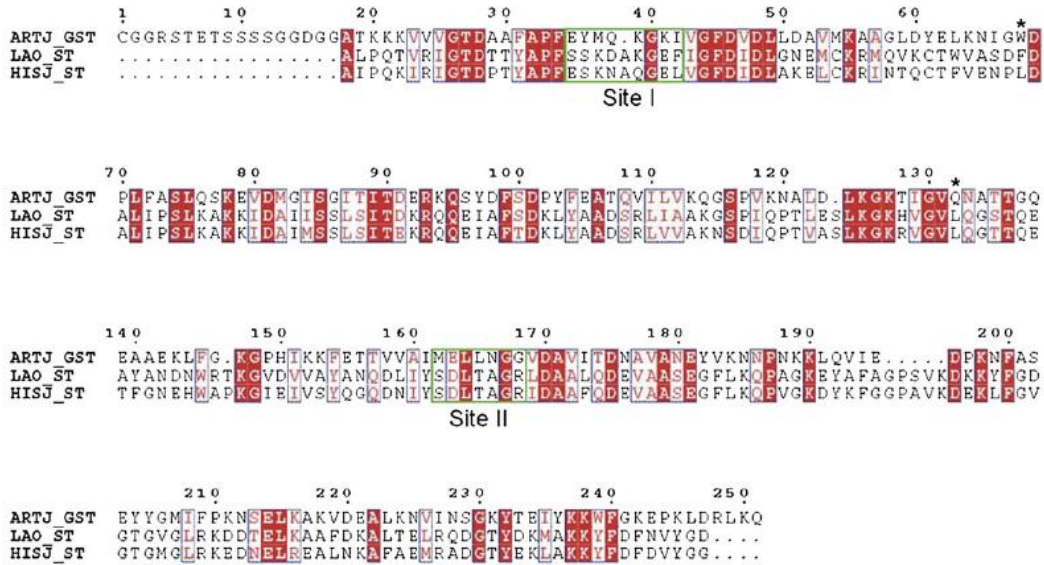


Figura 16. Alineamiento de secuencias para receptores de amino ácidos básicos (Art J, LAO e HisJ). Se muestran las secuencias sin el péptido señal. Los residuos que interactúan con el receptor de membrana están encerrados en verde. Los residuos idénticos para las tres proteínas están en letras blancas con fondo rojo. Los residuos homólogos se muestran en letras rojas, mientras que la Gln132 y el Trp668 que fueron mutados contienen un asterisco. (Vahedi-Faridi, 2008)

A partir del alineamiento estructural entre el sitio de unión de Art J y LAO, teniendo como ligando arginina, se observó que LAO tiene una serina en la posición 120 mientras que Art J una tirosina en la posición 135, Lao tiene una leucina en la posición 117 y Art J una glutamina en la posición 132, finalmente, LAO tiene una serina en la posición 18 a diferencia de Art J, que posee un ácido glutámico en la posición 35 (Figura 17). (Vahedi-Faridi, 2008).

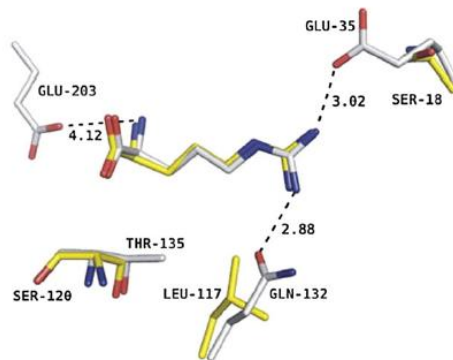


Figura 17. Residuos que son diferentes entre Art J-Arg (gris) y LAO-Arg (amarillo): LAO-Ser120 → ArtJ-Thr135, LAO-Leu117 → ArtJ-Gln132 and LAO-Ser18 → ArtJ-Glu35. Gln-132 O ϵ y Glu-35O ϵ 2 de ArtJ forman puentes de hidrogeno con la cadena lateral de arginina que no se forman en LAO-Arg. (Vahedi-Faridi, 2008)

Los autores atribuyen los aminoácidos conservados a tres razones principales: 1) aminoácidos que reconocen e interactúan con el complejo de membrana, 2) los que unen los grupos amino y carboxilo de los aminoácidos, 3) los que permiten que las dos proteínas tengan la misma topología. Las zonas más conservadas entre LAO y HisJ son los residuos 53-94 y 146-177 con 92% de identidad. Se propuso que dichas regiones son las responsables del reconocimiento del complejo de membrana, dicha hipótesis está apoyada por el hecho de que mutaciones en HisJ, que afectan el reconocimiento del complejo, se encuentran en esas zonas. Además, estos residuos se encuentran en la superficie de la proteína. Para determinar qué residuos son los responsables de la unión al complejo se tomaron en cuenta dos criterios: 1) que estuvieran conservados y que 2) se encontraran en la superficie. Los que satisficieron esos criterios fueron residuos de la superficie que se encuentran en las zonas altamente conservadas mencionadas anteriormente. Todos ellos se encuentran del lado de la proteína donde está la zona de unión a ligando. (Vahedi-Faridi, 2008).

- ***Estudios estructurales de LAO***

Estudios termodinámicos del plegamiento de la proteína LAO indican que dicho proceso no presenta intermediarios estables. Los experimentos de desnaturalización térmica seguidos por técnicas espectroscópicas (intensidad de fluorescencia y dicroísmo circular), así como calorimetría diferencial de barrido (DSC), se ajustaron adecuadamente a un modelo de dos estados. En estas condiciones LAO presenta una reversibilidad mayor al 90%. Los valores de ΔH y T_m obtenidos por calorimetría son muy similares a los valores obtenidos a partir de los datos espectroscópicos, lo cual confirma que al equilibrio el plegamiento de LAO no presenta intermediarios estables. Del mismo modo, los experimentos de desnaturalización inducida por urea se ajustaron a un modelo de dos estados. (Vergara, 2011).

En contraste, los experimentos cinéticos muestran mayor complejidad. El gráfico de chevron obtenido de los ensayos de desnaturalización y renaturalización presenta dos ramas a concentraciones bajas de urea, ambas con curvatura, sugiriendo la presencia de al

menos un intermediario cinético durante el replegamiento. Experimentos de renaturalización en presencia de ciclofilina A, una enzima con actividad de prolil-isomerasa, muestran la existencia de isomerización de prolinas en el proceso de plegamiento. Al analizar la estructura cristalográfica de LAO se observa que la prolina 16 se encuentra en la conformación cis. Dicho residuo está muy conservado en las PBPs y se ubica cerca del sitio de unión, en un asa importante para el reconocimiento del transportador en la membrana celular. Por ello, es probable que esta prolina sea responsable de la isomerización presente en el replegamiento de LAO. (Vergara, 2011).

- ***Estudios de unión de LAO***

A partir de estudios de calorimetría de titulación isotérmica realizados en el laboratorio (Pulido, 2015) se han obtenido los valores de ΔC_p , ΔH y ΔS para la unión de LAO a histidina y arginina, ligandos de alta y muy alta afinidad respectivamente. El ΔH y $T\Delta S$ calculados para arginina a 25 °C fueron de $-11.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ y $+1 \text{ kcal mol}^{-1}$, mientras que para histidina resultaron de $-8.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ y $-0.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ respectivamente. Estos datos muestran que la unión de LAO por ambos ligandos está guiada por entalpía. Un análisis de las características termodinámicas de la unión de diversas proteínas a sus ligandos ha mostrado que un aumento en la afinidad está relacionada directamente con un incremento en el componente entálpico, en nuestro caso, el $\Delta\Delta H$ entre ambos ligandos es de $\sim 3 \text{ kcal mol}^{-1}$. El análisis de las estructuras cristalográficas muestra que dicha diferencia se debe a la presencia de dos puentes de hidrógeno que el grupo guanido de la cadena lateral de arginina forma con la Asp-11 de LAO, los cuales no se encuentran presentes en la histidina. El valor de ΔC_p obtenido para la unión de ambos ligandos es de $\sim -300 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, la mayor parte proveniente de la desolvatación de la proteína que acompaña al cambio conformacional entre el estado abierto y el cerrado (Pulido, 2015).

- *Análisis de Flexibilidad a través de los Análisis de Redes Restringidos (Constraint Network Analysis).*

Con el fin de analizar el papel de la flexibilidad en la proteína LAO en estado abierto y cerrado, así como su homóloga termófila Art J, se utilizó el servidor web CNA. Dicho servidor provee una interfaz amigable que permite relacionar los análisis estructurales de rigidez a las propiedades biológicamente relevantes de cualquier biomolécula.

El servidor de red CNA realiza una simulación de desnaturalización térmica que toma en cuenta la dependencia a la temperatura de los enlaces e interacciones entre los átomos y calcula una serie de índices globales y locales de rigidez que están parametrizados con el fin de cuantificar la estabilidad biomacromolecular (Krüger, 2013).

CNA modela la estructura de una proteína convirtiéndola en una red de grano grueso, en donde los átomos se representan por esferas y los enlaces por barras, a lo que denominaremos esquema de “esfera y barra”. En este modelo cada átomo es representado como un cuerpo con seis grados de libertad. Las interacciones entre los átomos (enlaces covalentes y no covalentes, figura 18) se representan con una serie de barras las cuales restringen el movimiento interno entre los átomos dependiendo de las propiedades particulares de cada enlace y su energía de interacción. Por ejemplo, en la parametrización que utiliza el programa de CNA un enlace covalente simple es representado por cinco barras, mientras que el enlace peptídico y los dobles enlaces se representan con seis barras, denegando cualquier rotación. Las interacciones no covalentes, entre ellas los puentes de hidrogeno y los puentes salinos, son modelados con cinco barras, en tanto que las interacciones hidrofóbicas y las catión- π son representadas por dos y tres barras respectivamente, lo que se ilustra en la Figura 20A y 20B.

Una vez que se construyó la red proteica, el algoritmo utilizado por CNA (“the pebble game algorithm” en inglés) descompone la red en clústers rígidos y regiones flexibles. Este algoritmo calcula la rigidez de la red proteica a nivel de los enlaces, determinando si un enlace es parte de un clúster rígido o de una región flexible. De tal manera, un clúster rígido es una serie de átomos entre los que no se permiten movimientos internos y que se mueven de manera colectiva.

Una vez que son removidas las regiones no covalentes de la red, una nueva representación de la red a temperaturas elevadas es construída. De esta manera, para un estado dado de la red $s = f(T)$, los puentes de hidrógeno (incluidos los puentes salinos) con una energía $E_{hb} > E_{cut, hb}$ son eliminados de la red. Lo anterior sigue la idea de que aquellos puentes de hidrógeno que son más fuertes se romperán a temperatura más elevada que aquellos que son más débiles. La escala de E_{hb} es convertida a una escala de temperatura T , utilizando una ecuación lineal propuesta por Radestock y Gohlke (2011). Por default, el número de interacciones hidrofóbicas se mantiene constante durante la simulación de desnaturalización térmica. De cualquier manera, a medida que la fuerza de las interacciones hidrofóbicas aumenta junto con el incremento de temperatura, dichas interacciones pueden ser tratadas como temperatura-dependiente, si así se requiere. Por último, el desmoronamiento de un clúster rígido se realiza para cada estado s para calcular los índices globales y locales (Figura 20C).

En los índices globales se identifican los puntos de transición en donde la estructura biomolecular cambia de un estado rígido a uno flexible; dichos puntos de transición pueden relacionarse a la termoestabilidad de la proteína. De igual manera, los llamados “weak spots” que forman el núcleo de desplegamiento en la estructura proteica, son localizados inmediatamente; estos residuos pueden ser explotados para ingeniería proteica. Los índices locales permiten relacionar flexibilidad con función y entender el impacto de la unión de un ligando a la flexibilidad de la proteína (Krüger, 2013).

Los datos arrojados por CNA se presentan como datos crudos, gráficos y/o representaciones de la estructura mediante Jmol. Se puede acceder al servidor web mediante la dirección <http://cpclab.uni-duesseldorf.de/cna> o <http://www.cnanalysis.de>, es gratuito, para todo público y sin necesidad de contar con usuario (Krüger, 2013).

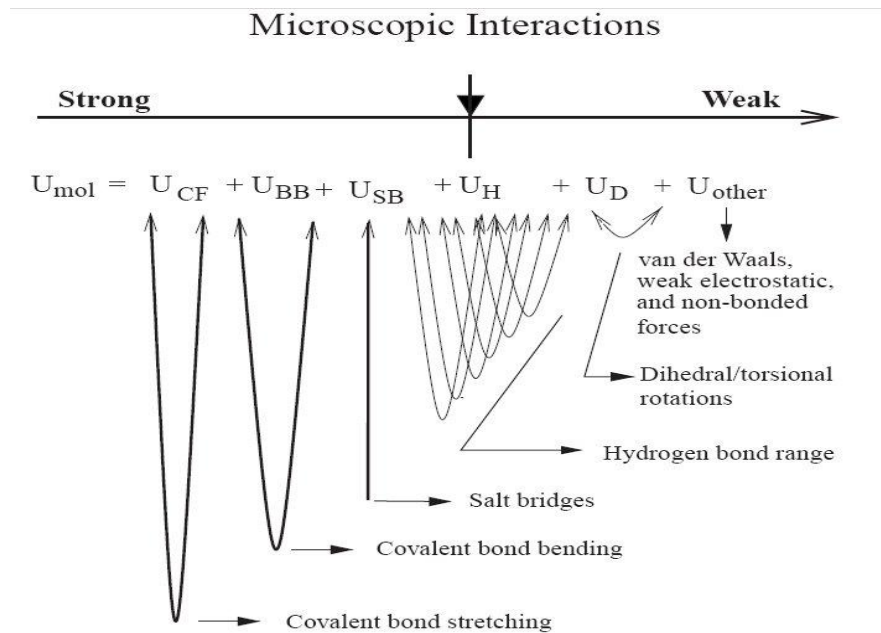


Figura 18. La energía total de una molécula está compuesta por la sumatoria de los diferentes tipos de enlaces que están presentes.

CNA muestra los índices de percolación y rigidez en la estructura de la proteína resaltando con colores los residuos dependiendo el valor del índice que representa. La escala de colores se muestra en la figura 19, donde para valores iguala cero se utiliza el color rojo, indicando los residuos que son más flexibles, mientras que para valores igual a -6 se utiliza el color azul, mostrando los residuos más rígidos. Entre el color rojo y el azul existen colores intermedios para representar los valores entre 0 y -6 de energía. Para los resultados que se muestran en esta tesis se utiliza dicha escala de colores.

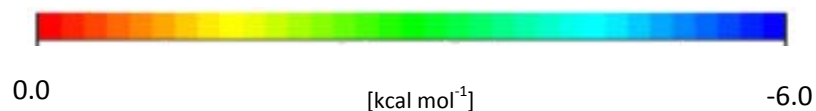
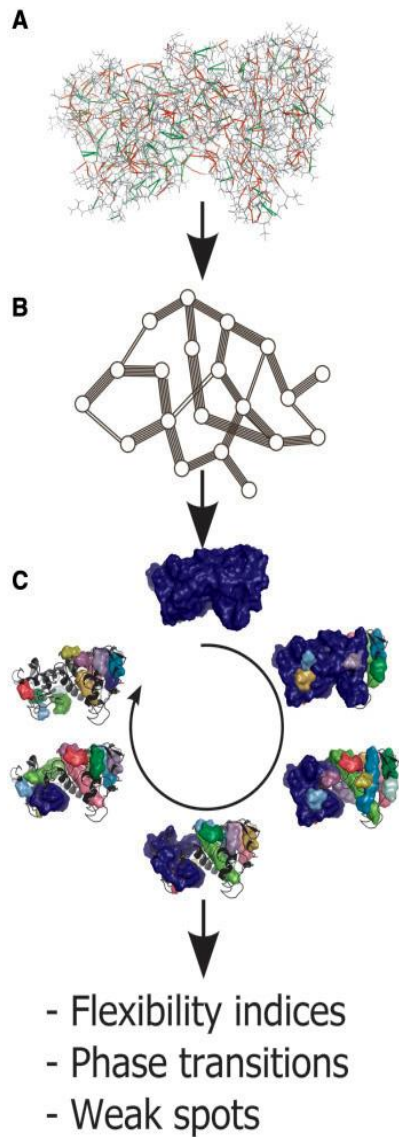


Figura 19. Espectro de colores utilizado por CNA para representar los diferentes valores de los índices de rigidez y percolación en los residuos de la estructura proteica.



D Constraint Network Analysis

Email (optional)

PDB ID OR *

Analysis type:

Single network - Single Structure
(Thermal unfolding simulation on a single network created from a single input structure)

Ensemble of networks - Ensemble of structures
(Thermal unfolding simulation on an ensemble of networks created from an ensemble of input structures)

Ensemble of networks - Single Structure
(Thermal unfolding simulation on an ensemble of networks created from a single input structure)

No. of network topologies

Simulation parameters:

of hydrophobic tethers remains constant during simulation (recommended)

of hydrophobic tethers increases with increasing temperature

Hydrophobic method

Hydrophobic cutoff:

Constant value

Initial value Terminal value


E-cutoff for H-bonds:

Initial value Terminal value

Stepsize

Output settings:

Write stability map

 Can't read?

(Sample run for PDB ID 1NPC)

Via submit, you have read and accepted the terms and conditions.

Figura 20. Muestra los enlaces covalentes y no covalentes en una estructura proteica (A). CNA se encarga de modelar dichos enlaces y representar cada átomo como un cuerpo y cada enlace con barras para formar una red (B), entonces se lleva a cabo la simulación de desnaturalización térmica y se procede a calcular los índices de rigidez, estados de transición y los llamados "weak spots" (C). Página de inicio del servidor web CNA (D). (Krüger, 2013).

Hipótesis.

Dado que la flexibilidad varía a lo largo de la estructura de una proteína, se espera que, bajo condiciones de incremento de temperatura, aquellas regiones que son más flexibles sean aquellas que pierdan su estabilidad con menor cantidad de energía.

Objetivos generales.

Generar un modelo de rigidez/flexibilidad para la proteína LAO con y sin ligando, así como para su homóloga termófila ArtJ.

Objetivos particulares.

- Analizar los cambios en la flexibilidad a lo largo de la desnaturalización térmica (in sílico) con el fin de buscar patrones de pérdida de estabilidad en las diversas estructuras estudiadas.
- Generar un posible modelo de la vía de plegamiento de la proteína LAO, a partir del análisis de cambios en flexibilidad asociados al cambio de temperatura.

Metodología.

Obtención y mejora de la estructura cristalográfica de la proteína LAO/ArtJ con y sin ligando.

Para analizar la rigidez/flexibilidad de la proteína LAO se utilizó el archivo que contiene su estructura cristalográfica. Dicho archivo se descargó del servidor web del Protein Data Bank (PDB). Debido a que se analizaron las estructuras de la proteína LAO con y sin ligando, así como sus homólogas termófilas, los códigos utilizados se describen a continuación:

- 2LAO: Proteína LAO sin ligando (estado abierto).
- 1LAF: Proteína LAO con arginina (estado cerrado).
- 1LAG: Proteína LAO con histidina (estado cerrado).
- 2Q2A: ArtJ, Proteína homóloga de LAO, termófila, con arginina (estado cerrado).
- 2Q2C: ArtJ, Proteína homóloga de LAO, termófila, con histidina (estado cerrado).

A partir de aquí se procedió de manera diferente para las proteínas mesófilas y para las termófilas, la figura 21 explica de manera general los pasos seguidos en cada caso. Para las proteínas mesófilas se llevó a cabo la validación de cada estructura cristalográfica utilizando el servidor MolProbity, el cual realizó cambios en los ángulos de algunas cadenas de aminoácidos para mejorar la estructura cristalográfica. Una vez obtenida dicha estructura se mejoró haciendo minimizaciones energéticas utilizando la suite CHIMERA (se utilizaron los siguientes comandos secuencialmente: Tools, Structure Editing, Minimize Structure) para que posteriormente se realizara el análisis de la rigidez/flexibilidad de las estructuras proteicas mediante el servidor CNA. Para las proteínas termófilas primero se les retiraron las cadenas B, C y D utilizando CHIMERA con la finalidad de sólo quedarnos con la cadena A (recordemos de ArtJ es un tetrámero cuyas cadenas son idénticas), posteriormente se validaron las estructuras utilizando MolProbity y se obtuvieron las estructuras modificadas las cuales se minimizaron energéticamente (se utilizaron los siguientes comandos secuencialmente: Tools, Structure Editing, Minimize Structure) con CHIMERA para después analizar su rigidez/flexibilidad utilizando el servidor CNA.

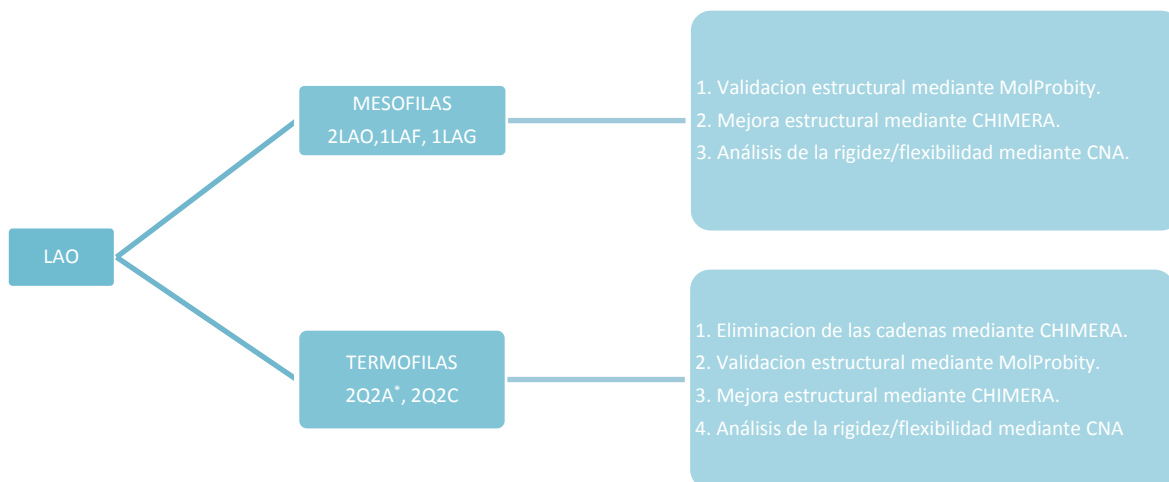


Figura 21. Descripción general de la metodología utilizada para analizar la rigidez/flexibilidad de la proteína LAO. Se enlistan los pasos para las estructuras de las proteínas mesófilas y termófilas.

La celda unitaria obtenida de la cristalografía de ArtJ con arginina e histidina está formada por cuatro cadenas, por lo cual se eliminaron tres cadenas del archivo PDB, utilizando sólo la cadena A para poder realizar el análisis. Dicha edición se realizó mediante la suite CHIMERA utilizando el menú SELECT, CHAIN y seleccionando una por una todas las cadenas diferentes de A para luego utilizar el menú ACTIONS y eliminarlas.

Cabe señalar que para la estructura cristalográfica de ArtJ con arginina se encontraron dos conformeros en los residuos 1 y 192, uno de los cuales fue eliminado utilizando como criterio de selección el factor beta más grande debido a que indica que dicha conformación es menos frecuente.

Posteriormente, se evaluaron las estructuras cristalográficas de las proteínas mesófilas y termófilas utilizando el servidor web MolProbity, el cual corrigió errores en ángulos de cadenas laterales, añadió los hidrógenos *de novo* a la estructura modificada y reportó la calidad de la estructura mediante una serie de parámetros (gráfico de Ramachandran, rotámeros pobres, clash score, etc). Finalmente, se descargó el archivo .pdb modificado sin hidrógenos.

Además de las modificaciones realizadas por MolProbity, fue necesario realizar modificaciones estructurales con CHIMERA, entre ellas la adición de cargas de los

residuos, reparación de cadenas laterales mediante biblioteca Dunbrack, adición de hidrógenos, así como la eliminación del solvente. Lo anterior se realizó utilizando el menú TOOLS, STRUCTURE EDITING y DOC PREP, en este último paso es donde se realiza la mayor parte de la edición de la estructura.

Análisis de la rigidez/flexibilidad de la proteína LAO y ArtI con y sin ligando.

Los archivos PDB obtenidos del último paso con CHIMERA se cargaron al servidor web CNA para realizar el análisis de las estructuras, utilizando los valores *cut-off* predeterminados por el servidor (figura 22). Cabe señalar que al cargar la estructura modificada por CHIMERA, se seleccionó la opción *Single network* en la sección *Analysis type* con el fin de indicarle al servidor que se requiere hacer el análisis de una sola molécula. Una vez seleccionado este campo, los valores *cut-off* predeterminados aparecen por sí solos.

CNA Analysis

Constraint Network Analysis

Email (optional)

PDB ID OR No se eligió archivo *

Analysis type:

Single network - Single Structure
(Thermal unfolding simulation on a single network created from a single input structure)

Ensemble of networks - Ensemble of structures
(Thermal unfolding simulation on an ensemble of networks created from an ensemble of input structures)

Ensemble of networks - Single Structure
(Thermal unfolding simulation on an ensemble of networks created from a single input structure)

No. of network topologies

Simulation parameters:

of hydrophobic tethers remains constant during simulation (recommended)

of hydrophobic tethers increases with increasing temperature

Hydrophobic method

Hydrophobic cutoff:

Constant value

Initial value Terminal value

E-cutoff for H-bonds:

Initial value Terminal value

Stepsize

Output settings:

Write stability map

Can't read?

(Sample run for PDB ID 1NPC)

Via submit, you have read and accepted the [terms and conditions](#).

Figura 22. Valores predeterminados por el servidor CNA al momento de seleccionar la opción "Single network-Single Structure" para analizar la estructura PDB obtenida en el último paso con CHIMERA.

Adicionalmente a los parámetros establecidos, el servidor CNA hace observaciones importantes al usuario antes de cargar el archivo e iniciar el análisis, tales como:

- ❖ Los archivos cargados para estructuras individuales deben estar en formato .pdb.
- ❖ Los archivos cargados no deben sobrepasar los 80 megabytes.
- ❖ El archivo no puede tener conformaciones alternas, es decir, no puede haber ocupancias menores a 1.
- ❖ El archivo no puede tener cadenas incompletas.
- ❖ Los hidrógenos deben de añadirse previamente por el usuario.

El servidor de red CNA calcula en total seis índices globales y tres índices locales de flexibilidad. Los índices globales representan la flexibilidad (y rigidez) macroscópica de la red en cada estado s de la misma y son los siguientes: (i) “the floppy mode density” Φ , (ii) el clúster principal de rigidez S , (iii) y (iv) el parámetro de orden de rigidez P_∞ tipo 1 y 2, y (v) y (vi) la configuración entrópica del clúster H (tipo 1 y 2). Para este trabajo sólo se utilizaron los dos últimos (P_∞ tipo 2 y H). P_∞ tipo 2 representa el clúster rígido más grande mientras que H es una medida del grado de desorden de un estado dado de la red.

Por otro lado, los índices locales caracterizan la flexibilidad de la red a nivel de enlaces monitoreando el cambio en la flexibilidad para cada enlace durante la simulación de la desnaturalización térmica: (i) el índice de percolación pi se determina por cada enlace covalente mediante su valor de $E_{cut, hb}$ durante la simulación de desnaturalización térmica al cual es segregado del clúster gigante de percolación; (ii) el índice de rigidez ri está determinado para cada enlace covalente mediante su valor de $E_{cut, hb}$ durante la simulación de desnaturalización térmica el cual cambia de rígido a flexible; (iii) el mapa de estabilidad rc_{ij} es un desglose en 2D del índice de rigidez ri . En esta tesis sólo se utilizaron los dos primeros índices.

Para cada estructura se obtuvieron sus respectivos índices globales y locales. Finalmente se procedió a analizar los parámetros arrojados utilizando herramientas como Origin 8 para construir gráficos, y PyMol para representar las diversas zonas rígidas/flexibles de

cada estructura proteica seleccionando los residuos y relacionándolos con sus valores correspondientes

Resultados.

La proteína LAO sin ligando.

- **Índices globales.**

Los gráficos 1 y 2 muestra los parámetros de entropía (H) y percolación (P) para la proteína LAO sin ligando. Es importante destacar que la entropía es graficada como función de la temperatura y que permitió monitorear la perdida de estabilidad de la proteína durante la desnaturalización térmica. Se puede observar en la tabla 1 que la T_m para H es de 329.09 K (55.94 °C), mientras que para P es de 328.42 K (55.27 °C). La desnaturalización térmica de la proteína LAO seguida por dicróismo circular a pH 8 en buffer Bis-Tris Propano tiene una T_m de 334 K (60.85 °C), un valor muy cercano a las T_m obtenidas con CNA, lo cual puede implicar que las energías de interacción en LAO durante la simulación térmica con CNA sean parecidas a de la proteína en esas condiciones.

Gráfico 2. Valores de entropía para la proteína LAO sin ligando durante la simulación de desnaturalización térmica. La línea roja indica el valor de T_m .

Gráfico 1. Valores de percolación durante la simulación de desnaturalización térmica para la proteína LAO sin ligando. La línea roja indica el valor de T_m .

| Parámetro | T_m (°C) |
|--------------|------------|
| H | 55.94 |
| P | 55.27 |
| Experimental | 60.85 |

Tabla 1. Se observan los valores obtenidos por CNA para la T_m de los parámetros H y P durante la desnaturalización térmica de la proteína LAO sin ligando. También se observa la T_m experimental a pH=8 en buffer Bis-Tris Propano.

El clúster gigante de percolación para la proteína LAO se muestra en la figura 23, donde se observa que abarca sólo el lóbulo discontinuo. Lo anterior indica que los residuos 5-88 y 195-231 son aquellos que permanecen unidos por más tiempo durante la simulación de la desnaturalización térmica. Por otro lado, la figura 24 muestra los residuos con índice de percolación más positivos (19-27, 5 y 50-54), donde los residuos 19-27 resultan ser aquellos que interactúan con el translocador en la membrana plasmática de la célula. De manera opuesta, la figura 25 muestra los residuos con el índice de percolación (P_i) más negativo (32-40), donde el C 38 forma un puente disulfuro que puede ser un posible núcleo de plegamiento para la proteína.



Figura 23. Muestra el clúster gigante de percolación (rojo) para la proteína LAO sin ligando.

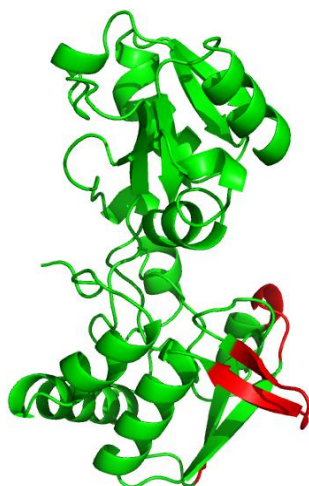


Figura 24. Muestra los residuos con los índices de percolación más positivos (rojo): $P_i = -0.3$, residuos 19-27 y $P_i = -0.8$, residuos 5, 50-54



Figura 25. Se representan los residuos más negativos (azul): $P_i = -5.2$, residuos 32.40.

| Residuos | P_i |
|---|-----------------------------|
| 19-27 | -0.3 kcal mol ⁻¹ |
| 5, 50-54 | -0.8 kcal mol ⁻¹ |
| 55-64 | -1.1 kcal mol ⁻¹ |
| 6-18, 28-31, 41-49, 65-88, 195-203, 231 | -1.4 kcal mol ⁻¹ |
| 220-230 | -2.0 kcal mol ⁻¹ |
| 204-219 | -4.6 kcal mol ⁻¹ |
| 32-40 | -5.2 kcal mol ⁻¹ |

Tabla 2. Índices de percolación (P_i) con sus respectivos residuos para LAO sin ligando.

- **Índices locales.**

El gráfico 3 muestra los valores obtenidos durante la desnaturalización térmica para el índice de percolación en LAO sin ligando. Para ésta estructura las zonas más rígidas (valores más negativos) son residuos que forman parte de estructuras alfa hélice.

— Beta
— Alfa

Gráfico 3. Muestra los valores de P_i para cada residuo de la proteína LAO sin ligando durante la simulación de desnaturalización térmica. Las líneas verdes indican aquellos residuos que forman parte de una hoja beta en la estructura, las líneas rojas muestran los residuos que forman parte de alfa hélices y los espacios entre líneas indican estructura random coil.

El gráfico 4 muestra los valores obtenidos durante la desnaturalización térmica para el índice de rigidez en LAO sin ligando. Se puede observar que para este índice, los residuos más rígidos (valores más negativos) son aquellos que forman parte de regiones desordenadas (random coil), excepto por aquel que forma parte de una estructura beta plegada.

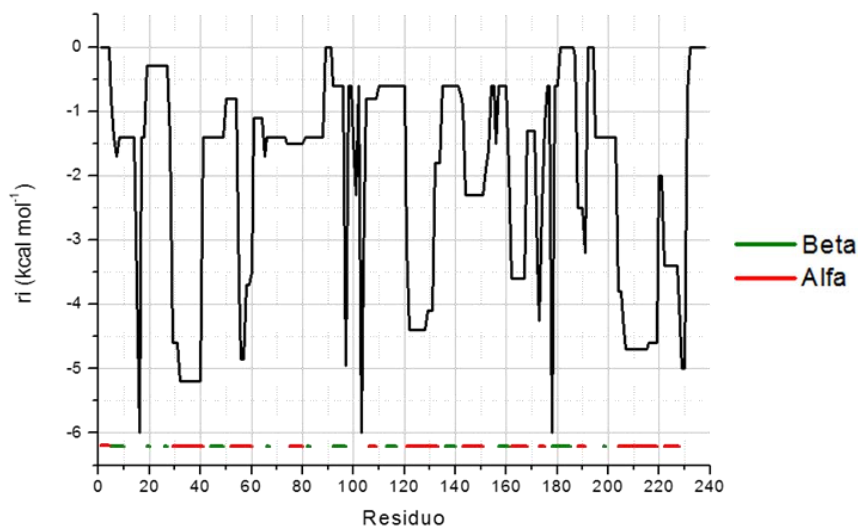


Gráfico 4. Muestra los valores del índice de rigidez (r_i) para cada residuo de la proteína LAO sin ligando durante la simulación de desnaturalización térmica. Las líneas verdes indican aquellos residuos que forman parte de una hoja beta en la estructura, las líneas rojas muestran los residuos que forman parte de alfa hélices y los espacios entre líneas indican estructura random coil.

Además, la figura 26 muestra los índices de rigidez para la proteína LAO sin ligando. La figura 26a muestra los residuos con el r_i más positivo ($r_i = -0.3 \text{ kcal mol}^{-1}$, residuos más flexibles); la figura 26b muestra los residuos con un $r_i = -0.8$ dentro de los que se encuentran el residuo F52, el cual forma parte del sitio de unión; la figura 26c muestra los residuos con un $r_i = -1.4$, donde el residuo C45 forma puente disulfuro con W47, mientras que el residuo Y14, S70 y S72 forman parte del sitio de unión. La figura 26d indica los residuos con un $r_i = -1.5$, los cuales forman parte de una estructura alfa hélice y donde R77 forma parte del sitio de unión. La figura 26e muestra los residuos con un $r_i = -1.7$ que contiene al residuo D161 que forma parte del sitio de unión. Como se puede observar, los residuos que forman parte del sitio de unión se encuentran en regiones flexibles de la proteína. Finalmente, la figura 26g y 26h muestran los residuos más rígidos con un $r_i = -5.2$ y $r_i = -6.0$ respectivamente. Cabe destacar que los residuos más rígidos forman parte de estructura alfa hélice y random coil.

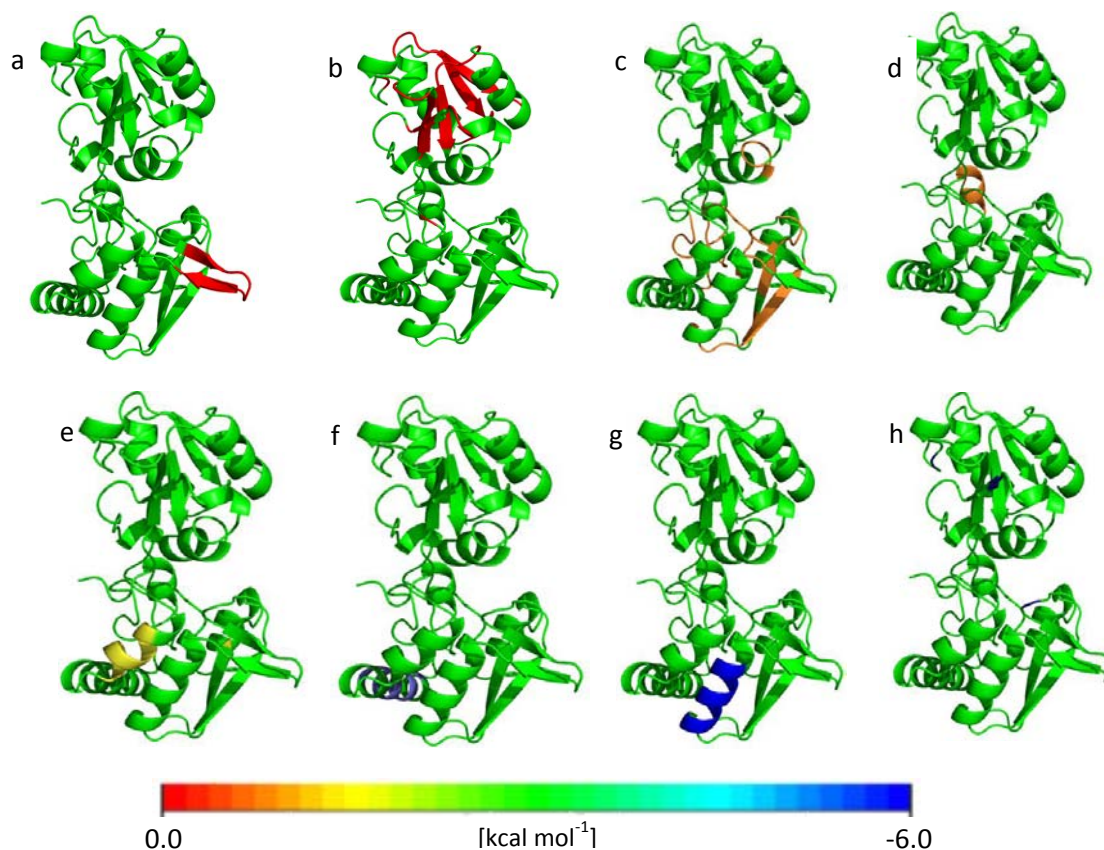


Figura 26. Muestra los índices de rigidez para la proteína LAO sin ligando del más positivo al más negativo (figura 26a-26g, respectivamente).

Por último, se obtuvo el núcleo de desplegamiento para LAO sin ligando, los residuos que se muestran en color rojo en la figura 27 son los llamados “puntos débiles” ya que son los residuos por donde comienza el desplegamiento del cluster gigante de percolación. La tabla 3 muestra los residuos que forman parte del núcleo de desplegamiento. Cabe destacar que dichos residuos son importantes si se quisiera realizar mutagénesis para obtener una proteína más termoestable debido a que son estos residuos por donde comienza el desplegamiento del cluster gigante de percolación en el punto de inflexión.

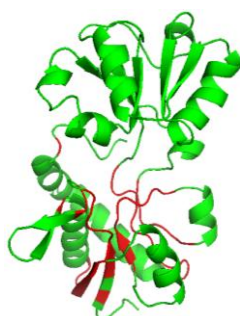


Figura 27. Muestra los residuos que forman parte del núcleo de desplegamiento para LAO sin ligando (rojo).

| No. Residuo | Residuo | No. Residuo | Residuo | No. Residuo | Residuo |
|-------------|---------|-------------|---------|-------------|---------|
| 6 | VAL | 45 | CYS | 83 | PHE |
| 8 | ILE | 46 | THR | 84 | SER |
| 9 | GLY | 47 | TRP | 85 | ASP |
| 10 | THR | 48 | VAL | 86 | LYS |
| 11 | ASP | 49 | ALA | 87 | LEU |
| 12 | THR | 66 | ALA | 88 | TYR |
| 13 | THR | 67 | ILE | 195 | THR |
| 14 | TYR | 68 | ILE | 196 | GLY |
| 17 | PHE | 69 | SER | 197 | VAL |
| 18 | SER | 70 | SER | 198 | GLY |
| 28 | GLY | 71 | LEU | 199 | LEU |
| 41 | MET | 72 | SER | 200 | ARG |
| 42 | GLN | 73 | ILE | 201 | LYS |
| 43 | VAL | 81 | ILE | 202 | ASP |
| 44 | LYS | 82 | ALA | 203 | ASP |

Tabla 3. Indica los residuos que forman parte del núcleo de desplegamiento en LAO sin ligando.

La proteína LAO con arginina.

- **Índices globales.**

A continuación se muestran los gráficos para P y H de la proteína LAO con arginina como ligando. El valor de T_m para H es de 340.94 K (67.79 °C) mientras que para P es de 341.02 K (67.87 °C). La T_m obtenida experimentalmente a pH=8 y utilizando como buffer Bis-Tris Propano resultó de 340 K (66.85 °C). Nuevamente, se observa que los valores de las T_m son muy parecidas in silico y experimentalmente.

Grafico 4. Parámetro H para la proteína LAO con arginina. La línea roja interseca con el eje de las abscisas e indica el valor de T_m .

| Parámetro | T_m (°C) |
|--------------|------------|
| H | 67.79 |
| P | 67.87 |
| Experimental | 66.85 |

Tabla 4. T_m para H y P de la proteína LAO con arginina durante la simulación de la desnaturalización térmica mediante CNA. El valor de T_m experimental se obtuvo a pH=8 en buffer Bis-Tris Propano.

Grafico 5. Parámetro P para la proteína LAO con arginina. La línea roja interseca con el eje de las abscisas e indica el valor de T_m .

El clúster gigante de percolación para LAO con arginina abarca ambos lóbulos (Figura 28). Por otra parte, en la figura 29 se observan diferentes valores de P_i , los cuales se representan en colores de acuerdo a la escala de valores de energía.

La figura 30 y la tabla 5 muestran las diferentes regiones del CGP con su respectivo P_i . Se observa que los residuos que requirieron menor energía para dejar de formar parte del CGP en LAO sin ligando (residuos 19-27, $P_i = -0.3 \text{ kcal mol}^{-1}$; residuos 5, 50-54, $P_i = -0.8 \text{ kcal mol}^{-1}$) requirieron mayor energía para LAO con arginina (ver Tabla 2).

| Residuos | P_i |
|-------------------------------|--|
| 181-194 | -0.3 kcal mol ⁻¹ (figura 30a) |
| 89-119, 131-160, 175-180 | -1.5 kcal mol ⁻¹ (figura 30b) |
| 50-54, 60-64 | -1.8 kcal mol ⁻¹ (figura 30c) |
| 5-49, 65-87, 161-174, 195-203 | -2.0 kcal mol ⁻¹ (figura 30d) |
| 120-130 | -3.1 kcal mol ⁻¹ (figura 30e) |
| 55, 204-219 | -4.0 kcal mol ⁻¹ (figura 30f) |
| 56-59 | -4.7 kcal mol ⁻¹ (figura 30g) |
| 88 | -6.0 kcal mol ⁻¹ (figura 30h) |

Tabla 5. Residuos de LAO+arg con su respectivo valor de P_i . Se indican las ilustraciones donde se muestran dichos residuos en la figura 30.



Figura 28. Clúster gigante de percolación para la proteína LAO con arginina (Residuos 5-231).

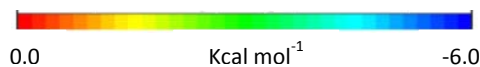
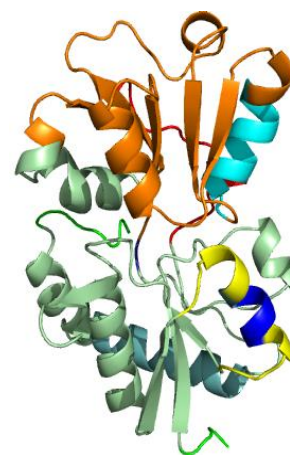


Figura 29. Clúster gigante de percolación para LAO con arginina. Cada color representa un valor de P_i (-0.3, -1.5, -1.8, -2.0, -3.1, -4.0, -4.7, -6.0) de acuerdo a la escala de colores.

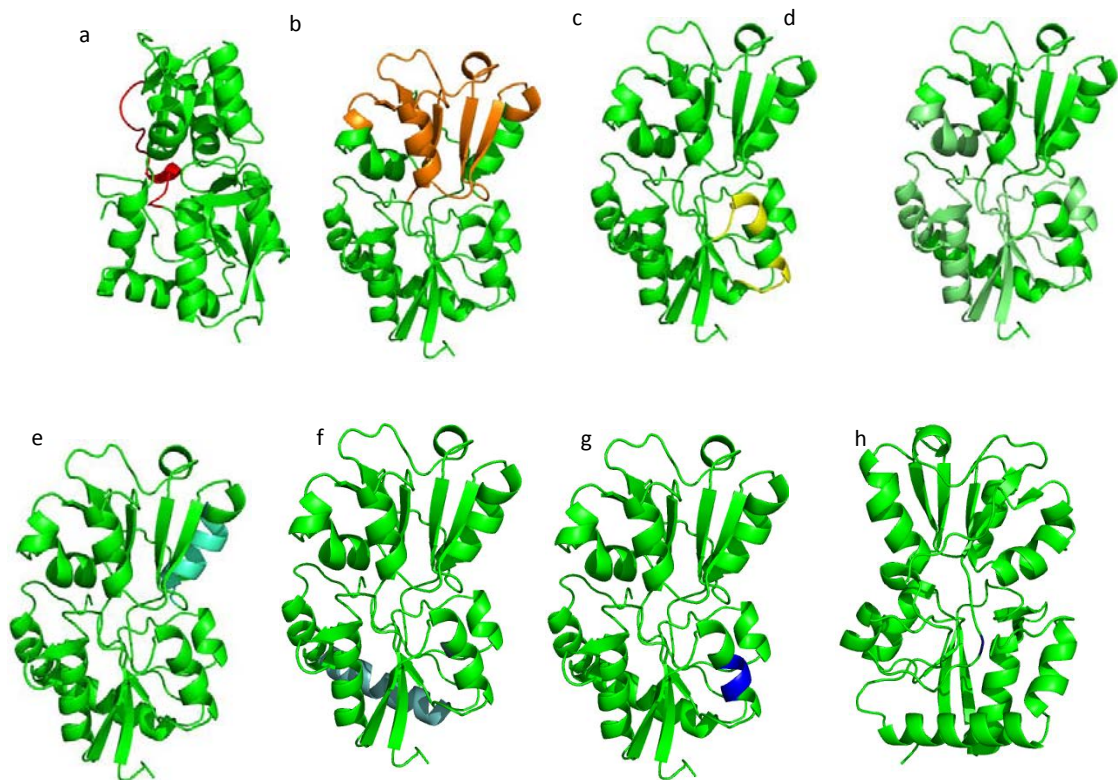


Figura 30. CGP para LAO+arg por zonas. La tabla 5 indica el valor de P_i para cada inciso.

- **Índices locales.**

El gráfico 6 muestra los valores obtenidos durante la desnaturalización térmica para el índice de percolación en LAO arginina. Para esta estructura, podemos observar que existen regiones con valores específicos de P_i que son claramente distinguibles. Dichas zonas o serie de residuos pueden indicar cooperatividad entre sí debido a que se separan conjuntamente del CGP.

Por otra parte, el gráfico 7 muestra los valores obtenidos durante la desnaturalización térmica para el índice de rigidez en LAO con arginina.

La Figura 31 ilustra los valores del R_i para LAO con arginina. Cada inciso muestra una zona coloreada en la estructura proteica la cual se correlaciona con un R_i específico. Así mismo, la tabla 6 indica los valores de R_i para cada residuo.

La figura 32 ilustra los residuos que forman parte del núcleo de desplegamiento, también llamados puntos débiles (color rojo) que son aquellos residuos por donde comienza la desnaturalización de la proteína. En este caso, dicho núcleo abarca ambos lóbulos de la proteína y está formado tanto por estructuras beta plegadas como alfa hélices. Además, la tabla 6 enlista el número de residuo en la proteína y el residuo al que pertenece.

— Beta
— Alfa

Gráfico 6. Índice de percolación para cada residuo de LAO+arg. Las líneas rojas y verdes indican formación de estructuras alfa hélice y hojas beta respectivamente.

— Beta
— Alfa

Gráfico 7. Índices de rigidez para cada residuo de LAO+arg. Las líneas rojas y verdes indican formación de estructuras alfa hélice y hojas beta respectivamente.

| Residuos | R_i |
|---|--|
| 1-4, 232-238/181-194 | 0.0/-0.3 kcal mol ⁻¹ (figura 31a) |
| 89-99, 102, 105-119, 131-143, 154-155, 157-160, 175-177, 179-180 | -1.5 kcal mol ⁻¹ (figura 31b) |
| 50-54, 61-64, 152-153 | -1.8 kcal mol ⁻¹ (figura 31c) |
| 5-14, 17-28, 41-49, 65-77, 81-87, 100, 120, 165, 161-171, 174 , 195-203, 220-227 | -2.0 kcal mol ⁻¹ (figura 31d) |
| 78-80, 228-230 | -2.5 kcal mol ⁻¹ (figura 31e) |
| 101, 121, 144-151, 231 | -3.0 kcal mol ⁻¹ (figura 31f) |
| 15-16, 60, 104, 122-130 | -3.8 kcal mol ⁻¹ (figura 31g) |
| 29-40, 55, 88, 172-173, 204-219 | -4.0 kcal mol ⁻¹ (figura 31h) |
| 56-59, 97, 178 | -5.0 kcal mol ⁻¹ (figura 31i) |
| 103 | -6.0 kcal mol ⁻¹ (figura 31j) |

Tabla 6. Residuos de LAO+arg con sus respectivos valores de R_i. Se indican las ilustraciones que muestran dichos residuos en la figura 31.

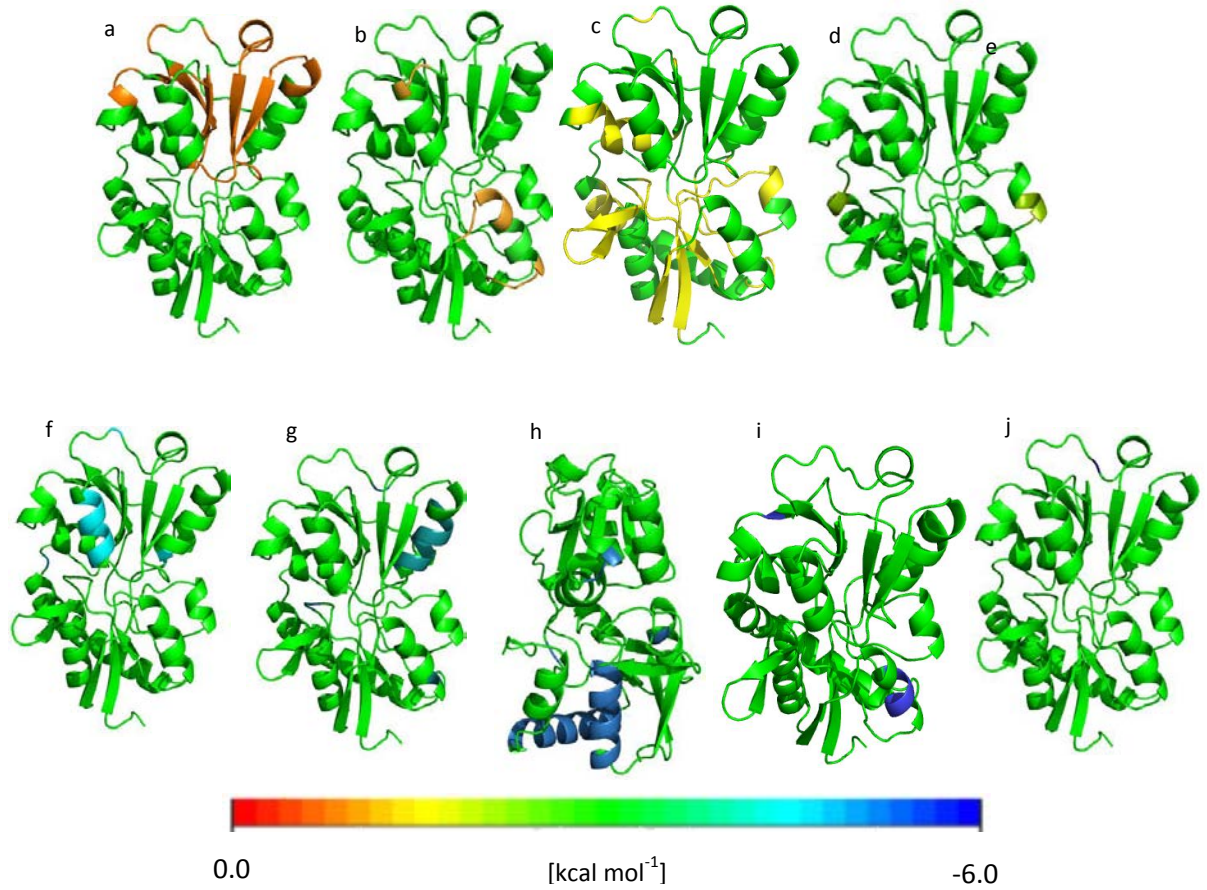


Figura 31. Valores de índice de rigidez para LAO con arginina durante la simulación de la desnaturalización térmica. Los colores se asignan de acuerdo al valor de R_i en la escala de colores.



Figura 32. Núcleo de desplegamiento para LAO con arginina. Los residuos que forman parte del núcleo se muestran en color rojo.

| No. Residuo | Residuo | No. Residuo | Residuo | No. Residuo | Residuo |
|-------------|---------|-------------|---------|-------------|---------|
| 5 | THR | 44 | LYS | 163 | VAL |
| 6 | VAL | 45 | CYS | 164 | ALA |
| 7 | ARG | 46 | THR | 165 | ALA |
| 8 | ILE | 47 | TRP | 166 | SER |
| 9 | GLY | 48 | VAL | 167 | GLU |
| 10 | THR | 49 | ALA | 168 | GLY |
| 11 | ASP | 66 | ALA | 169 | PHE |
| 12 | THR | 67 | ILE | 170 | LEU |
| 13 | THR | 68 | ILE | 171 | LYS |
| 14 | TYR | 69 | SER | 174 | ALA |
| 17 | PHE | 70 | SER | 196 | GLY |
| 18 | SER | 73 | ILE | 197 | VAL |
| 19 | SER | 74 | THR | 198 | GLY |
| 20 | LYS | 75 | ASP | 199 | LEU |
| 21 | ASP | 76 | LYS | 200 | ARG |
| 22 | ALA | 77 | ARG | 201 | LYS |
| 23 | LYS | 81 | ILE | 202 | ASP |
| 24 | GLY | 82 | ALA | 203 | ASP |
| 25 | GLU | 83 | PHE | 220 | ASP |
| 26 | PHE | 84 | SER | 221 | GLY |
| 27 | ILE | 85 | ASP | | |
| 28 | GLY | 86 | LYS | | |
| 41 | MET | 87 | LEU | | |
| 42 | GLN | 161 | ASP | | |
| 43 | VAL | 162 | GLU | | |

Tabla 7. Indica los residuos que forman parte del núcleo de desplegamiento en la proteína LAO con arginina.

La proteína LAO con histidina.

- **Índices globales.**

Se muestran los gráficos de P y H para LAO con histidina como ligando. El valor de T_m para H es de 336.99 K (63.84 °C) mientras que para P es de 336.95 K (63.80 °C). La T_m obtenida experimentalmente a pH=8 y utilizando como buffer Bis-Tris Propano es de 330 K (56.85 °C). En este caso, los valores de T_m in silico varían aproximadamente 6 K en comparación con el valor obtenido experimentalmente.

Gráfico 8. Valores de H para cada residuo de la proteína LAO+his.

Gráfico 9. Valores de P para cada residuo de LAO+his. La línea roja indica el valor de T_m en el eje de las abscisas.

| Parámetro | T _m (°C) |
|--------------|---------------------|
| H | 63.84 |
| P | 63.80 |
| Experimental | 56.85 |

Tabla 8. Valores de T_m para LAO+his. Los valores de T_m para H y P se obtuvieron de la simulación de la desnaturalización térmica. El valor de T_m experimental se obtuvo a pH=8 en buffer Bis-Tris Propano.

El clúster gigante de percolación para la proteína LAO con histidina abarca ambos lóbulos (figura 33). Además, en la figura 34 se observan los diferentes valores de P_i para LAO con histidina, los cuales se representan en colores de acuerdo a la escala de valores de energía.

La figura 35 y la Tabla 9 muestran las diferentes regiones del CGP con su respectivo P_i . Los residuos que requirieron menor energía para dejar de formar parte del CGP en LAO sin ligando (residuos 19-27, $P_i = -0.3 \text{ kcal mol}^{-1}$; residuos 5, 50-54, $P_i = -0.8 \text{ kcal mol}^{-1}$) requirieron mayor energía para LAO con histidina (ver Tabla 9).

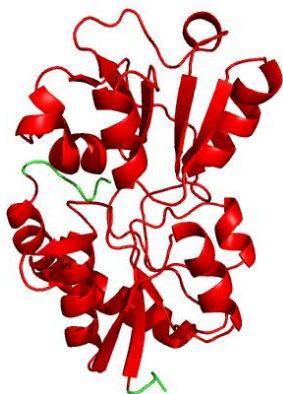


Figura 33. CGP para LAO+his. Los residuos que forman parte del mismo se muestran de color rojo (residuos 5-231).

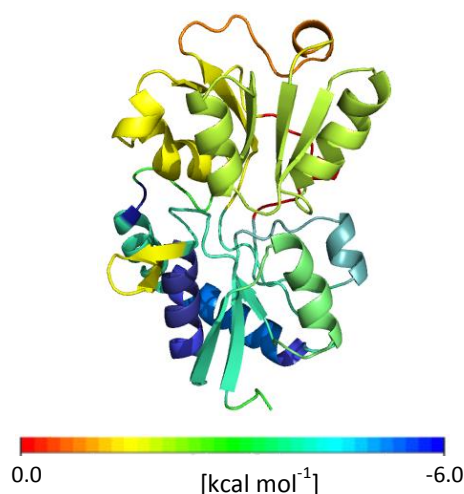


Figura 34. CGP para LAO+his. Se muestran los residuos coloreados por regiones de acuerdo al valor de P_i y a la escala de colores.

| Residuos | P_i |
|---|--|
| 185-194 | -0.2 kcal mol ⁻¹ (figura 35a) |
| 98-109 | -0.5 kcal mol ⁻¹ (figura 35b) |
| 89-97, 162-184, 19-27, 110-112 | -1.0 kcal mol ⁻¹ (figura 35c) |
| 113-161 | -1.4 kcal mol ⁻¹ (figura 35d) |
| 50-63 | -1.6 kcal mol ⁻¹ (figura 35e) |
| 5-18, 28, 41-49, 65-69, 81-88, 196-203, 220-229 | -1.8 kcal mol ⁻¹ (figura 35f) |
| 38-40, 217-219, 204-205 | -3.0 kcal mol ⁻¹ (figura 35g) |
| 206-216 | -4.4 kcal mol ⁻¹ (figura 35h) |
| 29-37 | -4.8 kcal mol ⁻¹ (figura 35i) |
| 230-231 | -6.0 kcal mol ⁻¹ (figura 35j) |

Tabla 9. Residuos de LAO+his con su respectivo valor de P_i . Se indican las ilustraciones donde se muestran dichos residuos en la figura 35.

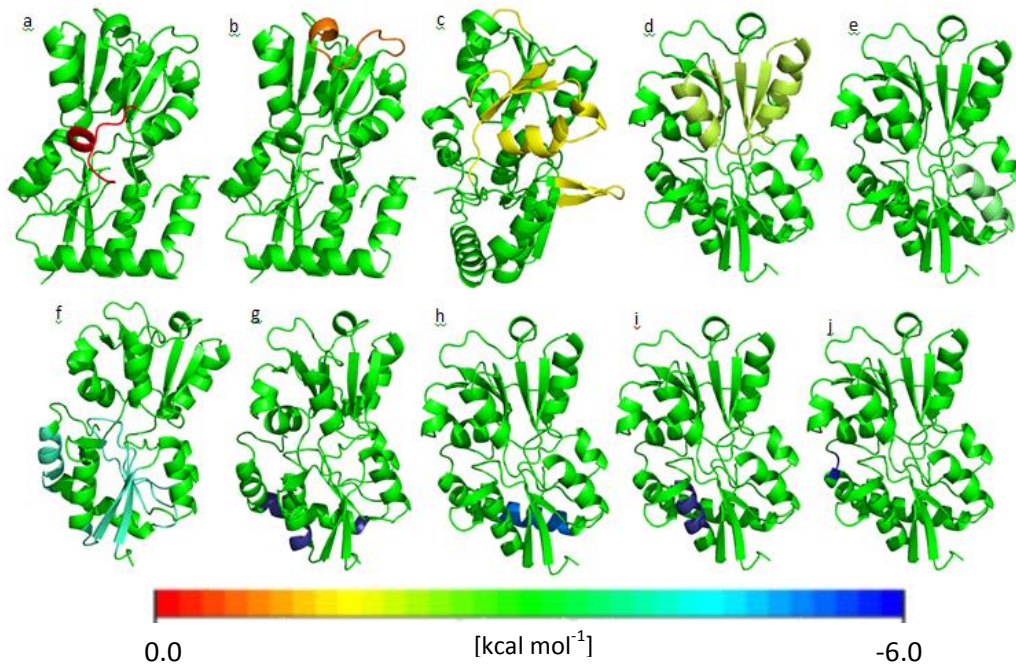


Figura 35. CGP para LAO+his coloreados de acuerdo a su valor de P_i (ver escala de colores). La tabla 7 indica el valor de P_i para cada inciso.

- **Índices locales.**

El gráfico 10 muestra los valores obtenidos durante la desnaturalización térmica para el índice de percolación en LAO con histidina, mientras que el gráfico 11 ilustra los valores obtenidos para el índice de rigidez.

La figura 36 ilustra los valores del R_i para LAO con histidina. Cada inciso muestra una zona coloreada en la estructura proteica, la cual se correlaciona dependiendo de su valor de R_i . Así mismo, la Tabla 9 indica los valores de R_i para cada residuo.

Finalmente, la figura 37 ilustra los residuos que forman parte del núcleo de desplegamiento, es decir, aquellos residuos por donde comienza la desnaturalización de la proteína. El núcleo abarca el lóbulo discontinuo de la proteína y está formado por estructuras beta plegadas principalmente.

— Beta
— Alfa

Gráfico 10. Índice de percolación para cada residuo de LAO+his. Las líneas rojas y verdes indican formación de estructuras alfa hélice y hojas beta respectivamente.

— Beta
— Alfa

Gráfico 11. Índices de rigidez para cada residuo de LAO+his. Las líneas rojas y verdes indican formación de estructuras alfa hélice y hojas beta respectivamente.

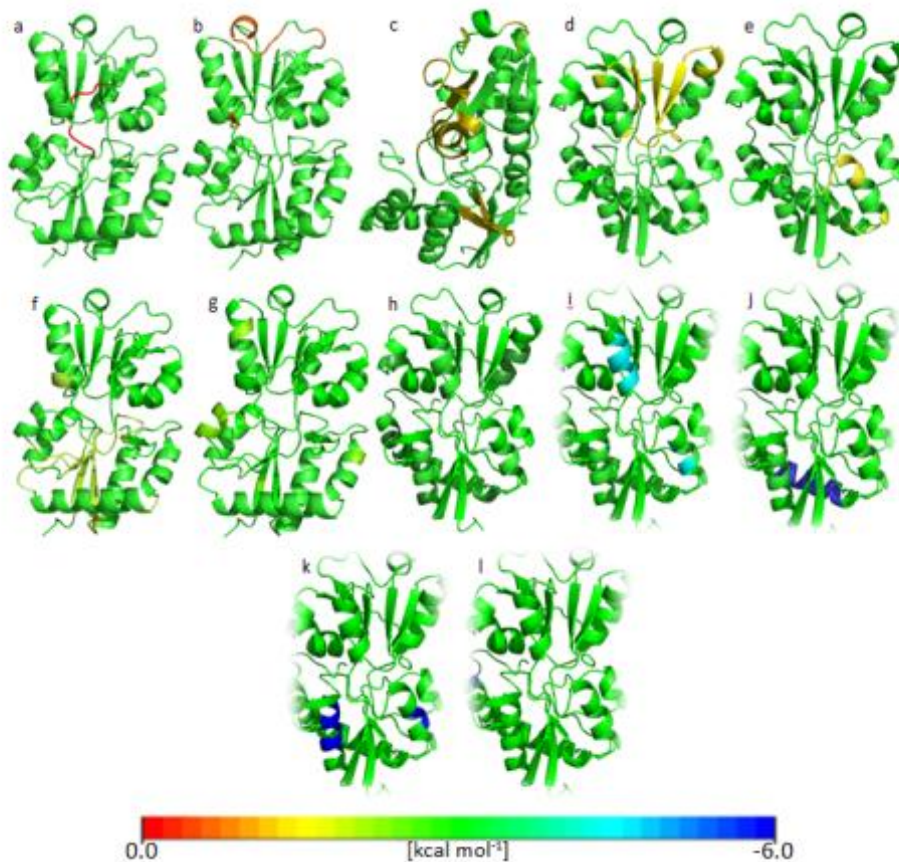


Figura 36. Valores de índice de rigidez para LAO+his durante la simulación de la desnaturalización térmica. Los colores se asignan de acuerdo al valor de R_i en la escala de colores.

| Residuos | R_i |
|--|--|
| 185-187, 192-194 | -0.2 kcal mol ⁻¹ (figura 36a) |
| 98-99, 102-109, 191 | -0.5 kcal mol ⁻¹ (figura 36b) |
| 19-27, 89-96, 100-101, 110-112, 161-171, 175-184 | -1.0 kcal mol ⁻¹ (figura 36c) |
| 113-120, 131-143, 152-155, 157-160 | -1.4 kcal mol ⁻¹ (figura 36d) |
| 50-54, 61-64 | -1.6 kcal mol ⁻¹ (figura 36e) |
| 5-18, 28, 41-49, 66-69, 81-88, 188-190, 196-203, 220-221 | -1.8 kcal mol ⁻¹ (figura 36f) |
| 7, 65, 73-80, 129-130, 228-229 | -2.0 kcal mol ⁻¹ (figura 36g) |
| 39-40, 60, 70, 122-128, 174, 195, 204-205, 231, 144, 151, 217-219, 222-227 | -3.0 kcal mol ⁻¹ (figura 36h) |
| 55, 58-59, 145-150, 172 | -3.6 kcal mol ⁻¹ (figura 36i) |
| 206-216 | -4.4 kcal mol ⁻¹ (figura 36j) |
| 29-37, 56-57, 173 | -4.8 kcal mol ⁻¹ (figura 36k) |
| 230 | -6.0 kcal mol ⁻¹ (figura 36l) |

Tabla 10. Residuos de LAO con histidina con sus respectivos valores de R_i . Se indican las ilustraciones que muestran dichos residuos en la figura 36.

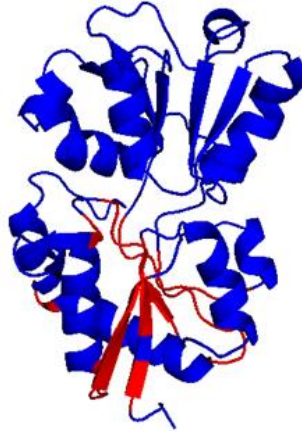


Figura 37. Núcleo de desplegamiento para LAO con histidina. Los residuos que forman parte del núcleo se muestran en color rojo.

La proteína ArtJ con arginina.

- **Índices globales.**

Los gráficos 12 y 13 muestran los parámetros H y P respectivamente para la proteína Art J con histidina. Se puede observar en cada uno que la T_m para H es de 356.49 K (83.34 °C), mientras que para P es de 329.04 K (55.89 °C) (ver Tabla 10). A diferencia de LAO, para Art J no se tienen datos experimentales sobre la T_m .

Gráfico 12. Valores de H para cada residuo de la proteína ArtJ+arg durante la simulación térmica. El valor de T_m está indicado por la intersección de la línea roja en el eje de las abscisas.

| Parámetro | T _m (°C) |
|-----------|---------------------|
| H | 83.34 |
| P | 55.89 |

Tabla 11. Valores de T_m para Art+his. Los valores de T_m para H y P se obtuvieron de la simulación de la desnaturalización térmica.

Gráfico 13. Valores de P para cada residuo de Art J+arg. La línea roja indica el valor de T_m en el eje de las abscisas.

El CGP para Art J con arginina está formado por ambos lóbulos de la proteína (Figura 38). La figura 38 ilustra el CPG por zonas, las cuales están coloreadas de acuerdo a su valor energético. Por último, la Tabla 12 indica los residuos de la proteína que forman parte del CGP con su respectivo P_i.



Figura 38. CGP para Art J con arginina. Los residuos que forman parte del mismo se muestran de color rojo.

| Residuos | P_i |
|---|--|
| 136-138, 185-192 | -0.5 kcal mol ⁻¹ (figura 39a) |
| 13-15, 27-32, 47-53, 67-72, 96-135, 141-184, 193 | -1.4 kcal mol ⁻¹ (figura 39b) |
| 79-87, 201-205 | -2.1 kcal mol ⁻¹ (figura 39c) |
| 206-220 | -2.4 kcal mol ⁻¹ (figura 39d) |
| 16-26, 33-46, 54-57, 73-74, 88-95, 193-200, 221-230 | -2.8 kcal mol ⁻¹ (figura 39e) |
| 65, 75-76 | -3.0 kcal mol ⁻¹ (figura 39f) |
| 58-64 | -3.6 kcal mol ⁻¹ (figura 39g) |
| 77-78 | -4.9 kcal mol ⁻¹ (figura 39h) |

Tabla 12. Residuos del CPG para Art J+arg con su respectivo valor de P_i . Se indican las ilustraciones donde se muestran dichos residuos en la figura 39.

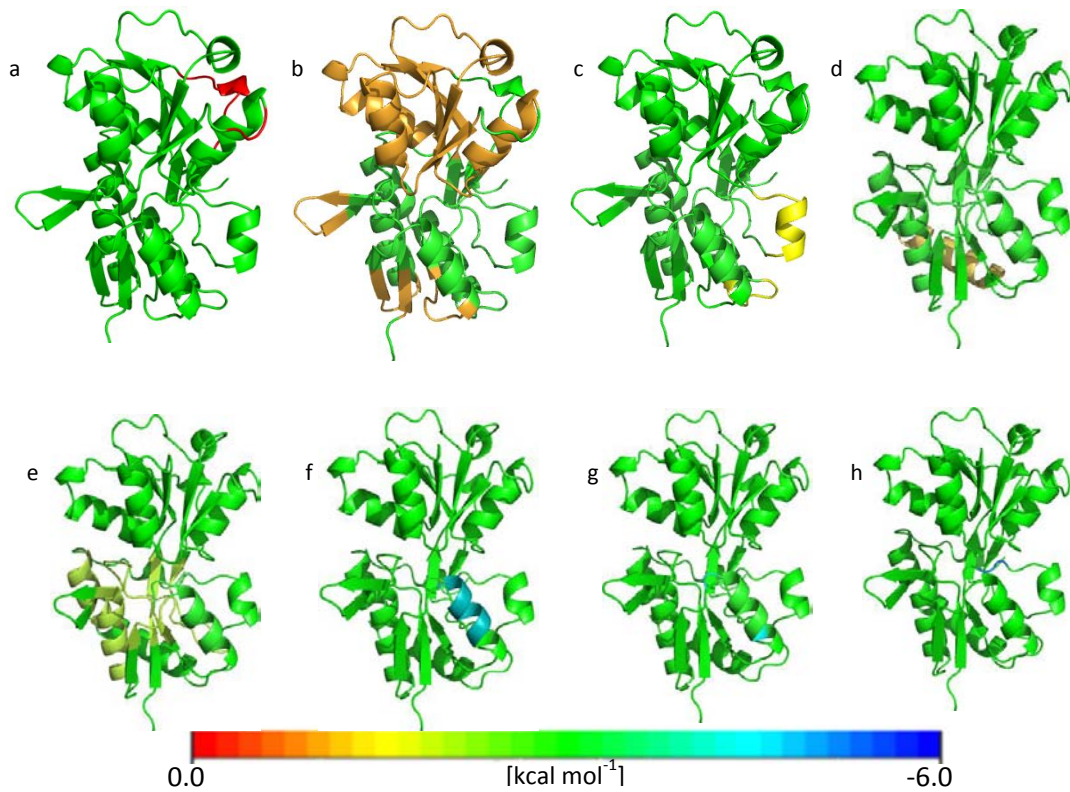


Figura 39. CPG para Art J+arg coloreados de acuerdo a su valor de P_i (ver escala de colores). La tabla indica el valor de P_i para cada inciso.

- **Índices locales.**

El gráfico 14 muestra los valores obtenidos durante la desnaturalización térmica para el índice de percolación en Art J con arginina, mientras que el gráfico 15 ilustra los valores obtenidos para el índice de rigidez.

La figura 40 ilustra los valores del R_i para Art J con arginina. Cada inciso muestra una zona coloreada en la estructura proteica, la cual se correlaciona dependiendo de su valor de R_i . Así mismo, la Tabla 13 indica los valores de R_i para cada residuo.

Por último, la figura 41 ilustra los “puntos débiles” que forman parte del núcleo de desplegamiento, es decir, aquellos residuos por donde comienza la desnaturalización de la proteína. Los “puntos débiles” están en el lóbulo discontinuo de la proteína y está formado por estructuras beta plegadas.

Grafico 14. Índice de percolación para cada residuo de Art J+arg durante la simulación térmica.

Grafico 15. Índices de rigidez para cada residuo de Art J+arg durante la simulación térmica.

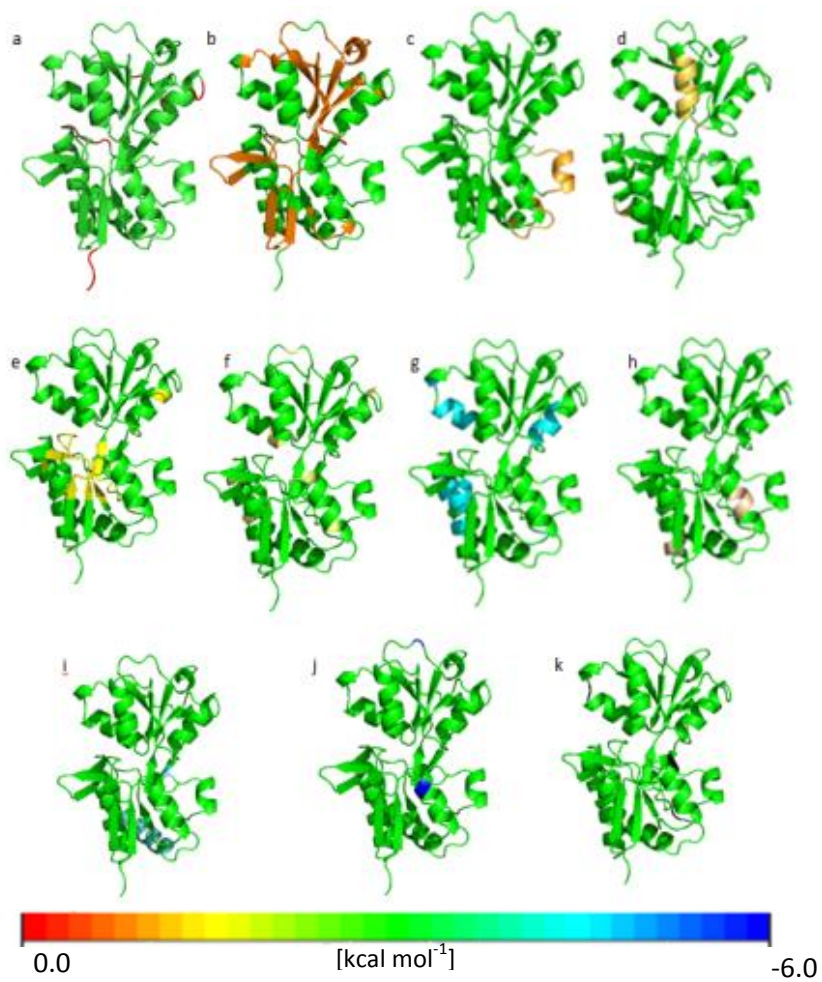


Figura 40. Valores de índice de rigidez para Art J+arg durante la simulación de la desnaturalización térmica. Los colores se asignan de acuerdo al valor de R_i en la escala de colores.

| Residuos | R_i |
|--|--|
| 136-138, 185-186, 190-192 | -0.5 kcal mol ⁻¹ (figura 40a) |
| 6-8, 13-15, 27-32, 47-57, 67-72, 96-105, 108-124, 133, 141-145, 156-165, 179-184, 188-189, 236-238 | -1.4 kcal mol ⁻¹ (figura 40b) |
| 66, 79-87, 201-205 | -2.1 kcal mol ⁻¹ (figura 40c) |
| 146-155, 218-220 | -2.4 kcal mol ⁻¹ (figura 40d) |
| 16-26, 33, 54-57, 73-75, 88-90, 93-95, 125, 132, 195-198 | -2.8 kcal mol ⁻¹ (figura 40e) |
| 58, 65, 76, 106, 135, 166-169, 221, 227-228 | -3.2 kcal mol ⁻¹ (figura 40f) |
| 44-46, 61-64 | -3.6 kcal mol ⁻¹ (figura 40g) |
| 35-43, 126-131, 170-175, 177, 200, 222-227 | -4.0 kcal mol ⁻¹ (figura 40h) |
| 34, 78, 91-92, 194, 206-217 | -4.4 kcal mol ⁻¹ (figura 40i) |
| 60, 77, 107 | -4.8 kcal mol ⁻¹ (figura 40j) |
| 59, 176, 199 | -6.0 kcal mol ⁻¹ (figura 40k) |

Tabla 13. Residuos de Art J+arg con sus respectivos valores de R_i . Se indican las ilustraciones que muestran dichos residuos en la figura 40.

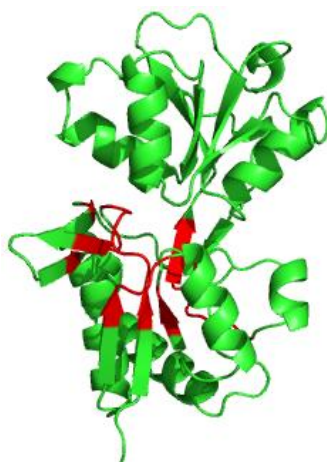


Figura 41. Núcleo de desplegamiento para Art J+arg. Los residuos (“weak spots”) que forman parte del núcleo se muestran en color rojo.

| No. Residuo | Residuo | No. Residuo | Residuo |
|-------------|---------|-------------|---------|
| 1 | GLY | 15 | GLY |
| 2 | THR | 16 | GLY |
| 3 | ASP | 17 | ILE |
| 4 | ALA | 18 | ASP |
| 5 | ALA | 19 | PHE |
| 6 | PHE | 20 | SER |
| 7 | ALA | 21 | TYR |
| 8 | PHE | 22 | PHE |
| 9 | GLU | 23 | GLU |
| 10 | TYR | 24 | TYR |
| 11 | VAL | 25 | GLY |
| 12 | LYS | 26 | MET |
| 13 | ASN | 27 | ILE |
| 14 | ILE | 28 | PHE |

Tabla 14. Indica los residuos que forman parte del núcleo de desplegamiento en Art J+arg.

La proteína Art J con histidina.

- **Índices globales.**

A continuación se muestran los parámetros H y P para la proteína Art J con histidina. Se observa que la T_m para H es de 325.15 K (52 °C) (gráfico 16 y Tabla 15), mientras que para P es de 324.84 K (51.69 °C) (gráfico 17 y Tabla 15). Tampoco se cuenta con datos experimentales sobre la T_m de esta proteína.

Grafico 16. Valores de H para cada residuo de la proteína ArtJ con histidina durante la simulación térmica. El valor de T_m está indicado por la intersección de la línea roja en el eje de las abscisas.

| Parámetro | T_m (°C) |
|-----------|------------|
| H | 52 |
| P | 51.69 |

Tabla 15. Valores de T_m para Art J con histidina. Los valores de T_m para H y P se obtuvieron de la simulación de la desnaturalización térmica.

Grafico 17. Valores de P para cada residuo de Art J con histidina durante la simulación térmica. La línea roja indica el valor de T_m en el eje de las abscisas.

El CGP para Art J con histidina está formado por ambos lóbulos de la proteína (Figura 42), a excepción de una alfa hélice del lóbulo discontinuo. La figura 43 ilustra el CPG por zonas, las cuales están coloreadas de acuerdo a su valor energético. Por último, la Tabla 16 indica los residuos de la proteína que forman parte del CGP con su respectivo P_i .



Figura 42. CGP para Art J con histidina. Los residuos que forman parte del mismo se muestran de color rojo.

| Residuos | P _i |
|---|--|
| 37-42, 118-128, 143-145, 149-150, 195-202, 241-243. | -0.5 kcal mol ⁻¹ (figura 43a) |
| 23-30, 43, 57-67, 77-117, 133-142, 172-175, 188-194, 203-240, 244 | -1.2 kcal mol ⁻¹ (figura 43b) |
| 68-76, 129-132, 151-171 | -1.6 kcal mol ⁻¹ (figura 43c) |
| 44-56 | -1.8 kcal mol ⁻¹ (figura 43d) |
| 176-187 | -2.6 kcal mol ⁻¹ (figura 43e) |
| 31-36 | -6.0 kcal mol ⁻¹ (figura 43f) |

Tabla 16. Residuos de Art J con histidina con su respectivo valor de P_i. Se indican las ilustraciones donde se muestran dichos residuos en la figura 43.

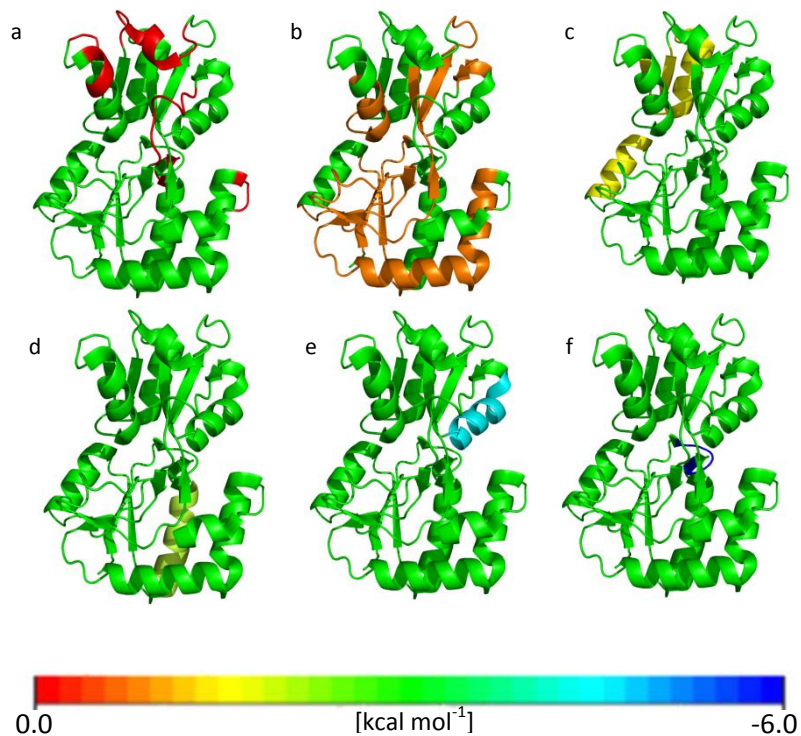


Figura 43. CPG por zonas para Art J+his. Las zonas de la proteína están coloreadas de acuerdo a su valor energético (ver escala de colores).

- **Índices locales.**

El gráfico 18 muestra los valores obtenidos durante la desnaturalización térmica para el índice de percolación en Art J con histidina, mientras que el gráfico 19 ilustra los valores obtenidos para el índice de rigidez. La figura 44 ilustra los valores del R_i para Art J con

histidina. Cada inciso muestra una zona coloreada en la estructura proteica, la cual se correlaciona dependiendo de su valor de R_i . Así mismo, la Tabla 17 indica los valores de R_i para cada residuo.

Por último, la figura 45 ilustra los “puntos débiles” que forman parte del núcleo de desplegamiento, es decir, aquellos residuos por donde comienza la desnaturalización de la proteína. Los “puntos débiles” se encuentran en ambos lóbulos de la proteína y está formado por estructuras beta plegadas.

Gráfico 18. Valores de P_i en Art J con histidina para cada residuo durante la simulación de la desnaturalización térmica.

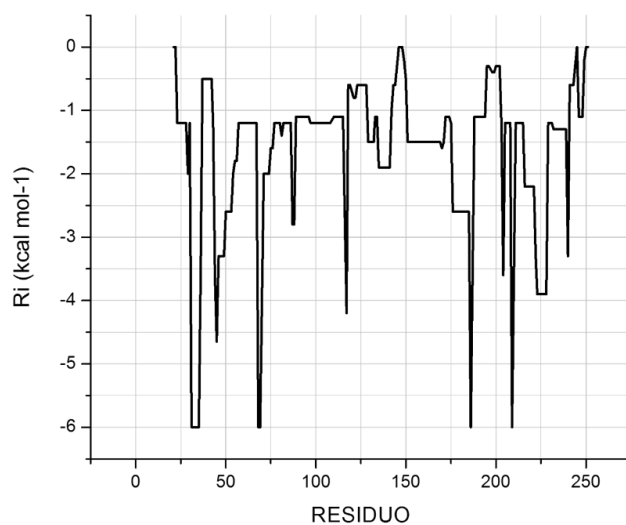


Gráfico 19. Valores de R_i en Art J con histidina para cada residuo durante la simulación de la desnaturalización térmica.

| Residuos | R_i |
|--|--|
| 1-2, 126-128, 225, 230-231 | -0.0 kcal mol ⁻¹ (figura 44a) |
| 229, 129, 224, 175-182, 125 | -0.3 kcal mol ⁻¹ (figura 44b) |
| 17-22, 130 | -0.5 kcal mol ⁻¹ (figura 44c) |
| 221-223, 98-108, 122-124, 226-228, 168-174, 152-154, 113-114, 89-95, 69-76 | -1.0 kcal mol ⁻¹ (figura 44d) |
| 209-219, 3-8, 10, 23, 37-47, 77-88, 155, 183, 185-188, 191-195, 57-66 | -1.2 kcal mol ⁻¹ (figura 44e) |
| 109-112, 131-151 | -1.5 kcal mol ⁻¹ (figura 44f) |
| 35-36, 55-56 | -1.8 kcal mol ⁻¹ (figura 44g) |
| 115-121, 9, 34, 51-54, 196-201 | -2.0 kcal mol ⁻¹ (figura 44h) |
| 67-68, 96, 30-33, 156-165 | -2.6 kcal mol ⁻¹ (figura 44i) |
| 26-29, 202, 220 | -3.3 kcal mol ⁻¹ (figura 44j) |
| 167, 184, 190, 16, 24, 203-208 | -3.7 kcal mol ⁻¹ (figura 44k) |
| 25, 97, 50 | -4.0 kcal mol ⁻¹ (figura 44l) |
| 11-15, 48-49, 166, 189 | -6.0 kcal mol ⁻¹ (figura 44m) |

Tabla 17. Índices de rigidez (R_i) con sus respectivos residuos para Art J+his. La tabla indica el inciso que corresponde a dichos residuos en la Figura 44.

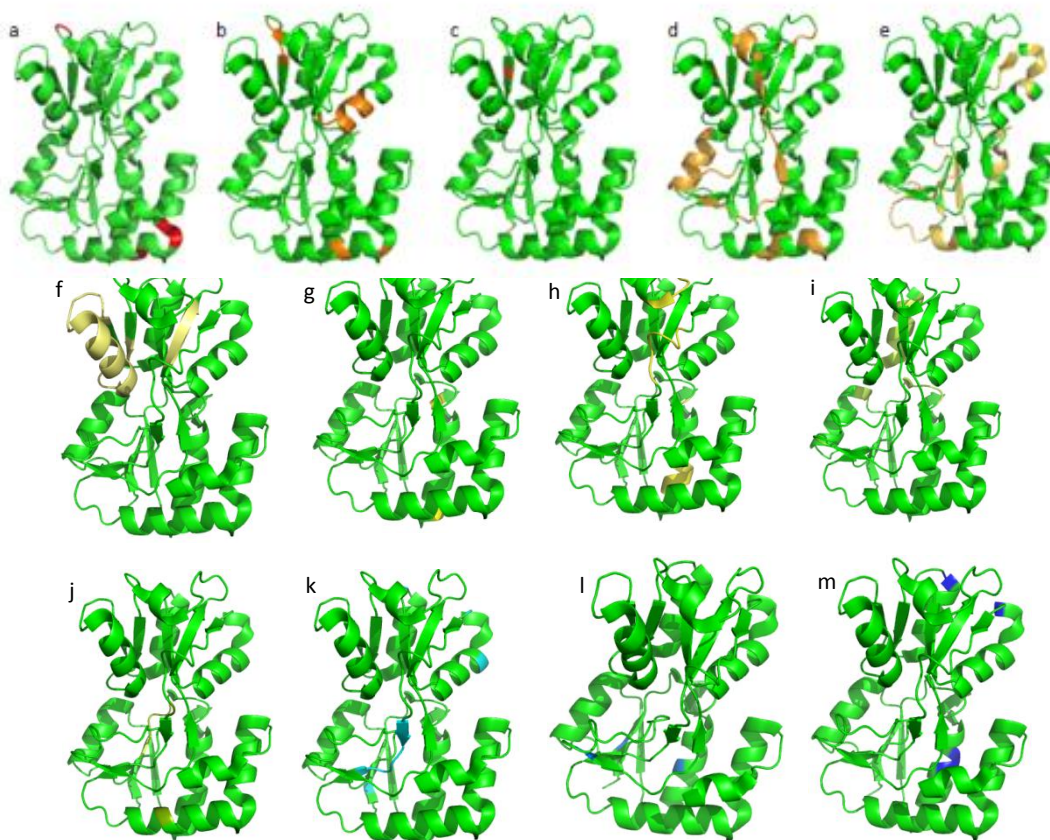


Figura 44. Valores de índice de rigidez para Art J con histidina durante la simulación de la desnaturalización térmica. Los colores se asignan de acuerdo al valor de R_i en la escala de colores.

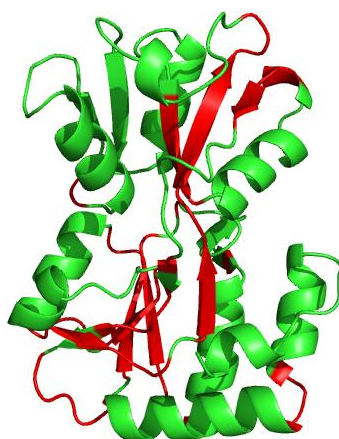


Figura 45. Núcleo de desplegamiento para Art J con histidina. Los residuos que forman parte del núcleo se muestran en color rojo.

| No. Residuo | Residuo | No. Residuo | Residuo | No. Residuo | Residuo |
|-------------|---------|-------------|---------|-------------|---------|
| VAL | 23 | GLY | 83 | VAL | 172 |
| VAL | 24 | ILE | 84 | ILE | 173 |
| VAL | 25 | SER | 85 | THR | 174 |
| GLY | 26 | GLY | 86 | ASP | 175 |
| THR | 27 | TYR | 97 | ASN | 188 |
| ASP | 28 | ASP | 98 | LYS | 189 |
| ALA | 30 | PHE | 99 | LYS | 190 |
| VAL | 43 | SER | 100 | LEU | 191 |
| ALA | 57 | ASP | 101 | GLN | 192 |
| GLY | 58 | TYR | 103 | VAL | 193 |
| LEU | 59 | PHE | 104 | ILE | 194 |
| ASP | 60 | GLU | 105 | GLU | 203 |
| TYR | 61 | ALA | 106 | TYR | 205 |
| GLU | 62 | THR | 107 | GLY | 206 |
| LEU | 63 | GLN | 108 | MET | 207 |
| LYS | 64 | VAL | 109 | ILE | 208 |
| ASN | 65 | ILE | 110 | LYS | 211 |
| ILE | 66 | LEU | 111 | ASN | 212 |
| GLY | 67 | VAL | 112 | SER | 213 |
| SER | 77 | LYS | 113 | GLU | 214 |
| LYS | 78 | GLN | 114 | LEU | 215 |
| GLU | 79 | GLY | 115 | SER | 229 |
| VAL | 80 | ASN | 133 | GLY | 230 |
| MET | 82 | ALA | 134 | LYS | 231 |

Tabla 18. Indica los residuos que forman parte del núcleo de desplegamiento en Art J con histidina.

Cambios de rigidez/flexibilidad: LAO sin ligando vs LAO con ligando.

A continuación se muestran los cambios de rigidez y flexibilidad que LAO en estado abierto tuvo a lo largo de su estructura en comparación del estado cerrado.

- **LAO sin ligando y LAO con arginina.**

Se restaron los valores de P_i de LAO sin ligando a los valores de P_i de LAO con arginina. Valores positivos en la sustracción indican que la proteína LAO sin ligando es más flexible en esas regiones que LAO con arginina (figura 46, zonas en color rojo), mientras que los valores negativos indican que dichos residuos son más rígidos en LAO sin ligando que en LAO con arginina (figura 46, color azul).

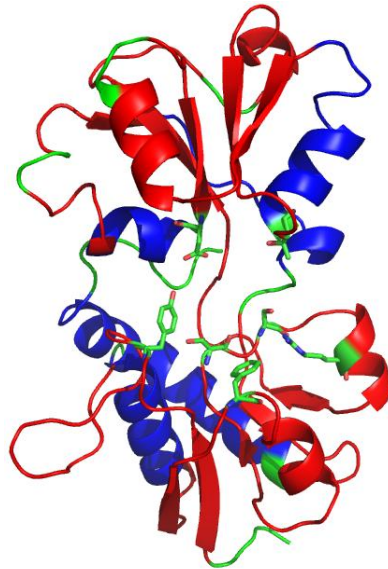


Figura 46. Estructura de la proteína LAO sin ligando que muestra las zonas más rígidas (color azul) y las zonas más flexibles (color rojo) en comparación con la proteína LAO con arginina.

- **LAO sin ligando y LAO con histidina.**

Se llevó a cabo con el mismo proceso de sustracción para LAO en estado abierto y LAO con histidina. Los residuos con valores positivos se muestran en la figura 47 coloreados de rojo, indicado que LAO sin ligando es más flexible en esas regiones en comparación de LAO con histidina, mientras que los valores negativos señalan que los residuos en color azul son más rígidos en LAO sin ligando que en LAO con histidina.

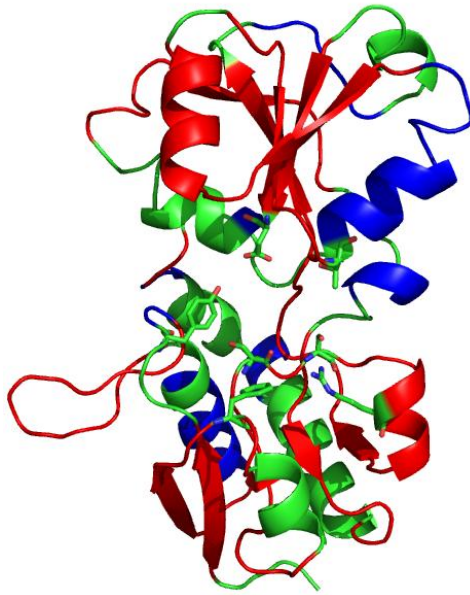


Figura 47. Estructura de la proteína LAO sin ligando que muestra las zonas más rígidas (color azul) y las zonas más flexibles (color rojo) en comparación con la proteína LAO con histidina.

- **LAO con arginina y LAO con histidina.**

A los valores de P_i para LAO con arginina se restaron los de LAO histidina, obteniendo la diferencia para cada residuo. Los valores positivos indican que dicha región en LAO con arginina es más flexible con respecto a LAO con histidina (color rojo, figura 48) mientras que los valores negativos son más rígidos en LAO con arginina que en LAO con histidina (color azul, figura 48).

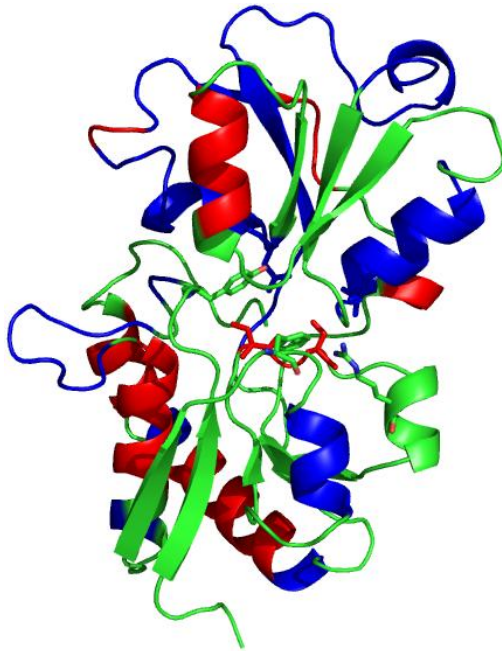


Figura 48. Estructura de la proteína LAO+arg que muestra las zonas más rígidas (color azul) y las zonas más flexibles (color rojo) en comparación con la proteína LAO+his.

- **LAO arginina y Art J con arginina.**

Utilizando los valores de P_i para LAO con arginina y Art J con arginina se restaron los valores de la segunda a la primera, obteniendo la diferencia para cada residuo. Los valores positivos indican que dicha región en la proteína LAO con arginina es más rígida con respecto a Art J (color rojo), mientras que los valores negativos son más rígidos en LAO con arginina que en Art J (color azul). Lo anterior se muestra en la figura 49.

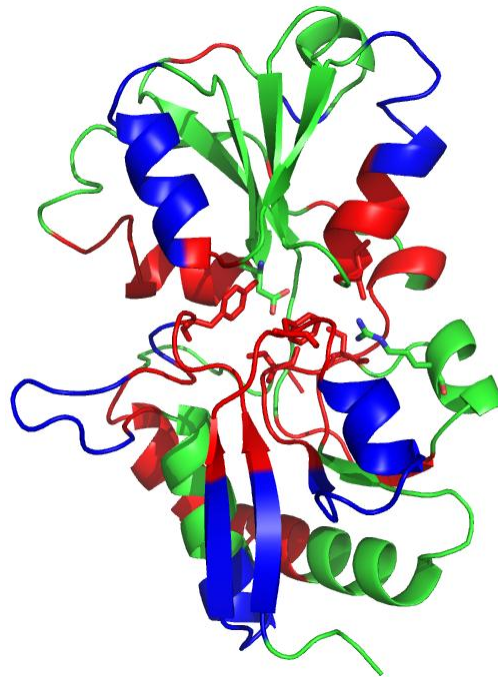


Figura 49. Estructura de la proteína LAO con arginina que muestra las zonas más rígidas (color azul) y las zonas más flexibles (color rojo) en comparación con la proteína ArtJ con arginina.

- **LAO con histidina y Art J con histidina.**

El mismo proceso de sustracción para LAO y Art J con arginina se llevó a cabo con LAO y Art J con histidina. Los residuos con valores positivos se muestran en la figura 50 coloreados de rojo, indicado que LAO con histidina es más flexible en esas regiones en comparación de Art J con histidina, mientras que los valores negativos señalan que los residuos en color azul son más rígidos en LAO con histidina que en Art J con histidina.

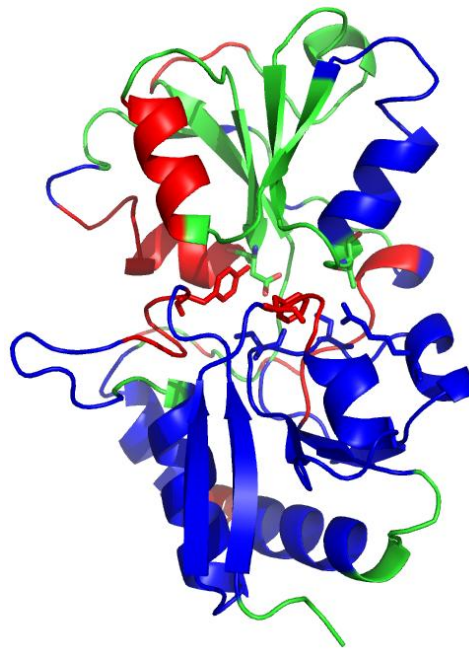


Figura 50. Estructura de la proteína LAO con histidina que muestra las zonas más rígidas (color azul) y las zonas más flexibles (color rojo) en comparación con la proteína ArtJ con histidina.

Discusión.

Se observó que para LAO en ausencia de ligando el clúster gigante de percolación (CGP) está formado sólo por el lóbulo discontinuo, lo cual sugiere que no existe cooperatividad entre ambos dominios durante el proceso de desnaturalización. En cambio cuando se presenta ligando se observa que el CPG está formado por los dos lóbulos.

En el CGP para LAO sin ligando se puede observar que la zona más flexible (figura 24) está formada por los residuos 19-27 ($p_i = -0.3 \text{ kcal mol}^{-1}$); dichos residuos forman parte del asa que hace interacción con el translocador en la membrana plasmática. En contraste, una de las zonas más rígidas (Figura 25) es contigua y está formada por una α -hélice (N-terminal) donde se encuentra la cisteína 38 ($p_i = -4.6 \text{ kcal mol}^{-1}$) que forma un puente disulfuro con la cisteína 45 ($p_i = -1.4 \text{ kcal mol}^{-1}$) y es parte de una hebra β . Es probable que dicha zona sea muy rígida debido al puente disulfuro, sin embargo, la cisteína 45 se encuentra en una región más flexible; lo anterior indica que la rigidez en la α -hélice es propia de la estructura y no debido al puente disulfuro.

En cuanto al gráfico de entropía se observó que la proteína LAO sin ligando tiene tres pasos principales durante la simulación de la desnaturalización térmica, mostrando a 56°C la inhabilidad de la estructura para soportar el estrés térmico, se observa en este punto su transición del estado plegado a desplegado.

El índice de rigidez para LAO sin ligando hace sentido con el CPG y muestra que la zona más flexible está formada por los residuos 19-27 (Figura 26), mientras que la zona más rígida está formada por los residuos 32-40. La prolina 16 es uno de los residuos con mayor rigidez ($r_i = -6.0 \text{ kcal mol}^{-1}$), se sabe, por estudios realizados en nuestro laboratorio, que dicho residuo es de suma importancia para la estabilidad de la proteína.

Por otra parte, las hélices formadas por los residuos 222-228 ($r_i = -3.4 \text{ kcal mol}^{-1}$, hélice 10) y 207-219 ($r_i = -4.7 \text{ kcal mol}^{-1}$, hélice 9) con un índice de rigidez medio y alto respectivamente, interactúan con la hélice 1 ($r_i = -5.2 \text{ kcal mol}^{-1}$), lo anterior sugiere que dichas regiones son importantes para mantener la estabilidad en la proteína dado que se encuentran en los extremos del lóbulo discontinuo.

Los residuos del sitio de unión (11, 14, 52, 70, 72, 77, 121 y 161) se encuentran en zonas flexibles, cuyos valores de R_i fluctúan entre $-0.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ y $-1.7 \text{ kcal mol}^{-1}$. Lo anterior indica que dichos residuos requieren de cierto grado de libertad para poder llevar a cabo su función.

De manera general, las hojas β -plegada requieren de menor energía para perder sus contactos en comparación con las α -hélice en la estructura de LAO sin ligando.

El núcleo de desplegamiento propuesto por CNA está formado casi en su totalidad por la hoja β -plegada que es parte del lóbulo discontinuo. Los residuos del sitios de unión 14, 70 y 72 son parte de los llamados *puntos débiles*.

En lo que respecta a LAO con arginina, el CPG abarca ambos lóbulos, lo cual sugiere, cooperatividad entre ambos dominios, probablemente debido a que el ligando forma puentes de hidrógeno tanto con el lóbulo A y el B. La zona más flexible está formada por los residuos 184-194 ($p_i = -0.3 \text{ kcal mol}^{-1}$) que forman parte de la bisagra. Resulta interesante debido a que LAO en estado abierto requiere que la zona de bisagra se mantenga más rígida para evitar el cierre, sin embargo, en presencia del ligando, el cambio en la rigidez de ésta zona sugiere que la proteína necesita mayor flexibilidad para poder realizar el movimiento, acercando ambos lóbulos y permitiendo la unión del ligando.

Por el contrario, la región más rígida está formada por los residuos 56-59 que son parte de una α -hélice (hélice 2) del lóbulo discontinuo, esto coincide con la zona más rígida para el CGP de LAO sin ligando en cuanto a que ambas hélices forman parte del mismo dominio.

El índice de rigidez en LAO con arginina arrojó que los residuos más flexibles son 1-4, 181-194 y 232-238 ($r_i = -0.3 \text{ kcal mol}^{-1}$), entre los que se encuentra la región de bisagra, además, algunos residuos coinciden con el índice de percolación. El asa de interacción con el transportador de membrana se rigidizó en LAO con arginina, en comparación con LAO sin ligando, dado que en el segundo caso, el r_i fue de $-2.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ y en el primero resultó de

-0.3 kcal mol⁻¹. Estos resultados sugieren que el aumento en la rigidez en dicha zona es necesario para que LAO pueda interactuar con el complejo de membrana.

Los valores de R_i para los residuos del sitio de unión se encuentran entre -1.8 kcal mol⁻¹ y -3.0 kcal mol⁻¹, lo anterior indica que dicha zona se vuelve más rígida como era de esperarse debido a que ya existe interacción con la arginina.

Al igual que en LAO sin ligando, las hojas β -plegada pierden su red de contactos con una menor cantidad de energía en comparación con las α -hélice.

A diferencia de LAO sin ligando, el núcleo de desplegamiento de LAO con arginina está formado por una α -hélice del lóbulo continuo, además de la hebra β -plegada del lóbulo discontinuo. Lo anterior refuerza la idea de cooperatividad en presencia del ligando.

Al igual que LAO con arginina, LAO con histidina tiene un CGP formado por ambos dominios. La zona más flexible contiene los residuos 185-194 ($p_i = -0.2$ kcal mol⁻¹) que forman parte de la región de bisagra (misma zona que LAO con arginina) y que refuerza la idea de que ésta región se flexibiliza para poder cambiar de estado abierto a cerrado. La zona más rígida está formada por los residuos 29-37 ($p_i = -4.8$ kcal mol⁻¹) que resulta ser de nuevo la hélice 1 al igual que en LAO con arginina.

El índice de rigidez en LAO con histidina indica que los residuos más flexibles son 185-187 y 192-194 ($r_i = -0.2$ kcal mol⁻¹), entre los que se encuentra la región de bisagra. Por el contrario, la zona más rígida contiene a los residuos 29-37, 56-57 y 173, aunque sólo los dos primeros grupos forman parte de la α -hélice 1 y 2 respectivamente.

Los residuos del sitio de unión tienen valores que van desde -1.0 kcal mol⁻¹ hasta -3.0 kcal mol⁻¹, los cuales son muy similares para LAO con arginina y que sugieren que la proteína requiere mantener cierto índice de rigidez en su sitio de unión para poder llevar a cabo su función.

De manera general, las hebras β pierden su estructura con menor cantidad de energía que las α -hélices en LAO con histidina.

El núcleo de desplegamiento de LAO con histidina está formado únicamente por la hoja β plegada del lóbulo discontinuo.

Por otra parte, los estudios realizados con la termófila Art J con arginina muestran que la T_m obtenida en el análisis global de la entropía (H) es de 356 K, 16 grados por encima de LAO (341 K), sin embargo, el parámetro P tiene una T_m de 329 K, la cual es incluso menor que LAO con arginina. Este resultado no concuerda con lo esperado para una proteína termófila.

Al igual de LAO con arginina, el CGP para Art J está formado por ambos lóbulos. Los residuos del sitio de unión en Art J con arginina presentan índices de percolación entre -1.4 kcal mol⁻¹ y -2.8 kcal mol⁻¹, que son muy similares para LAO con arginina.

Se vuelve a observar, de manera general, que las hojas β plegada son las estructuras que menor cantidad de energía requieren para perder sus contactos.

El núcleo de desplegamiento está formado por una región de la hoja β del lóbulo discontinuo.

Las T_m globales para LAO con histidina resultaron menores que para LAO con arginina (337 K), siendo de 325 K. Lo anterior no concuerda para una proteína termófila.

El CGP está formado por ambos lóbulos, excepto por una α -hélice. Los residuos del sitio de unión tuvieron valores de P_i entre -1.2 kcal mol⁻¹ y -1.6 kcal mol⁻¹, siendo ligeramente menores que Art J con arginina.

El patrón de desplegamiento de Art J con histidina muestra que las hojas β pierden sus contactos de manera simultánea a las α -hélices.

El núcleo de desplegamiento está formado por las hojas β que componen a ambos dominios.

CNA logro reproducir adecuadamente las diferencias de T_m entre LAO con y sin ligando observadas experimentalmente ($\Delta T_m = 10$ K, para LAO con arginina). Estos resultados

validan el uso de CNA para el estudio del desplegamiento térmico de proteínas tal y como se había observado anteriormente.

De manera general, tanto en mesófilas como en termófilas se observó que las hojas β -plegada requieren de menor energía para perder su estructura en comparación con las α -hélices. Por lo anterior, proponemos que, para las PBPs, las hojas β son más flexibles que las α -hélices, siendo las hojas β los sitios por donde comienza el desplegamiento de la proteína. Lo que se observó es que aumentos en la rigidez de ciertas regiones, están compensados por disminución en flexibilidad durante la unión del ligando. Por ejemplo, para el caso de LAO con arginina, algunas regiones β del lóbulo discontinuo se vuelve más rígidas en presencia del ligando, mientras que algunas α -hélices se flexibilizan. Resultados similares se observan para LAO con histidina.

Regiones importantes para la función de LAO, como son la zona de bisagra y el sitio de unión, sufren cambios específicos de flexibilidad al cambiar de conformación. El sitio de unión se vuelve más rígido en presencia de arginina e histidina, lo cual era de esperarse ya que los residuos de dicho sitio interactúan con el ligando. Los valores de R_i para estos residuos son valores intermedios. Es importante que las zonas de interacción de las proteínas con otras moléculas presenten un equilibrio entre flexibilidad y rigidez puesto que una región muy rígida no sería capaz de adaptarse adecuadamente a la estructura de sus ligandos, por el contrario, un sitio de unión muy flexible implicaría un cambio de entropía muy elevado, lo cual es desfavorable para la energética de unión (ΔG). La bisagra, en cambio, se flexibiliza en estado cerrado, sugiriendo que dicha región debe presentar cierta rigidez para mantener ambos lóbulos alejados uno del otro en el estado abierto, y flexibilizarse para que se lleve a cabo el cambio conformacional.

En lo que respecta a Art J, no existe un patrón detallado de rigidez/flexibilidad en comparación a LAO, que permita inferir las bases que determinan la termoestabilidad. Por otra parte, las T_m en Art J resultaron incluso menores que LAO, por ello sugerimos que el uso de CNA para estudiar el desplegamiento térmico en termófilas no es tan eficiente

como para el estudio de mesófilas, probablemente debido a que no toma en cuenta factores importantes para la termoestabilidad.

Conclusiones.

Por todo lo anterior, es claro que el estudio de los cambios en la flexibilidad y rigidez que acompañan a los cambios conformacionales en proteínas periplásmicas son de gran importancia para comprender a detalle los factores que determinan la función y estabilidad de las mismas, lo cual permitiría a futuro modificar racionalmente dichas macromoléculas para mejorar o adquirir nuevas funciones con fines biotecnológicos.

Bibliografía.

1. Alberts, B. *et al. Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 2007. 1503 pp.
2. Chen et al. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica D* 66:12-21.
3. *CNA Constraint Network Analysis*. Consultada por última vez 12-Mayo-2015. <http://cpclab.uni-duesseldorf.de/cna>.
4. Creighton, T. E., (1997). *Proteins*. W.H. Freeman and Company.
5. Csermely, P., & Ga, M. E. (2012). Rigidity and flexibility of biological networks.
6. Dill, K. a, & MacCallum, J. L. (2012). The protein-folding problem, 50 years on. *Science (New York, N.Y.)*, 338(6110), 1042–6.
7. Dwyer, M. a, & Hellinga, H. W. (2004). Periplasmic binding proteins: a versatile superfamily for protein engineering. *Current Opinion in Structural Biology*, 14, 495-504.
8. Felder, C. B., Graul, R. C., Lee, A. Y., Merkle, H., Sadee, W., & Chemistry, P. (1999). The Venus Flytrap of Periplasmic Binding Proteins: An Ancient Protein Module Present in Multiple Drug Receptors, *1*(2).
9. *Fundamentals of Protein Structure and Function*. (2007). Boston, MA: Springer US.

10. Haber, E., & White, F. H. (1961). Proceedings of the NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 47(9), 1309–1314.
11. Krüger, D. M., Rathi, P. C., Pflieger, C., & Gohlke, H. (2013). CNA web server: rigidity theory-based thermal unfolding simulations of proteins for linking structure, (thermo-)stability, and function. *Nucleic Acids Research*, 41, W340–8.
12. Lakowicz, J. R. (2006). Principles of fluorescence spectroscopy. Springer.
13. Mamonova, T. B., Glyakina, A. V, Galzitskaya, O. V, & Kurnikova, M. G. (2013). Stability and rigidity/flexibility-two sides of the same coin? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1834(5), 854–66.
14. MolProbity. Consultada por última vez el 12-Mayo-2015 en <http://molprobity.biochem.duke.edu/>
15. Nelson, D., Cox, M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5° Edición, W.H. Freeman, 2008. 1158 pp.
16. Oh, B. H., Ames, G. F., & Kim, S. H. (1994). Structural basis for multiple ligand specificity of the periplasmic lysine-, arginine-, ornithine-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 26323-30.
17. Oh, B.-ha, Pandits, J., Kang, C.-hee, Nikaidoii, K., Gokcen, S., Amesll, G. F.-luzzi, et al. (1993). Three-dimensional Structures of the Periplasmic Lysine/Arginine/Ornithine-binding Protein with and without, 268, 11348-11355.
18. Paas, Y. (1998). The macro- and microarchitectures of the ligand-binding domain of glutamate receptors. *Trends in Neurosciences*, 21(3), 117–125.
19. Pflieger, C., Radestock, S., Schmidt, E., & Gohlke, H. (2013). Global and local indices for characterizing biomolecular flexibility and rigidity. *Journal of Computational Chemistry*, 34(3), 220–33.
20. Pflieger, C., Rathi, P. C., Klein, D. L., Radestock, S., & Gohlke, H. (2013). Constraint Network Analysis (CNA): a Python software package for efficiently linking biomacromolecular structure, flexibility, (thermo-)stability, and function. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(4), 1007–15.

21. Pulido, N. O., Silva, D.-A., Tellez, L. a, Pérez-Hernández, G., García-Hernández, E., Sosa-Peinado, A., & Fernández-Velasco, D. A. (2015). On the molecular basis of the high affinity binding of basic amino acids to LAOBP, a periplasmic binding protein from *Salmonella typhimurium*. *Journal of Molecular Recognition : JMR*, 28(2), 108–16.
22. Radestock, S., & Gohlke, H. (2011). Protein rigidity and thermophilic adaptation. *Proteins*, 79(4), 1089–108.
23. Shi, R., Proteau, A., Wagner, J., Cui, Q., Purisima, E. O., Matte, A., et al. (2009). Trapping open and closed forms of FitE: a group III periplasmic binding protein. *Proteins*, 75, 598-609.
24. Vahedi-Faridi, A., Eckey, V., Scheffel, F., Alings, C., Landmesser, H., Schneider, E., & Saenger, W. (2008). Crystal structures and mutational analysis of the arginine-, lysine-, histidine-binding protein ArtJ from *Geobacillus stearothermophilus*. Implications for interactions of ArtJ with its cognate ATP-binding cassette transporter, Art(MP)2. *Journal of Molecular Biology*, 375(2), 448–59.
25. Vergara G., Jesus R. (2011). *El desplegamiento de la proteína LAO. Estudios cinéticos y termodinámicos*. (Tesis). Facultad de Medicina. UNAM. México.