



## **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

### **Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Caracterización cinética y termodinámica del mecanismo de plegamiento de la proteína de unión a lisina, arginina, ornitina (LAO)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

LIBB. Jesús Renan Vergara Gutiérrez

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco  
Facultad de Medicina, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Rogelio Rodríguez Sotres  
Facultad de Química, UNAM

Miguel Antonio Costas Basin  
Facultad de Química, UNAM

MÉXICO, D. F. Mayo, 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.

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

El desarrollo de este proyecto fue financiado por PAPIIT IN 219913, Conacyt 99857 y la Facultad de Medicina de la UNAM.

Agradezco apoyo económico recibido por parte del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para asistir al 27 Congreso de la Sociedad de Proteínas.

Agradezco el apoyo técnico de la Dra. Isabel Velázquez López y a la M. en C. Laura Álvarez Añorve.

## INDICE

ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN .....	7
INTRODUCCIÓN .....	9
Plegamiento de proteínas .....	9
Modelos de plegamiento .....	12
Intermediarios de plegamiento y su detección.....	13
Análisis de valores $\phi$ .....	21
Isomerización de prolinas .....	22
Proteínas de unión a ligando (SBPs).....	23
Proteína de unión a lisina-arginina-ornitina (LAO).....	27
Plegamiento de PBPs: Proteína de unión a Maltosa.....	30
Plegamiento de PBPs: Proteína de unión a Histidina.....	31
Estudios de plegamiento de LAO .....	31
Mutante de LAO, P16A.....	35
OBJETIVO.....	36
MATERIALES Y METODOS.....	37
Generación de la mutante P16A .....	37
Purificación de LAO y LAO P16A.....	37
Experimento de doble salto .....	39
Ensayos de desnaturalización de ciclofilina (CyP).....	39
Experimento de renaturalización en presencia de CyP.....	40
Experimento de replegamiento interrumpido .....	41
Ensayos de desnaturalización de LAO P16A.....	41
Experimentos cinéticos de renaturalización y desnaturalización de LAO P16A .....	41
Calorimetría de titulación isotérmica (ITC) de LAO P16A .....	42
Análisis de datos.....	42
RESULTADOS .....	49
Experimentos de doble salto.....	49
Experimentos de replegamiento de LAO en presencia de CyP .....	51
Experimentos de replegamiento interrumpido .....	54

Mutante de LAO, P16A.....	62
Experimentos de desnaturalización térmica.....	62
Experimentos de desnaturalización inducida por urea.....	63
Experimentos cinéticos de replegamiento y desplegado.....	64
Calorimetría de titulación isotérmica.....	66
DISCUSIÓN.....	68
Termodinámica y cinética del plegamiento de LAO.....	68
Mutante P16A .....	73
Mecanismo de plegamiento e isomerización de prolina.....	75
Estabilidad y función .....	76
CONCLUSIONES .....	79
REFERENCIAS.....	80

## **ABREVIATURAS**

ASA: Área accesible al solvente

$\beta_T$ : Beta de Tanford

$C_m$ : Concentración media de desnaturizante

DC: Dicroísmo circular

DSC: Calorimetría de barrido diferencial

ET: Estado de transición

$F_D$ : Fracción de proteína desnaturizada

HisJ: Proteína de unión a histidina

IF: Intensidad de fluorescencia

ITC: Calorimetría de titulación isotérmica

$K_d$ : constante de disociación

LAO: Proteína de unión a lisina, arginina y ornitina

MBP: Proteína de unión a maltosa

PBP: Proteína de unión a ligando

SBP: proteína de unión a substrato

$T_m$ : Temperatura media de desnaturalización

$\Delta H$ : Cambio en la entalpia

$\Delta S$ : Cambio en la entropía

## RESUMEN

El proceso por el cual las proteínas adquieren su estructura tridimensional es conocido como plegamiento. La información requerida para que una proteína se pliegue está codificada en su secuencia de aminoácidos; sin embargo, aún no es posible explicar cómo es que dicha secuencia da lugar a la estructura tridimensional. Los conocimientos adquiridos sobre el plegamiento de proteínas han sido resultado del estudio de proteínas pequeñas (< 200 residuos) de un solo dominio. No obstante, es necesario estudiar el plegamiento de proteínas de mayor complejidad y tamaño para lograr dilucidar las bases que rigen dicho proceso.

Las proteínas periplásmicas de unión (PBPs) están formadas por más de 200 residuos y presentan una estructura general constituida por dos dominios tipo Rossmann. En *Sallmonela typhimurium*, la PBP de unión a lisina, arginina y ornitina (LAO) está formada por 238 residuos y presenta un dominio continuo y otro discontinuo. El dominio discontinuo, a su vez, muestra una prolina en configuración *cis* en la posición 16, la cual se encuentra altamente conservada.

El objetivo de este proyecto es la caracterización cinética y termodinámica del mecanismo de plegamiento de LAO, así como el estudio de las repercusiones estructurales y funcionales de la mutación P16A.

Estudios de desplegamiento de LAO inducido por temperatura y urea, seguidos por técnicas espectroscópicas, así como calorimetría de barrido diferencial mostraron que dicho proceso es altamente reversible y, al equilibrio, presenta un comportamiento de dos estados, tal y como se ha observado para otras PBPs. En contraste, los estudios cinéticos mostraron mayor complejidad. El gráfico de chevron obtenido de los experimentos cinéticos de desplegamiento y replegamiento presenta dos ramas a concentraciones de urea menores a 1.5 M, ambas con curvatura. Este comportamiento ha sido reportado como consecuencia de la formación de intermediarios del plegamiento y/o isomerización de prolinas. Experimentos de doble salto, así como de replegamiento en presencia de la enzima ciclofilina indicaron la presencia de isomerización de prolinas, probablemente, debido a la *cis-trans* isomerización de la prolina 16. El análisis del gráfico de chevron en ausencia de

isomerización de prolinas mostró la existencia de un intermediario. De acuerdo a los experimentos de replegamiento interrumpido, dicho intermediario se encuentra en una vía secuencial.

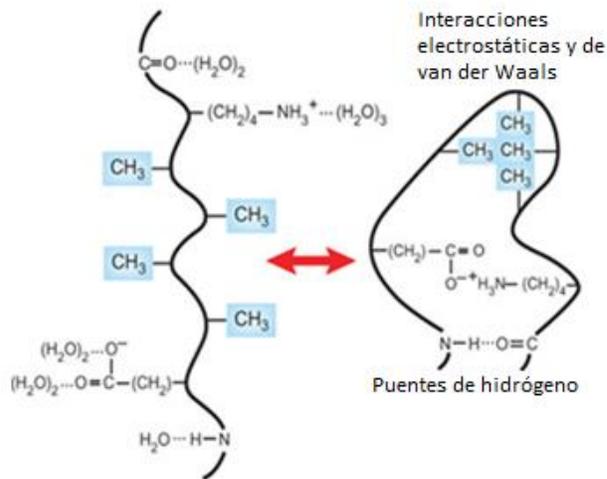
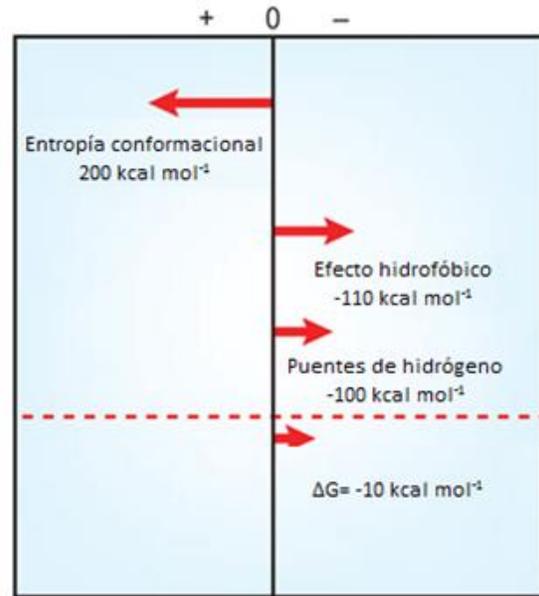
Por otra parte, los estudios cinéticos de la mutante P16A confirmaron que este residuo es responsable del proceso de isomerización observado en los experimentos de doble salto. Más aun, la estabilidad de LAO es afectada por la mutación y, de acuerdo a experimentos de calorimetría de titulación isotérmica, también su función.

En conclusión, los estudios realizados como parte de esta tesis, sugieren que la alta reversibilidad y cooperatividad observada en las PBPs es consecuencia de su estructura general; no obstante, otras características son particulares de cada proteína. Por último, los estudios con la mutante P16A han mostrado el lazo estrecho que existe entre la estructura y la función. Por ello, para profundizar en la comprensión de las propiedades de las proteínas es importante el estudio detallado de los factores que proporcionan estabilidad a dichas macromoléculas y aquellas que determinan sus características funcionales.

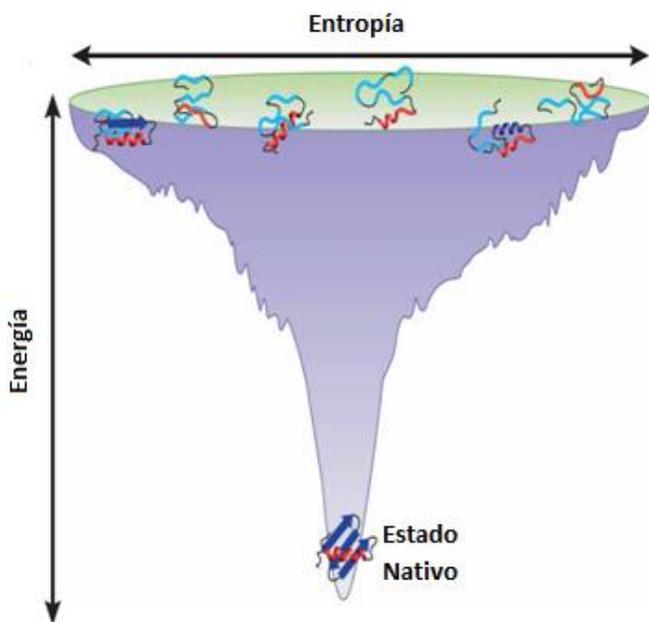
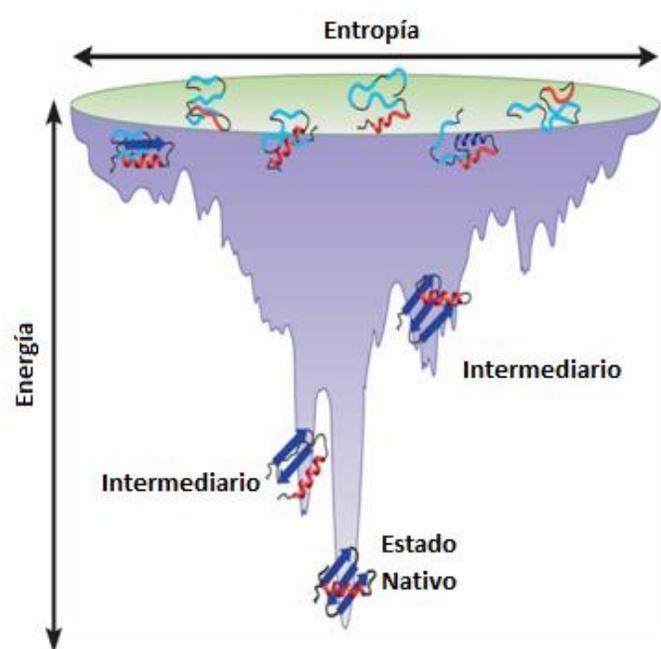
## INTRODUCCIÓN

### Plegamiento de proteínas

Las proteínas adquieren su estructura tridimensional a través de un proceso conocido como plegamiento. En el año de 1961, Christian Anfinsen mostró, a partir de experimentos de desnaturalización y renaturalización de la ribonucleasa pancreática bovina, que la información necesaria para que una proteína adquiriera su conformación nativa se encuentra codificada en su secuencia de aminoácidos (Anfinsen, 1961). Dicho descubrimiento originó lo que en la actualidad se conoce como el problema del plegamiento de proteínas, el cual se resume en tres preguntas principales: ¿cuál es el código por el cual la secuencia de aminoácidos determina la estructura nativa?, ¿cómo es que las proteínas se pliegan en tiempos biológicamente relevantes? y ¿se puede diseñar un algoritmo que permita predecir la estructura terciaria a partir de la estructura primaria? (Dill, 2012). Aunque aún no es claro cómo es que las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos dan lugar a la estructura tridimensional de las proteínas, se sabe que las fuerzas que guían dicho proceso son principalmente los puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones electrostáticas, así como el efecto hidrofóbico. Como resultado del balance de todas las fuerzas implicadas en el plegamiento, las proteínas presentan en promedio una estabilidad de apenas  $10 \text{ kcal mol}^{-1}$  (fig. 1). En 1969, Cyrus Levinthal mostró que la búsqueda de la estructura nativa a través de todo el universo conformacional es prácticamente imposible en un tiempo biológicamente relevante (Bryngelson, 1994). Después de diversos estudios experimentales y computacionales, se ha propuesto que el paisaje energético de las proteínas tiene forma de embudo, donde el estado desnaturalizado se compone de todo un conjunto de conformaciones de alta energía y entropía, y el espacio conformacional se va reduciendo conforme la proteína se acerca al estado de menor energía (nativo) en la base del embudo (fig. 2). A pesar de dichos conocimientos, en la actualidad no existe un algoritmo computacional que permita conocer la estructura nativa a partir de la estructura primaria; sin embargo, se han desarrollado diversos programas capaces de predecir la conformación nativa de las proteínas con base a la existencia de secuencias homólogas cuya estructura tridimensional ha sido determinada (Kaufmann, 2010).

**A****B**

**Figura 1.** A) Las principales fuerzas que guían el plegamiento de proteínas son los puentes de hidrógeno, las interacciones electrostáticas y de van der Waals, así como el efecto hidrofóbico. B) Como resultado del balance de todas las fuerzas implicadas en dicho proceso la estabilidad de las proteínas es de apenas 10 kcal mol<sup>-1</sup> en promedio. Imagen modificada de (Pace, 2009)

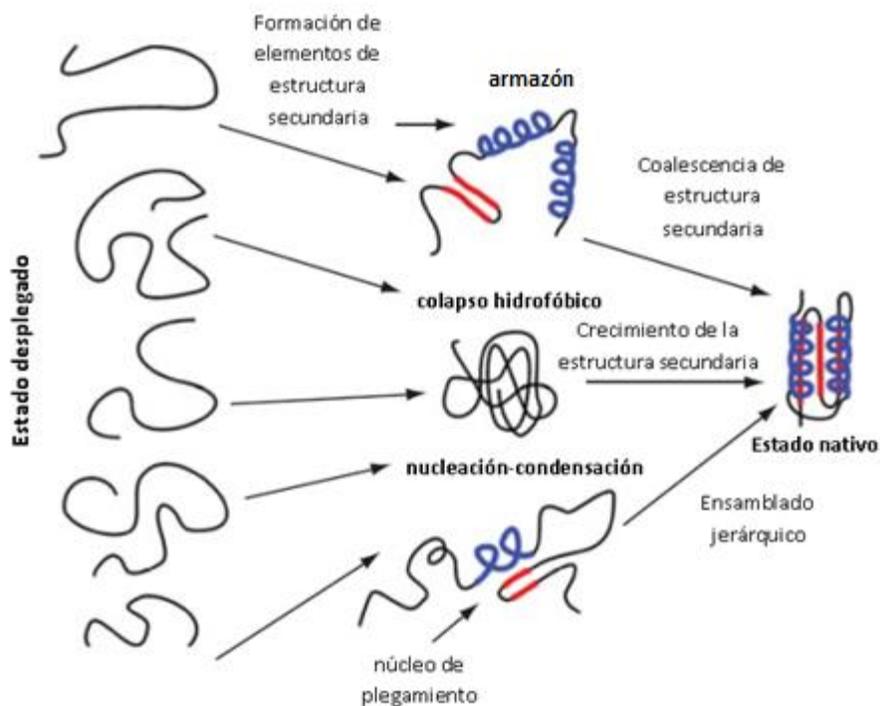
**A****B**

**Figura 2.** Embudo de energía "liso" (A), sin mínimos ni grandes barreras energéticas, y rugoso (B), con mínimos correspondientes a estructuras parcialmente plegadas. Imágenes modificadas de (Bartlett, 2009)

Un enfoque de gran importancia en el estudio del plegamiento de proteínas es la caracterización del mecanismo por el que dicho proceso se lleva a cabo, el cual se refiere a la serie de pasos que llevan del estado desnaturalizado a la conformación nativa, y el orden en que suceden (Dill, 2012). Para ello, es de suma importancia el estudio de las características fisicoquímicas y estructurales de los estados intermediarios, así como los estados de transición. Varios años de investigación han mostrado que proteínas pequeñas (< 100 residuos) generalmente se pliegan en una sola etapa (dos estados), mientras que proteínas de mayor tamaño (>100 residuos) presentan intermediarios (tres o más estados) (Jackson, 1998). El mecanismo de plegamiento de una proteína está determinado por la forma de su embudo de energía. Proteínas cuyo embudo no presenta mínimos de energía profundos (fig. 2A) se pliegan siguiendo un mecanismo de dos estados; por el contrario, proteínas que presentan embudos con mínimos profundos (fig. 2B) se pliegan en tres o más estados (Bartlett, 2009). No obstante, las características estructurales que establecen el mecanismo no son claras. En un inicio se propuso que dicho proceso dependía de la topología de la proteína; sin embargo, después de diversos estudios se encontró que proteínas con una estructura prácticamente idéntica pero con diferencias en la secuencia de aminoácidos pueden presentar rutas de plegamiento con distintas características (Friel, 2004; Gianni, 2007). Varios trabajos han mostrado que para dilucidar los determinantes de dichas diferencias, es necesario estudiar a detalle cada paso en el proceso. Por ejemplo, en un trabajo realizado por Friel (Friel, 2004) se muestra que la proteína Im7 presenta un intermediario de plegamiento, el cual es estabilizado por interacciones no nativas. Dichas interacciones no están presentes en la proteína Im9 cuyo plegamiento es de dos estados, a pesar de compartir un 60% de identidad con Im7, así como la misma topología. Cuando los residuos que se encuentran en las posiciones donde se realizan las interacciones no nativas en el intermediario son reemplazados en Im9 por los de Im7, el plegamiento de la primera cambia de dos a tres estados, mostrando así diferencias en el mecanismo de plegamiento que no se originan por diferencias en la estructura nativa.

## Modelos de plegamiento

Posterior a la paradoja de Levinthal, se propusieron diversos modelos que tratan de explicar el mecanismo general del plegamiento de proteínas (fig 3). En 1973 Oleg Ptitsyn sugirió que el plegamiento es un proceso jerárquico, el cual inicia con la formación de la estructura secundaria. De acuerdo a este modelo, de nombre “armazón”, la estructura adquirida en cada paso estabiliza a la ya existente. Posteriormente Karplus y Weaver propusieron el modelo de difusión-colisión. Este modelo supone que las proteínas están formadas por pequeños micro dominios cuya secuencia de aminoácidos contiene la información para su plegamiento en pequeñas porciones de estructura secundaria. Estos microdominios pueden colisionar por difusión y una colisión productiva lleva a la formación de intermediarios, los cuales llegan a la conformación nativa a través de colisiones productivas posteriores. Más adelante, fue introducido el modelo de colapso hidrofóbico, el cual consiste en el colapso rápido de la proteína a una estructura compacta donde subsecuentemente se forma la estructura secundaria (Fersht, 2008; Gianni, 2008).



**Figura 3.** Representación esquemática de los modelos de colapso hidrofóbico, framework y nucleación-condensación, propuestos para el plegamiento de proteínas. Imagen modificada de (Morris, 2012).

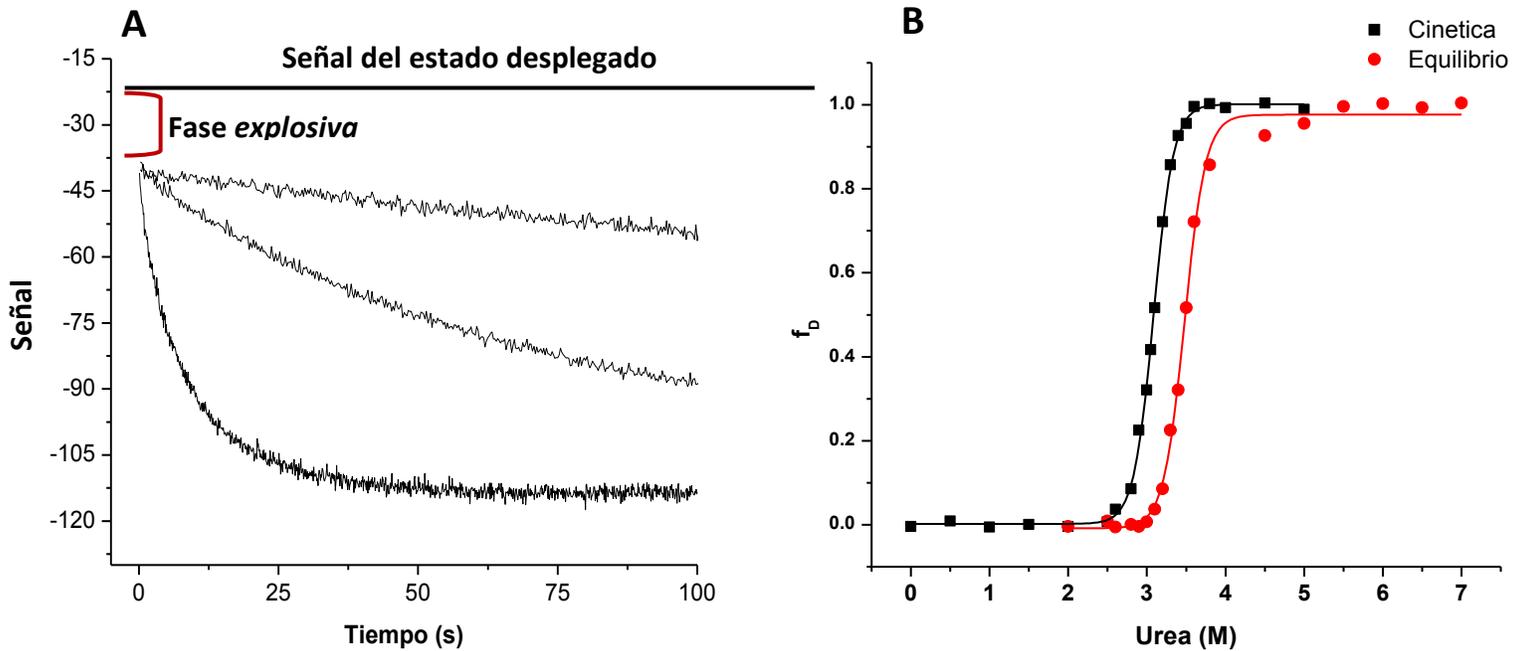
El modelo más reciente fue propuesto por Fersht y es conocido como el modelo de nucleación-condensación, el cual consiste en la formación de un núcleo de estructura secundaria estabilizado por interacciones terciarias alrededor del cual la estructura se condensa (Itzhaki, 1995). En este caso, el estado de transición es una forma distorsionada de la estructura nativa, donde la zona más ordenada es el núcleo y la distorsión aumenta con la distancia. Diversos trabajos han mostrado que ninguno de los modelos propuestos explica de manera general el proceso de plegamiento; por el contrario, cada proteína es un caso particular cuyo plegamiento puede ser descrito por uno u otro mecanismo.

### **Intermediarios de plegamiento y su detección**

Los modelos de difusión-colisión, framework y colapso hidrofóbico presentan una característica muy particular: todos ellos implican la presencia de intermediarios. En un principio se postuló que dichas especies eran indispensables para el plegamiento de proteínas ya que limitaban el espacio conformacional para la búsqueda de la estructura nativa. Sin embargo, en 1995 Schmid encontró que la proteína CspB se pliega rápidamente en ausencia de intermediarios (Schindler, 1995), y en 1997 Kiefhaber (Wildegger, 1997) publicó que el plegamiento de la lisozima presenta un mecanismo triangular. Para otras proteínas se han obtenido resultados similares, sugiriendo que los intermediarios son trampas cinéticas que obstaculizan el plegamiento y que por lo tanto se puede prescindir de ellos. No obstante, otros estudios indican lo contrario. Por ejemplo, la estabilización del intermediario cinético que presenta la proteína Im9, aumentan su velocidad de plegamiento alrededor de 20 veces (Friel, 2004). Para otros sistemas se ha observado el mismo efecto, apoyando así la visión inicial de que los intermediarios son especies productivas que facilitan la búsqueda del estado nativo a lo largo del universo conformacional. Algunos autores sugieren que las conformaciones distintas a los estados nativo y desplegado surgen como consecuencia de la función. De acuerdo a lo propuesto, las secuencias han evolucionado con fines funcionales, lo cual ha comprometido la velocidad de plegamiento así como la estabilidad de las proteínas (Brockwell, 2007). Actualmente se han identificado intermediarios en proteínas que inicialmente se reportaron con un mecanismo de dos estados (Gorski, 2001). Esto ha llevado a proponer

que el plegamiento de todas las proteínas presenta dichas especies, las cuales en ocasiones no se pueden detectar debido a su baja estabilidad y a la sensibilidad de los métodos de identificación (Brockwell, 2007). La caracterización de los intermediarios a través de técnicas como como resonancia magnética nuclear (Korzknev, 2010) e ingeniería de proteínas (Capaldi, 2002) sugiere que el orden de formación de la estructura (mecanismo estructural) se conserva entre proteínas que comparten la misma topología a pesar de diferir en el número de estados presentes en su plegamiento (mecanismo cinético). La presencia de distintos mecanismos cinéticos se debe a diferencias en la estabilidad de los intermediarios, por ello la incorporación de mutaciones y cambios en las condiciones del medio los estabilizan modificando las características del plegamiento. Dichos resultados, en conjunto con la identificación de vías alternas en el proceso, son prueba de la plasticidad del paisaje conformacional de las proteínas. Aunque el debate sobre el papel de los intermediarios persiste en la actualidad, su estudio es de gran importancia para comprender a detalle el camino que recorre la estructura primaria hasta llegar al estado nativo.

La detección de intermediarios se puede llevar a cabo a partir del análisis de las cinéticas de replegamiento. Para un proceso de dos estados (ec. 1), las cinéticas presentan una sola exponencial y la señal inicial corresponde a la señal del estado desplegado. Por otra parte, el gráfico de la señal final con respecto a la concentración de urea o cloruro de guanidinio (GndCl) debe reproducir la curva de desnaturalización obtenida de los experimentos al equilibrio y el cambio en energía libre de desplegado ( $\Delta G_{ND}$ ), la dependencia de  $\Delta G_{ND}$  con la concentración de desnaturalizante ( $m$ ) y la concentración media de desnaturalizante ( $cm$ ) deben coincidir. Por lo tanto, la presencia de una fase “explosiva” al inicio de las cinéticas indica que la señal inicial observada es realmente la señal final de una fase rápida en el tiempo muerto del experimento que describe la transición del estado desplegado a un intermediario (Morris, 2012). De la misma manera, si el análisis de la señal final no concuerda con los datos al equilibrio, existe la formación de un intermediario (fig 4).



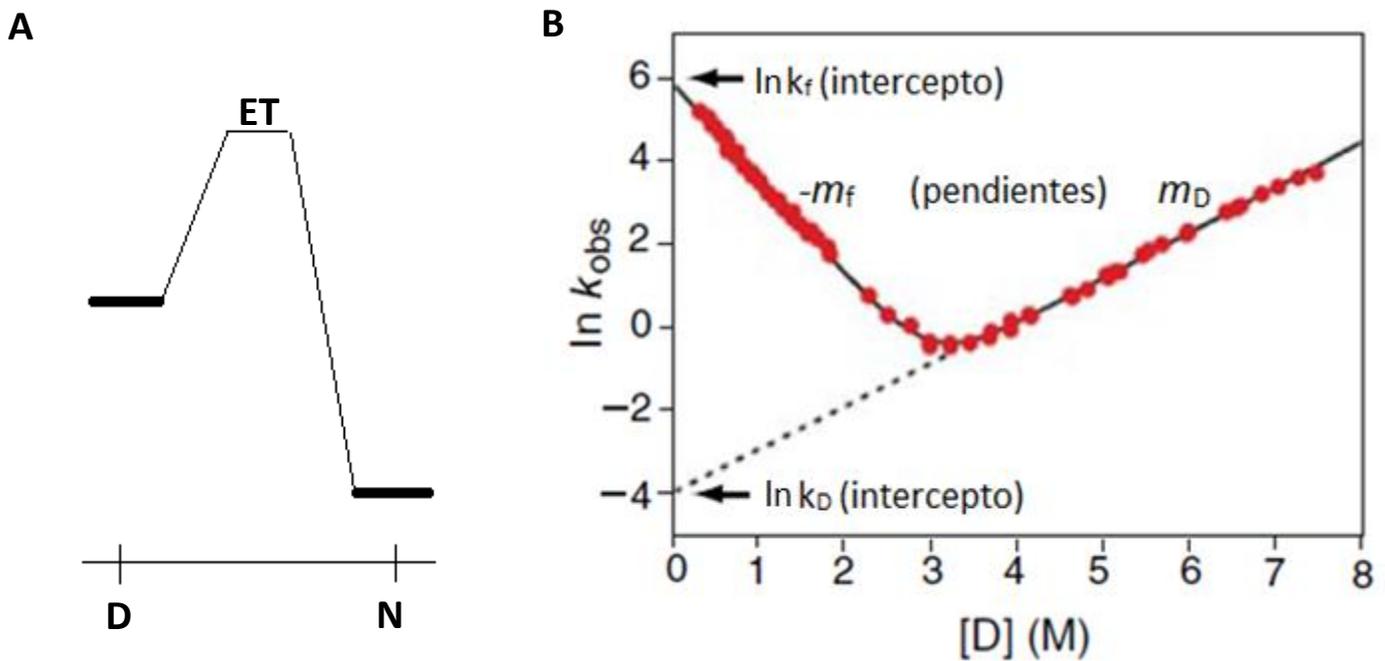
**Figura 4.** La presencia de una fase “explosiva” en las cinéticas de repliegamiento (A), así como discrepancia entre las curvas de la fracción de proteína desplegada obtenidas del análisis de la señal final y de los experimentos al equilibrio (B), indican la presencia de un intermediario.

Por otra parte, el gráfico que describe la dependencia del logaritmo natural de la constante de velocidad aparente ( $\lambda$ ) obtenida de las cinéticas de renaturalización y desnaturalización, con respecto a la concentración de desnaturalizante (gráfico de chevron), proporciona información relevante para el estudio del mecanismo de plegamiento. El chevron para un mecanismo de dos estados tiene forma de V, ya que muestra dos segmentos lineales -o ramas- con pendientes de signos opuestos (fig 5). Los valores de las constantes microscópicas de plegamiento ( $k_f$ ) y desplegamiento ( $k_D$ ) en ausencia de desnaturalizante, y, se obtienen de la extrapolación de ambas ramas y las pendientes determinan los valores de  $m_f$  y  $m_D$ . Los valores de  $\Delta G_{DN}$  y  $m_{DN}$  obtenidos de los experimentos cinéticos se comparan con los del equilibrio para corroborar que el proceso es de dos estados (ec. 2 y 3). Si existen diferencias entre ellos, el proceso es más complejo.



$$\Delta G_{DN} = -RT \ln Keq = -RT \ln \left( \frac{[N]}{[D]} \right) = -RT \ln \left( \frac{k_f}{k_D} \right) \quad (\text{ec. 2})$$

$$m_{DN} = m_f - m_D \quad (\text{ec. 3})$$

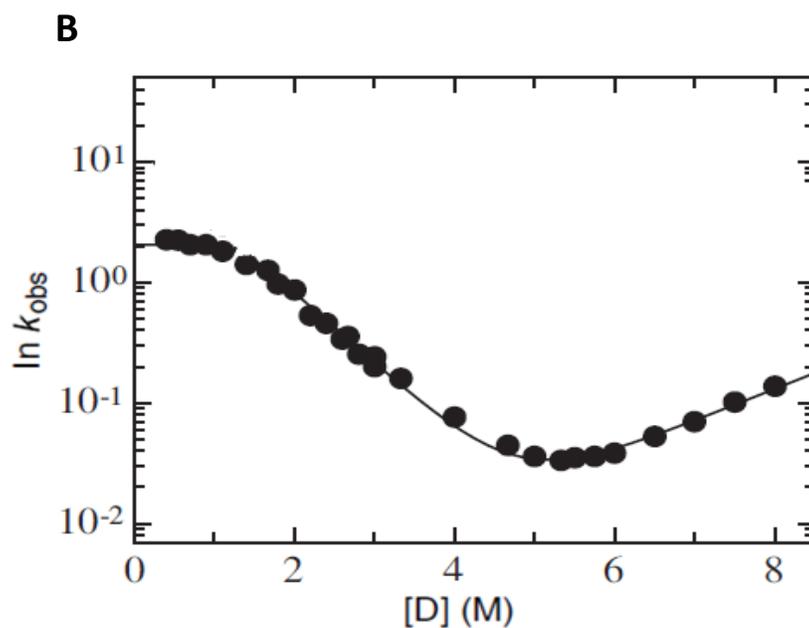
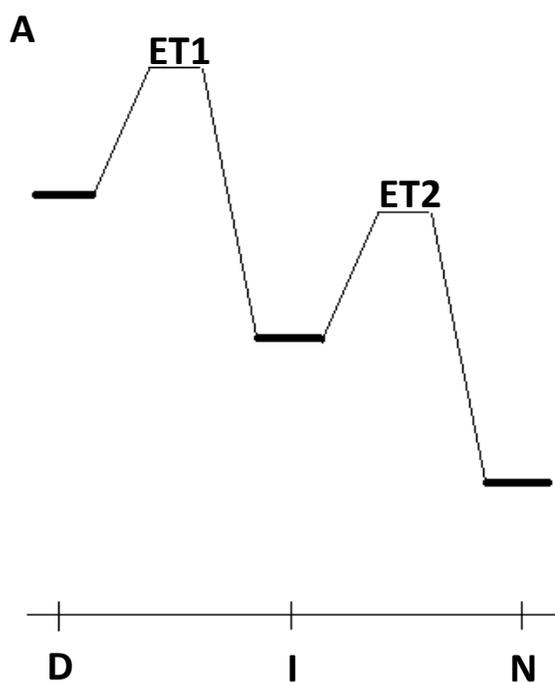


**Figura 5.** A) Coordenada de reacción para un proceso de dos estados. B) Gráfico de chevron para un proceso de dos estados. Del ajuste de las ramas de desnaturalización y renaturalización a una recta y su extrapolación a 0 M de desnaturalizante se obtienen los valores de las constantes microscópicas  $k_f$  y  $k_D$ . Las pendientes de las rectas corresponden a  $m_f$  y  $m_D$ . Imagen modificada de (Morris, 2012)

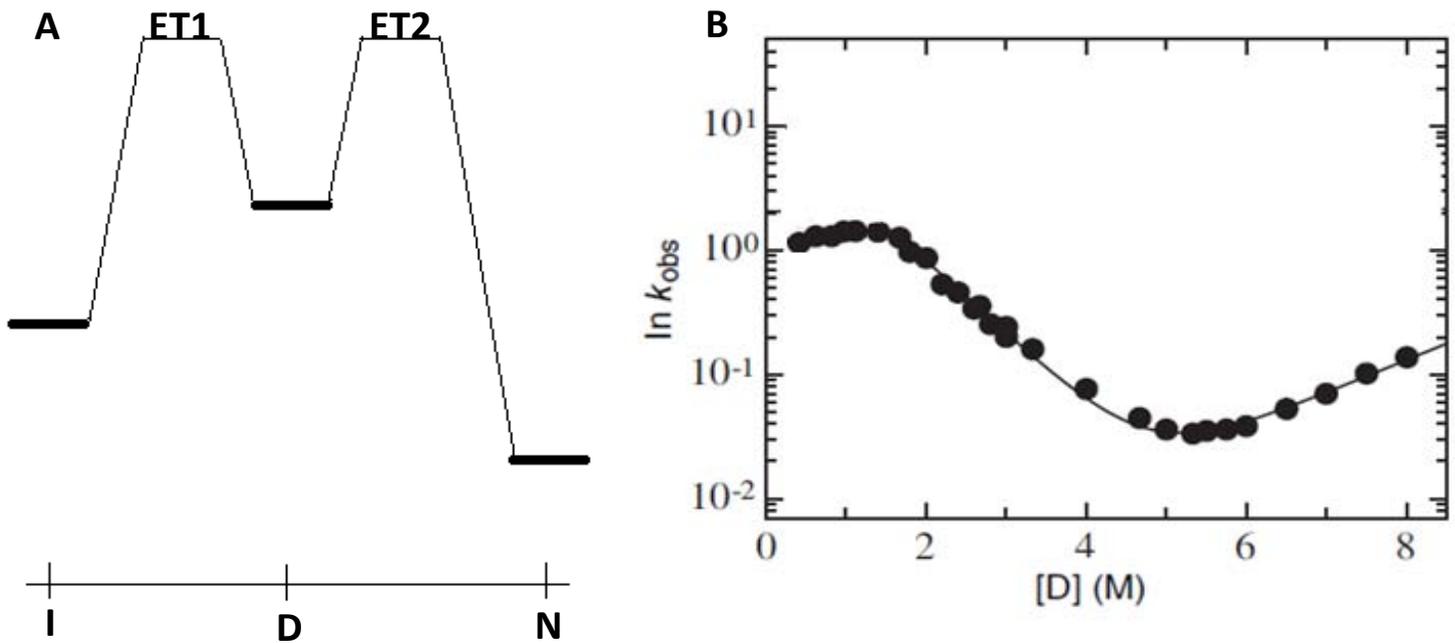
Puesto que el número de constantes de velocidad aparentes que pueden presentar las cinéticas de replegamiento es igual al número de especies menos uno (Büchner, 2004), para un mecanismo de tres estados (ec. 4-6) se pueden observar hasta dos constantes. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, los intermediarios se forman muy rápidamente por lo cual en muchas ocasiones solo es posible medir una de ellas. Además de la presencia de una fase “*explosiva*” en las cinéticas, la presencia de curvatura en la rama de replegamiento en el gráfico chevron indica la existencia de un intermediario (fig. 6). Para un mecanismo secuencial (ec. 4), el origen de la curvatura proviene de la relación proporcional que existe entre la velocidad de plegamiento y la población de intermediario ( $f_I$ ), la cual depende de su estabilidad con respecto al estado desnaturalizado ( $K_{DI}$ ). A concentraciones bajas de desnaturalizante, la transición de D a I es muy rápida por lo cual I se acumula ( $K_{DI} > 1$ ). Bajo esas condiciones D se transforma rápidamente en I y la velocidad de plegamiento es limitada por la conversión de I a N. Por lo tanto, el valor de la pendiente  $m$ , el cual está relacionado con el cambio de área accesible al solvente, es pequeño debido a que tanto I como N son especies compactas con áreas accesibles muy similares. Por otra parte, a concentraciones altas de desnaturalizante  $f_I$  disminuye hasta que el plegamiento se vuelve prácticamente de dos estados ya que la estabilidad de I se reduce. En estas condiciones  $m$  refleja el cambio en área accesible al solvente de D al estado de transición ET, el cual es mayor al de I a N. De este modo, el cambio gradual de la pendiente al cambiar la concentración de desnaturalizante genera la curvatura. Para un modelo no productivo (ec. 5) el origen de la curvatura es diferente, debido a que la velocidad de plegamiento depende de la población de proteína desplegada y no de la población de intermediario. En ocasiones es posible distinguir entre ambos modelos, debido a que el chevron para un mecanismo con un intermediario no productivo se curva hacia abajo a concentraciones bajas de desnaturalizante (fig. 7). Sin embargo, muchas veces no es posible determinar el modelo que mejor explica los datos experimentales, por lo cual es necesario llevar a cabo otros experimentos.

La rama de desnaturalización también puede mostrar curvatura debido a dos razones principales: la primera es el movimiento gradual del estado de transición a lo largo de la

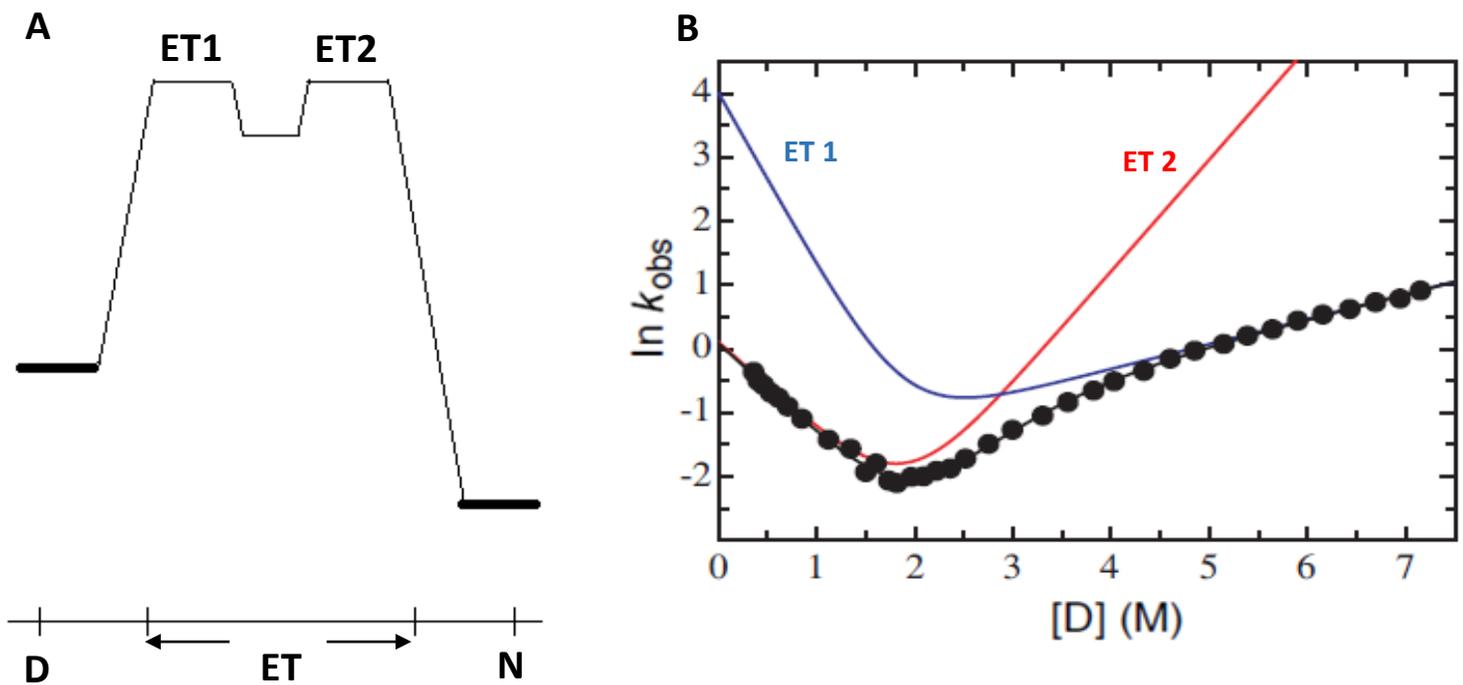
coordenada de reacción (efecto Hammond), y la segunda es la modificación de la vía de plegamiento al cambiar la concentración de desnaturalizante (fig. 8).



**Figura 6.** A) Coordenada de reacción para un proceso de tres estados con un intermediario productivo. B) Gráfico de chevron con curvatura en la rama de plegamiento la cual indica la presencia de un intermediario. Imagen (Kiefhaber, 2005)

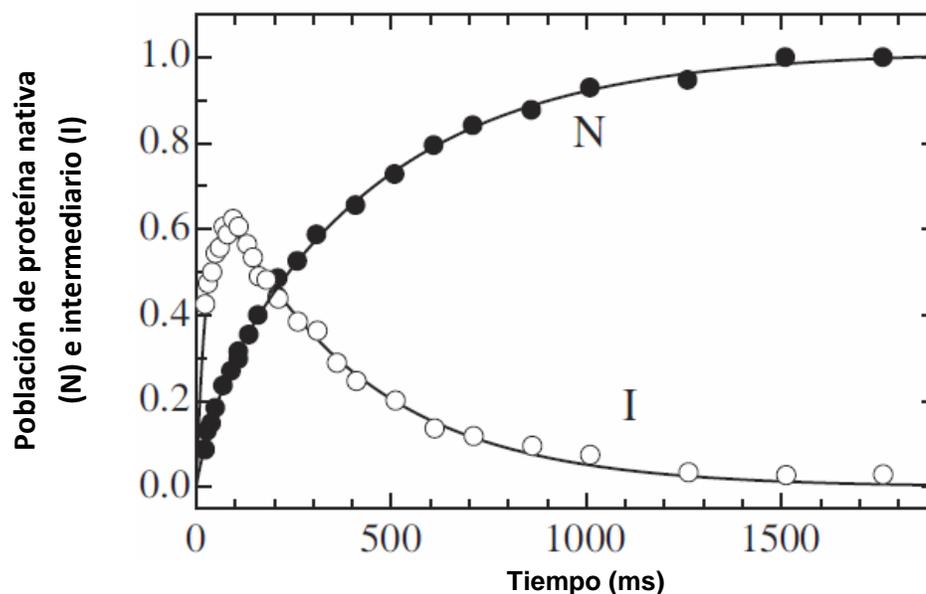


**Figura 7.** A) Coordenada de reacción para un proceso de tres estados con un intermediario no productivo. B) Gráfico de chevron con curvatura hacia abajo en la rama de repliegamiento la cual indica la presencia de un intermediario fuera de la vía. Imagen modificada de (Kiefhaber, 2005)



**Figura 8.** A) Coordenada de reacción y B) gráfico de chevron con curvatura en la rama de desplegamiento resultado del movimiento gradual del estado de transición al cambiar la concentración de desnaturante (efecto Hammond). En rojo y azul se muestran las simulaciones para el chevron correspondiente a los estados de transición 1 y 2 respectivamente Imagen modificada de (Kiefhaber, 2005).

En conjunto con el análisis del gráfico de chevron, los experimentos de replegamiento interrumpido son una herramienta importante para identificar intermediarios y dilucidar el mecanismo de plegamiento. Dichos experimentos inician con una muestra de proteína previamente desnaturalizada, la cual es renaturalizada al ponerse en contacto con amortiguador, y se mantiene en dicho estado por un tiempo determinado para después transferirla a condiciones desnaturalizantes y monitorear el proceso de desplegamiento. Este procedimiento se repite con diversas muestras modificando el tiempo que la proteína permanece en condiciones nativas después de ser renaturalizada. La presencia de dos o más constantes de velocidad en las cinéticas de desnaturalización es indicio de la formación de intermediarios. Dado que generalmente estas especies son más inestables que el estado nativo, y por ello se despliegan con mayor velocidad, la constante lenta es atribuida al desplegamiento de la especie nativa y las rápidas al de los intermediarios. El valor de las amplitudes asociadas con cada constante está relacionada directamente con la población de proteína que se desnaturaliza. Por lo tanto, el gráfico de las amplitudes contra el tiempo de renaturalización muestra el cambio en la población de proteína nativa e intermediario a lo largo del plegamiento (fig. 9), y su comportamiento depende del mecanismo (Kiefhaber, 1997).



**Figura 9.** Gráfico del cambio en la población de proteína nativa (N) e intermediario (I) a lo largo del plegamiento, proveniente de los experimentos de replegamiento interrumpido. Imagen modificada de (Kiefhaber, 2005)

## Análisis de valores $\phi$

Al igual que los intermediarios, el estudio del estado de transición es importante para dilucidar el mecanismo estructural del plegamiento de proteínas. Sin embargo, es complicado obtener información sobre las características de ambos estados a través de los métodos convencionales debido a que son especies transitorias. La estructura del estado de transición, así como de los intermediarios, puede ser inferida de manera indirecta al analizar el efecto que tienen diversas mutaciones puntuales sobre la energía de dichas especies, así como del estado nativo. Una mutación que afecte la energía del ET y el estado nativo de la misma manera indica que las interacciones formadas por dicho residuo en la estructura nativa también están presentes en ET. De manera contraria, una mutación que desestabiliza al estado nativo y no al ET indica que dichas interacciones se realizan después de la formación del ET. El análisis de valores  $\phi$  permite comparar el efecto que tienen las mutaciones sobre ambas especies (Itzhaki, 1995; Daggett 2003) y dichos valores se obtienen del cociente  $\Delta\Delta G_{D-ET} / \Delta\Delta G_{D-N}$ , donde  $\Delta\Delta G_{D-ET}$  y  $\Delta\Delta G_{D-N}$  son la diferencia de energía del ET y el estado nativo entre la proteína silvestre y la mutante. En el caso de los intermediarios, el cálculo de los valores  $\phi$  surge del cociente  $\Delta\Delta G_{D-I} / \Delta\Delta G_{D-N}$  (Friel, 2009). Valores  $\phi$  de 1 indican que ambas especies son igualmente desestabilizadas por la mutación, mientras que valores de 0 indican que solo el estado nativo es afectado (fig. 10). Por lo tanto, regiones con valores de 1 sugieren que la estructura de ET o I en esa zona es muy similar a la nativa, por el contrario, valores de 0 representan una región desestructurada (Itzhaki, 1995). Por otra parte, valores intermedios indican que dichas interacciones se forman en ET o I con menor fuerza que en el estado nativo o están presentes en sólo una fracción de la población, mientras que valores mayores a 1 son indicio de la presencia de interacciones no nativas (Capaldi, 2002). El análisis de valores  $\phi$  permite conocer el modelo que explica el plegamiento de las proteínas. Por ejemplo, para un modelo de difusión-colisión, la mutación de los residuos implicados en la formación de la estructura secundaria daría valores  $\phi$  cercanos a 1; en cambio, la mutación de residuos que estabilizan la estructura terciaria daría valores cercanos a 0. Por el contrario, en un modelo de nucleación-condensación los

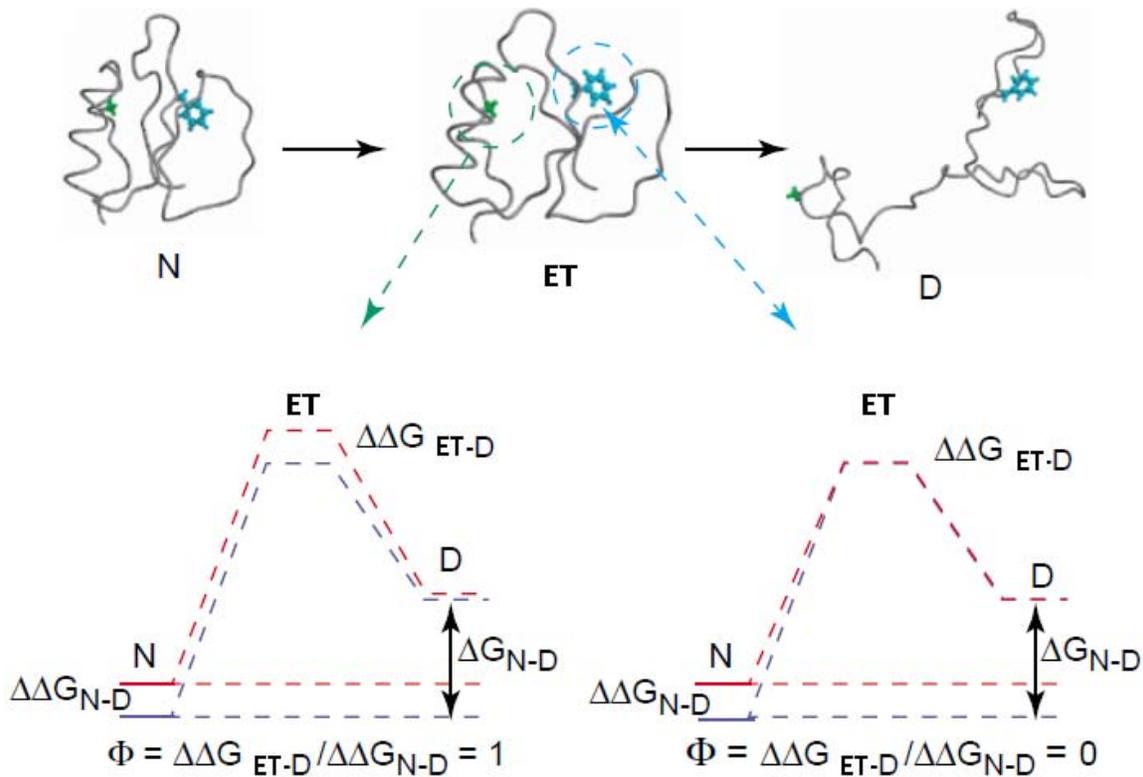
residuos que forman parte del núcleo de plegamiento presentarían valores cercanos a 1 y el resto de la proteína valores intermedios (Itzhaki, 1995; Morris, 2012).

### **Isomerización de prolinas**

Además de la presencia de intermediarios, otro factor importante en el plegamiento de proteínas es la heterogeneidad en el estado desnaturalizado, la cual puede generar vías alternas hacia la formación de la estructura nativa. La heterogeneidad surge principalmente de la isomerización *cis-trans* de residuos de prolina, así como de otros enlaces peptídicos. Puesto que es común encontrar este tipo de isomerización en los enlaces Xaa-Pro presentes en las proteínas, es importante estudiar el papel de la isomerización de dichos residuos en el proceso de plegamiento. Generalmente, una fracción de la población de prolinas se encuentra en *cis* y otra en *trans*, dependiendo de la naturaleza del residuo Xaa. Dado que en la mayoría de los casos dichos residuos están en una u otra configuración en el estado nativo, la configuración no nativa tiene que llevar a cabo una reacción de isomerización lenta durante el plegamiento. La presencia de isómeros no nativos puede tener diversos efectos: podría impedir la formación de cualquier tipo de estructura, llevar a la formación de intermediarios o, incluso en algunos casos, ser toleradas por la estructura nativa, generando estados alternativos (Pappenberger, 2003). Algunos estudios han mostrado que la isomerización de prolinas es relevante para la función de ciertas proteínas y para la regulación del ciclo celular. Cambios de configuración de prolinas en las proteínas Cdc25 y Wee1, propiciadas por la prolil isomerasa Pin1, promueven cambios conformacionales que modifican su función, permitiendo que la célula salga de la interfase y entre a la mitosis (Stukenberg, 2001)

En el plegamiento de proteínas es posible determinar la presencia de isomerización de prolinas a partir de la actividad de la enzima ciclofilina, la cual cataliza dicha reacción, o a partir de experimentos de doble salto. Los experimentos de doble salto consisten en la desnaturalización de diversas muestras de proteína manteniendo a cada una de ellas en dicho estado por un tiempo determinado, para después transferirlas a condiciones nativas y monitorizar el proceso de replegamiento. El experimento se repite variando el tiempo en el que la muestra permanece en condiciones desnaturalizantes. Dado que en el estado

nativo los residuos de prolina presentan una configuración específica y su isomerización es un proceso lento, su efecto en el plegamiento desaparecerá cuando la muestra se mantenga en condiciones desnaturalizantes por tiempos cortos, debido a que no habrá tiempo suficiente para que las prolinas adquieran una configuración diferente a la que se encuentra en la estructura nativa. Por otra parte, su efecto reaparecerá cuando la proteína se mantenga desplegada por tiempos largos ya que las prolinas podrán isomerizar y adquirir la configuración incorrecta antes de iniciar el repliegamiento.

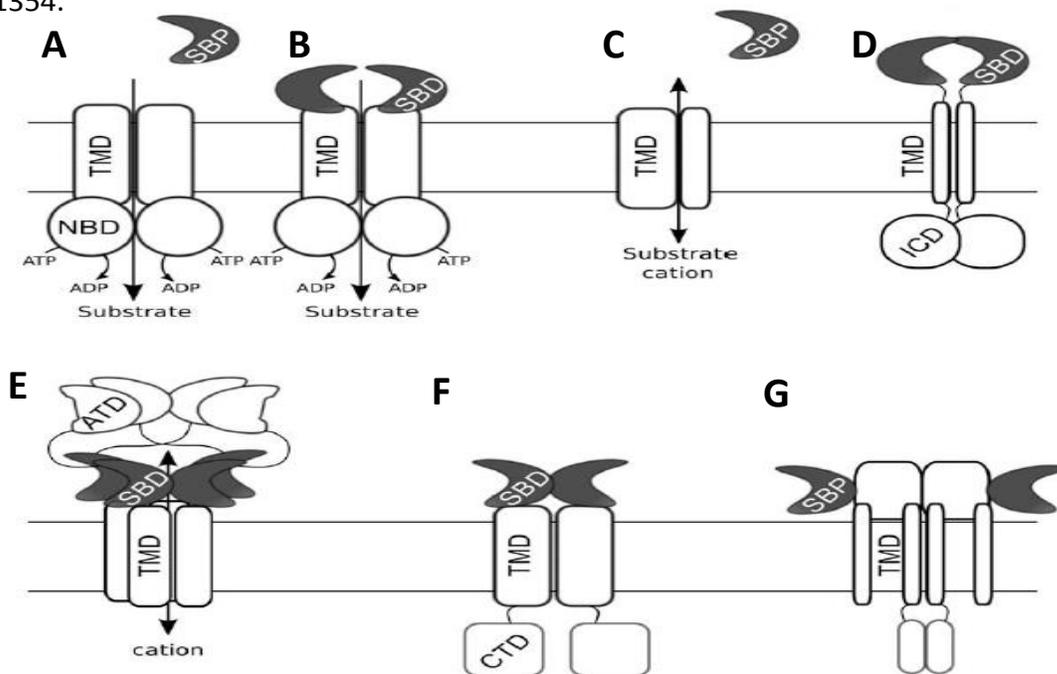


**Figura 10.** Análisis de valores  $\phi$  para la mutación de un residuo (círculo punteado verde) cuya estructura en el estado de transición es igual que en el estado nativo ( $\phi=1$ ), y uno (círculo punteado azul) que no presenta estructura en ET ( $\phi=0$ ) *Imagen modificada de (Dagget, 2003).*

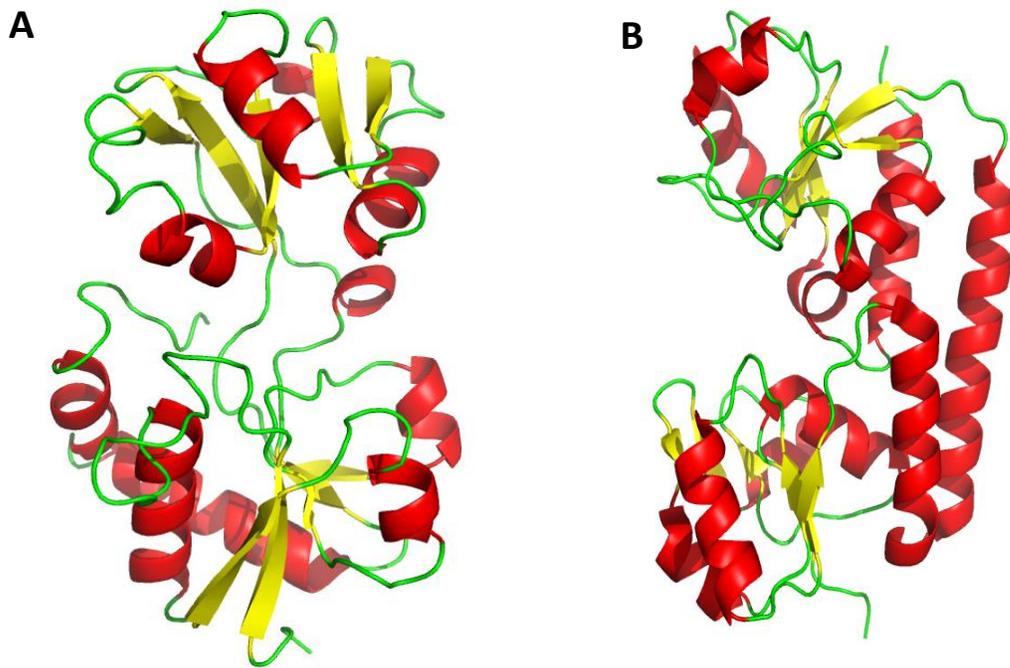
### Proteínas de unión a ligando (SBPs)

La familia de proteínas de unión a ligando (SBP) son una clase de proteínas asociadas a complejos de membrana implicados en transporte y señalización, como son los transportadores ABC (donde fueron inicialmente identificadas), sistema de dos componentes, proteínas G acopladas a receptores y canales iónicos, entre otros (fig. 11).

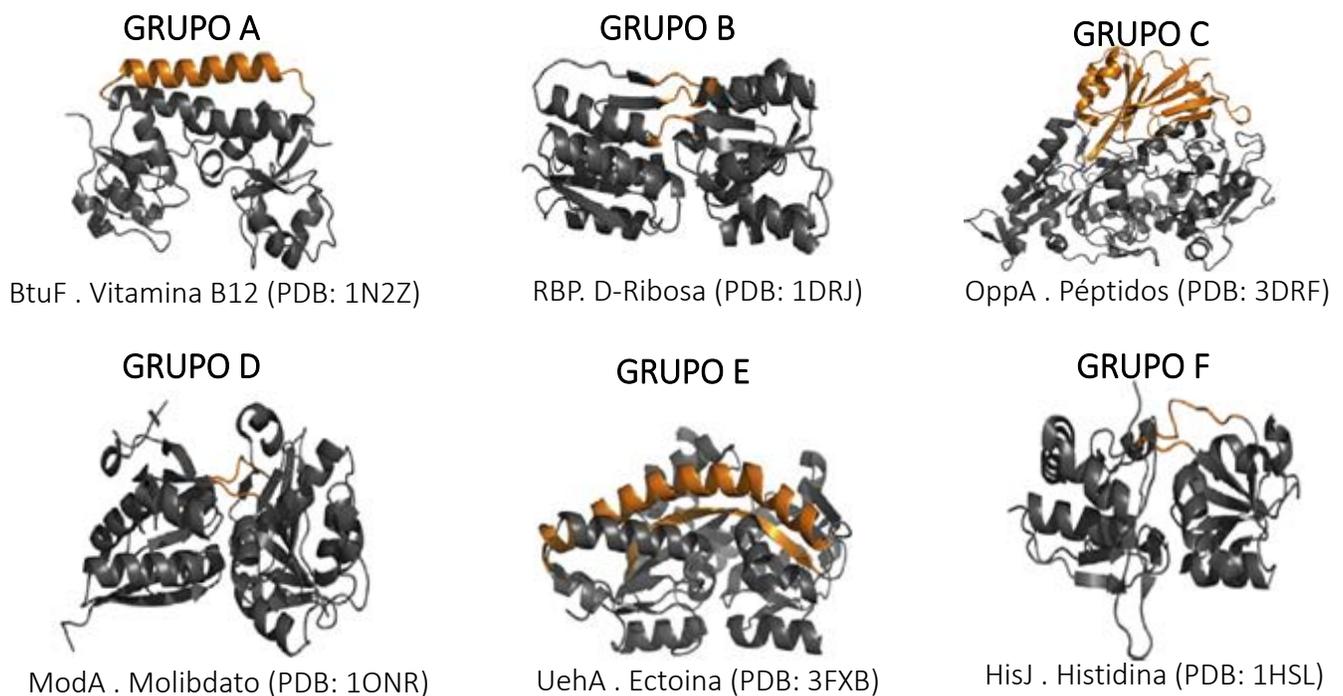
Todas las SBPs presentan una estructura bilobular (fig.12) y cada dominio muestra un plegamiento tipo Rossmann (hoja  $\beta$  mixta rodeada por hélices  $\alpha$ ). La zona que conecta ambos dominios es conocida como bisagra y puede presentar características estructurales diferentes, a partir de las cuales las SBPs se clasifican en seis grupos principales (fig. 13) (Berntsson, 2010). En las proteínas del grupo A la bisagra está formada por una hélice  $\alpha$  mientras que las del grupo B está formada por tres segmentos polipeptídicos cortos. Las SBPs del grupo C presentan un dominio extra en dicha región, por lo cual son mucho más grandes, mientras que la bisagra de las proteínas del grupo D está constituida por dos segmentos polipeptídicos cortos. Por último, la bisagra de las proteínas del grupo E consiste en una hélice  $\alpha$  muy larga y una hebra  $\beta$ , mientras que en el grupo F está constituida por dos segmentos polipeptídicos de casi el doble de tamaño en comparación con los que forman a la bisagra del grupo D. En otra clasificación propuesta por Fukami-Kobayashi en 1999, las SBPs se agrupan en dos conjuntos de acuerdo al número y posición de las hebras  $\beta$  que conforman la región central de cada lóbulo. Las proteínas de tipo I presentan seis hebras  $\beta$  en orden 213456 dentro de la hoja y las de tipo II presentan solo cinco, en orden 21354.



**Figura 11.** SBDs asociadas a: (A y B) transportadores ABC, (C) transportadores TRAP, (D) receptores asociados a la guanilato ciclasa, (E) canales iónicos, (F) receptores asociados a proteínas G y (G) sistema de dos componentes. Imagen (Berntsson, 2010).

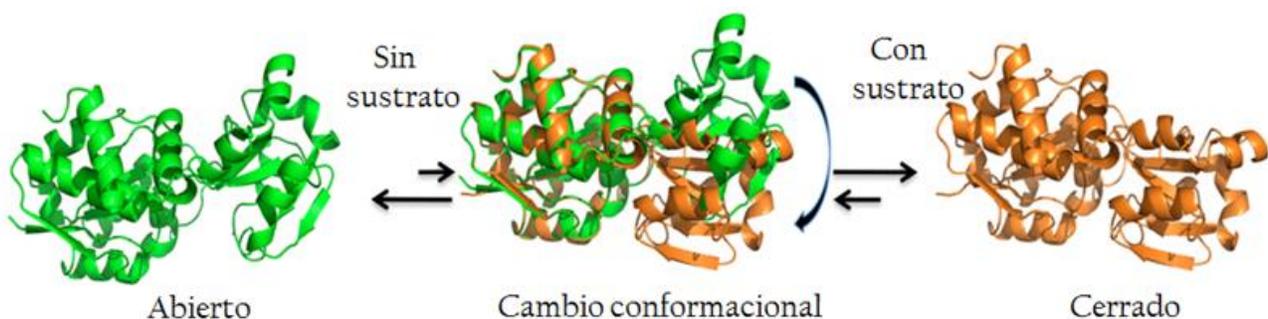


**Figura 12.** Estructura general de las SBPs. (A), Proteína de unión a histidina y (B) proteína de unión a vitamina B12. PDB: 1HSL y 1N2Z respectivamente.

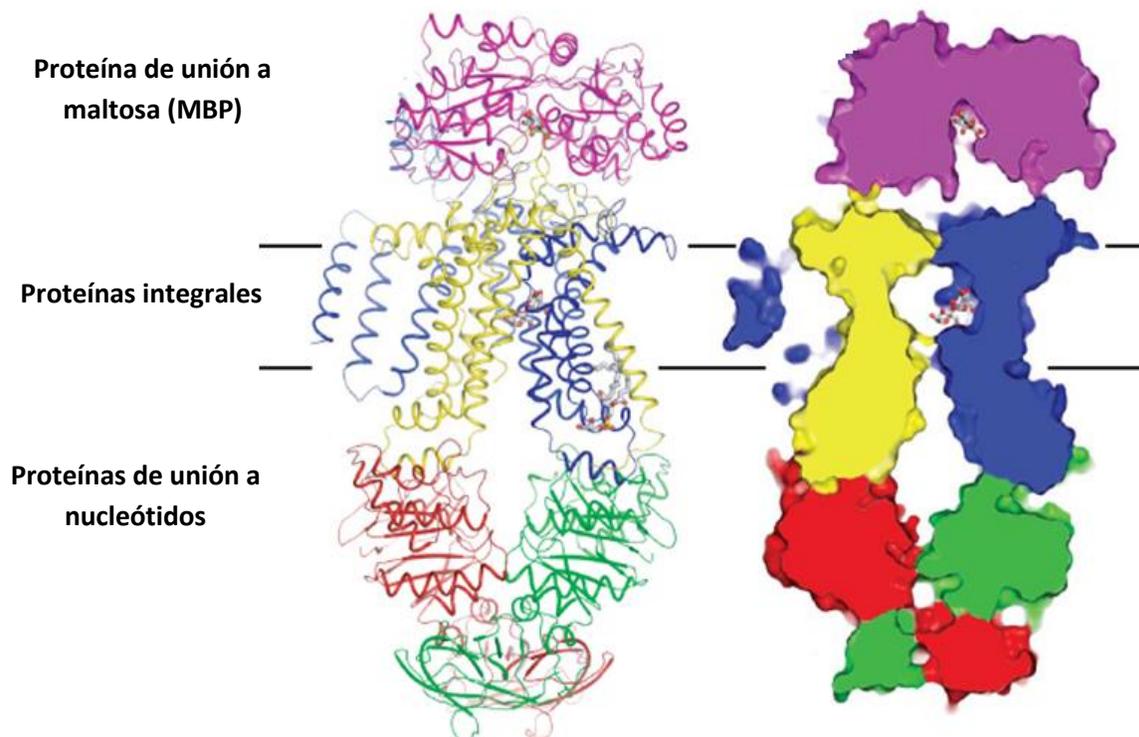


**Figura 13.** Clasificación de las SBPs de acuerdo a las diferencias estructurales que presentan en la zona de bisagra (naranja). (Berntsson, 2010). En la parte inferior se encuentran los nombres, ligandos y códigos PDB de las estructuras mostradas.

En bacterias gram negativas las SBPs asociadas a transportadores ABC se conocen como proteínas periplásmicas de unión (PBPs) y están implicadas en el transporte hacia el citoplasma de bacterias y archaeas de diversas moléculas como amino ácidos, péptidos, azúcares, vitaminas e iones inorgánicos. El proceso de unión es acompañado por un gran cambio conformacional. Se ha propuesto que en ausencia de ligando, las PBPs se encuentran en un estado conformacional abierto, mientras que en presencia de ligando se encuentran en una conformación cerrada (fig. 14), uniéndose al ligando en la zona de bisagra y manteniéndolo totalmente aislado del solvente (Oh, 1994). Las PBPs, en conjunto con su respectivo transportador, forman los sistemas de transporte periplásmico bacteriano (permeasas). En estos sistemas, el transportador es un complejo formado por dos proteínas integrales y dos de proteínas unión a nucleótido ubicadas en el citoplasma (fig 15). En ausencia de PBP, el complejo de membrana se encuentra abierto del lado del citoplasma y cerrado del lado del periplasma. Una vez que la PBP ha unido a su ligando, interactúa con el complejo, el cual sufre un cambio conformacional que cierra el extremo citoplasmático. Posteriormente, la unión de ATP a las proteínas de unión a nucleótido, promueve la apertura del extremo periplasmático del complejo así como de la PBP y de esta manera el sustrato puede unirse al sitio de unión del transportador. La hidrólisis del ATP propicia la liberación de la PBP y la translocación del sustrato hacia el citoplasma (Oldham, 2011).



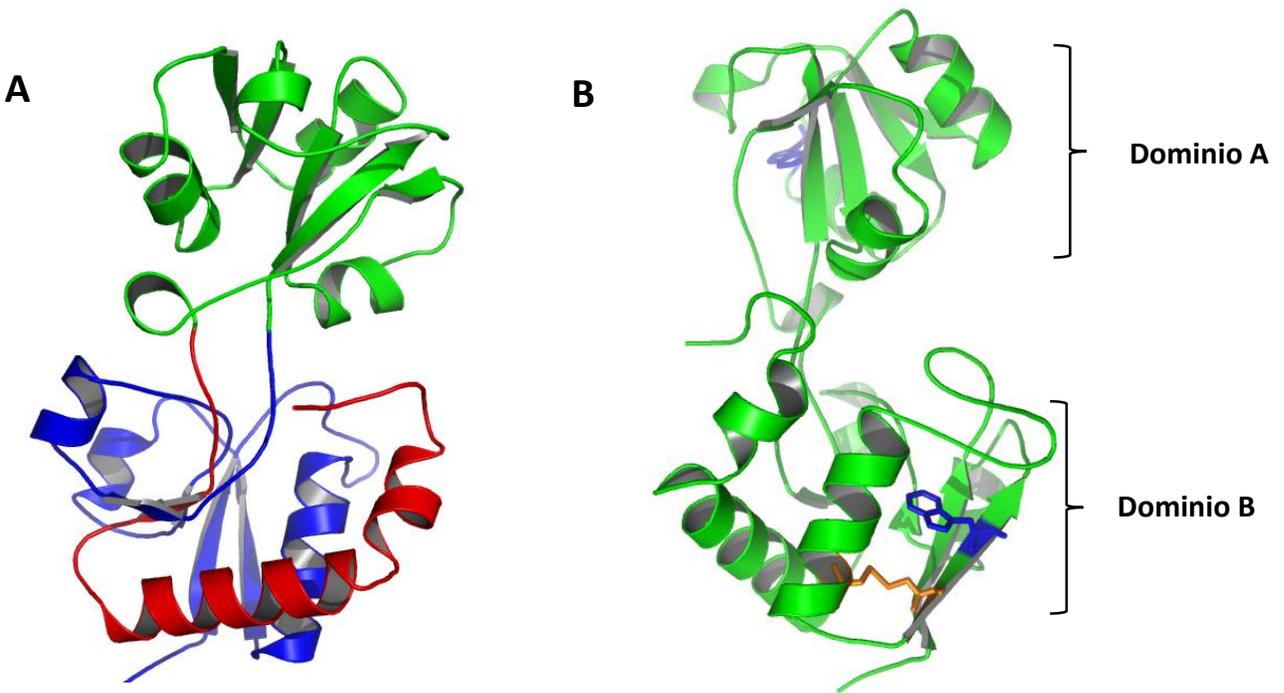
**Figura 14.** En ausencia de ligando, las PBPs se encuentran en un estado conformacional abierto (verde). En presencia de ligando, dichas proteínas sufren un cambio conformacional que las lleva a un estado cerrado (naranja). Imagen modificada de (Hoepfner, 2013).



**Figura 15.** Estructura del sistema de transporte periplásmico de maltosa. En morado se muestra la proteína de unión a maltosa, en azul y amarillo las proteínas integrales del complejo de membrana, mientras que en rojo y verde se ilustran las proteínas de unión a nucleótidos (Oldham, 2011).

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

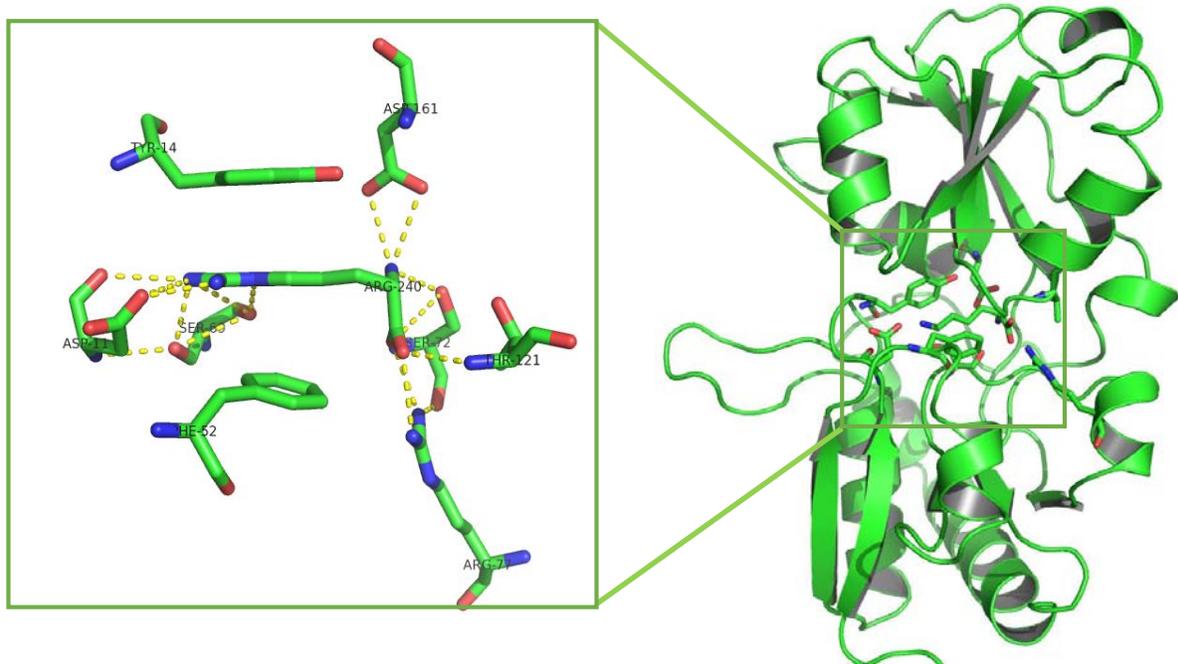
La proteína de unión a lisina-arginina-ornitina (LAO) es una PBP de 238 aminoácidos la cual, al igual que todas las PBPs, presenta dos dominios estructurales. El primero (A) es discontinuo y está formado por los residuos 1 al 88 y 195 al 238, el segundo (B) es continuo y lo forman los residuos 93 al 185 (fig. 16A). Cada dominio está constituido a su vez por 5 hebras  $\beta$ , cuatro paralelas y una antiparalela, rodeadas por 4 hélices  $\alpha$ , y están conectados por dos segmentos polipeptídicos (residuos 89 al 92 y 186 al 194). LAO tiene un puente disulfuro entre los residuos 38 y 45, y dos triptofanos en las posiciones 47 y 130 (fig.16B), los cuales permiten seguir modificaciones estructurales a partir de cambios de fluorescencia intrínseca (Oh, 1993).



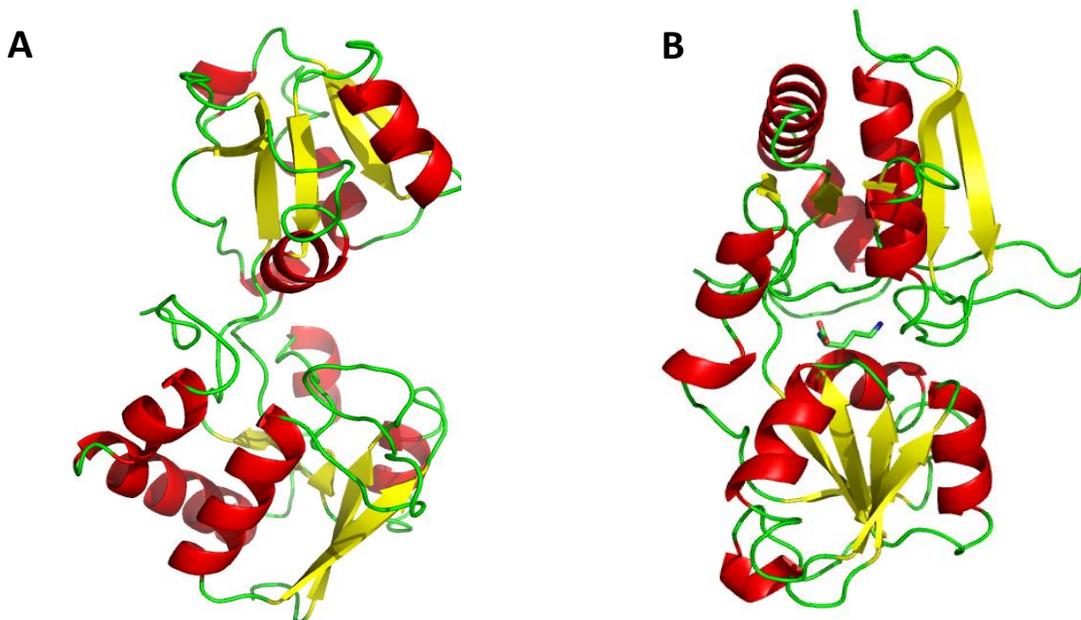
**Figura 16.** (A) Estructura de LAO en estado abierto, en rojo y azul se muestran los segmentos de la secuencia que componen al lóbulo A y en verde se muestra la continuidad del lóbulo B. (B) En naranja se observa el puente disulfuro formado por los residuos 38 y 45, los triptofanos 47 y 130 se encuentran en azul. [PDB: 2LAO](#)

La afinidad de LAO por lisina, arginina, ornitina e histidina es de 14, 15, 30 y 500 nM, respectivamente, de acuerdo a estudios de diálisis al equilibrio. La estructura cristalográfica muestra que la unión de LAO a sus ligandos se lleva a cabo a través de la interacción de los grupos  $\alpha$ -amino y  $\alpha$ -carboxilo con los residuos Arg-77, Asp-161, Ser-70, Ser-72 y Thr-121 (fig. 17). Por otra parte, los anillos aromáticos de la Tyr-14 y la Phe-52 mantienen a la cadena lateral en una estructura tipo “sandwich” y los residuos Asp-30 y Ser-69 interactúan indirectamente a través de moléculas de agua. Estas interacciones conservan al ligando completamente aislado del solvente. El cambio conformacional que presenta LAO después de la unión del ligando es un movimiento de cuerpo rígido de un lóbulo con respecto al otro, en el cual la cadena principal de ambos dominios no sufre modificaciones (fig. 18). Este movimiento es una rotación de  $52^\circ$  alrededor de un eje imaginario ubicado en la zona de bisagra, formada por los dos segmentos polipeptídicos que conectan a los dominios A y B. Los residuos presentes en esta región que sufren modificaciones en sus ángulos  $\phi$  y  $\psi$  durante el cambio conformacional son la Ala-90 ( $\psi$   $52^\circ$ ) y Ser-92 ( $\psi$   $22^\circ$ ) en el primer

segmento polipeptídico, y Tyr 190 ( $\phi$  23°) y Asp 193 ( $\psi$  34°,  $\phi$  22°) en el segundo. El análisis de la estructura muestra que no existen interacciones directas entre el ligando y la bisagra, lo cual indica que el ligando no provoca directamente el cambio conformacional (Oh, 1994).



**Figura 17.** Sitio de unión de LAO en presencia de arginina. El grupo amino interacciona con los residuos D161 y S72 mientras que el carboxilo interacciona con T121 y R77. La cadena lateral es mantenida en una estructura tipo "sandwich" por los residuos Y14 y F52, mientras que el grupo guanido interacciona con la S60 y D11.



**Figura 18.** (A) Estructura de LAO en estado abierto y B) cerrado en presencia de arginina. [PDB: 2LAO, 1LAF](#)

A partir de estudios de calorimetría de titulación isotérmica realizados en el laboratorio (Pulido, 2015) se han obtenido los valores de  $\Delta C_p$ ,  $\Delta H$  y  $\Delta S$  para la unión de LAO a histidina y arginina, ligandos de alta y muy alta afinidad, respectivamente. El  $\Delta H$  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 a ambos ligandos está guiada por cambios en la 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 forma el grupo guanidino de la cadena lateral de arginina con el Asp-11 de LAO, los cuales no se encuentran presentes en la histidina. El valor de  $\Delta C_p$  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).

### **Plegamiento de PBPs: Proteína de unión a Maltosa**

Se han realizado algunos estudios sobre el plegamiento de la proteína de unión a maltosa (MBP), una PBP de 370 aminoácidos. El grupo de Varadarajan (Ganesh. 1997) llevó a cabo experimentos de calorimetría de barrido diferencial (DSC) y desnaturalización inducida por cloruro de guanidinio. Todas las trazas calorimétricas que obtuvieron en un intervalo de pH de 4.5 a 10.4 presentaron una reversibilidad mayor al 80% y se ajustaron muy bien a un modelo de dos estados. El  $\Delta G_{ND}$  a 28 C°, pH 7.4, obtenido a partir de la ecuación de Gibbs - Helmholtz, fue de  $10.2 \text{ Kcal mol}^{-1}$ . La curva de desnaturalización inducida por cloruro de guanidinio a pH 7.4 y 28C°, se ajustó muy bien a un modelo de dos estados y el  $\Delta G_{ND}$  calculado fue de  $9.1 \text{ Kcal mol}^{-1}$ . Este conjunto de datos sugieren que el plegamiento de MBP, al equilibrio, es un proceso de dos estados.

Por otra parte, estudios de desnaturalización utilizando espectroscopia de fuerza atómica de molécula única, realizados por el grupo de Ainarapu (Ainarapu, 2011), indican que

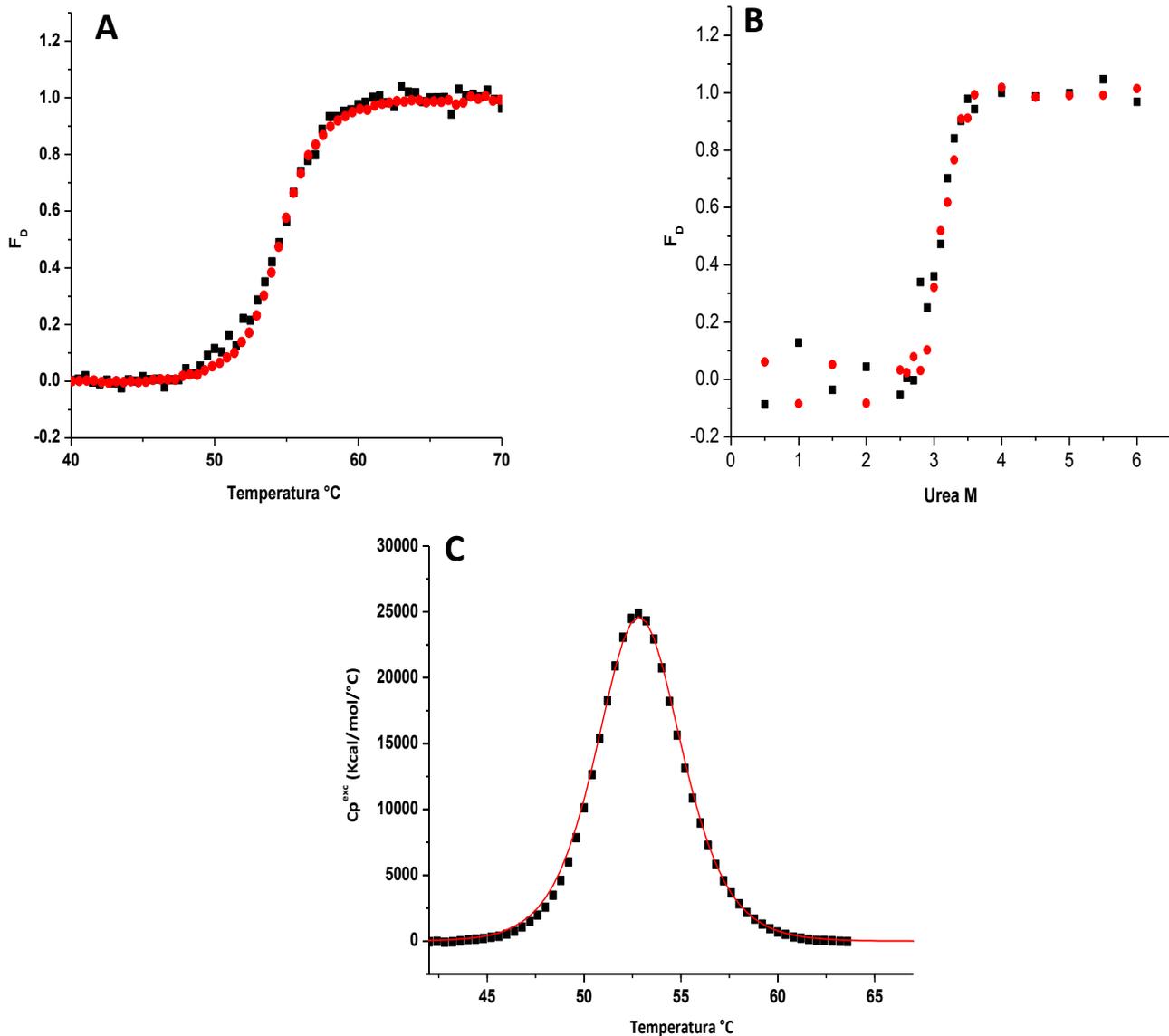
MBP presenta un mecanismo de plegamiento de vías paralelas. El 62 % de las moléculas que se desplegaron perdieron su estructura en dos pasos, indicativo de la presencia de un intermediario mecánicamente estable, mientras que el 38 % restante se desplegó en un solo paso. Diversos ciclos de plegamiento y desplegamiento de una misma molécula mostraron que efectivamente MBP puede plegarse en una sola etapa o a partir de un intermediario. Del análisis conjunto de los datos obtenidos y la estructura cristalográfica, Ainavarapu y colaboradores proponen que el dominio amino y las hélices  $\alpha$  del dominio carboxilo de MBP están desplegados en el intermediario.

### **Plegamiento de PBPs: Proteína de unión a Histidina**

La caracterización del proceso de plegamiento de HisJ es menos detallada en comparación al proceso de MBP. Estudios de DSC realizados por el grupo de Shnyrov muestran que la desnaturalización térmica de HisJ es un proceso de tres estados. De acuerdo al análisis realizado, las trazas calorimétricas, cuya reversibilidad fue mayor al 90 %, son compatibles con un esquema de dos transiciones independientes de dos estados. Basado en la estructura bilobular de HisJ, Shnyrov y colaboradores propusieron que cada transición corresponde a la desnaturalización independiente de cada lóbulo (Kreimer, 2000).

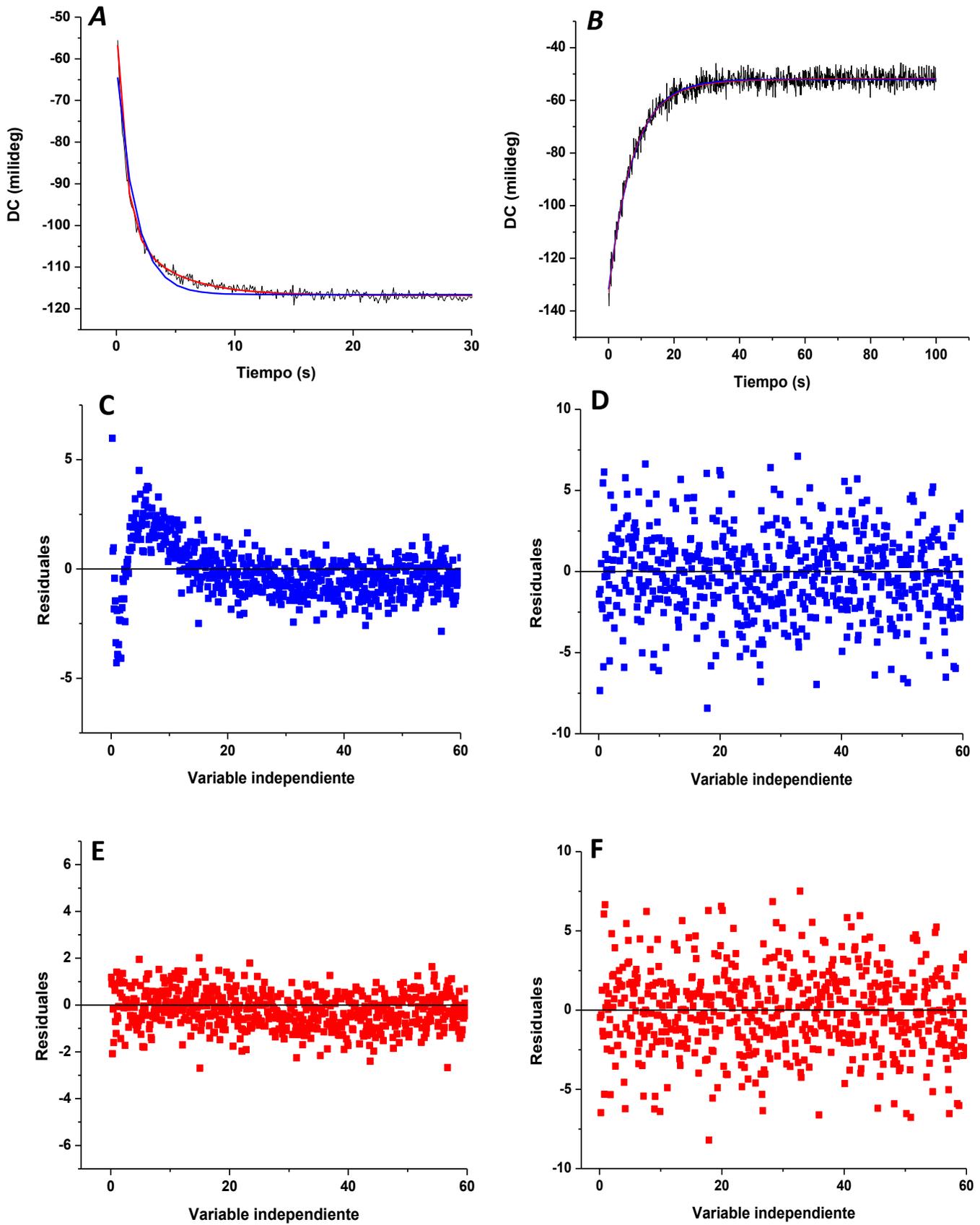
### **Estudios de plegamiento de LAO**

Los estudios termodinámicos que se han realizado en el laboratorio sobre el desplegamiento de LAO (Vergara, 2011) han mostrado que dicho proceso presenta un comportamiento de dos estados. Las curvas de desnaturalización térmica seguidas por técnicas espectroscópicas (IF y DC), así como las trazas calorimétricas de los experimentos de DSC, mostraron una sola transición (fig. 19). Los parámetros termodinámicos ( $\Delta H$ ,  $T_m$  y  $\Delta C_p$ ) obtenidos por las diferentes técnicas fueron coincidentes. Del mismo modo, las curvas de desnaturalización inducida por urea se ajustaron adecuadamente a un modelo de dos estados. En conjunto estos resultados indican que el desplegamiento de LAO no presenta intermediarios estables.

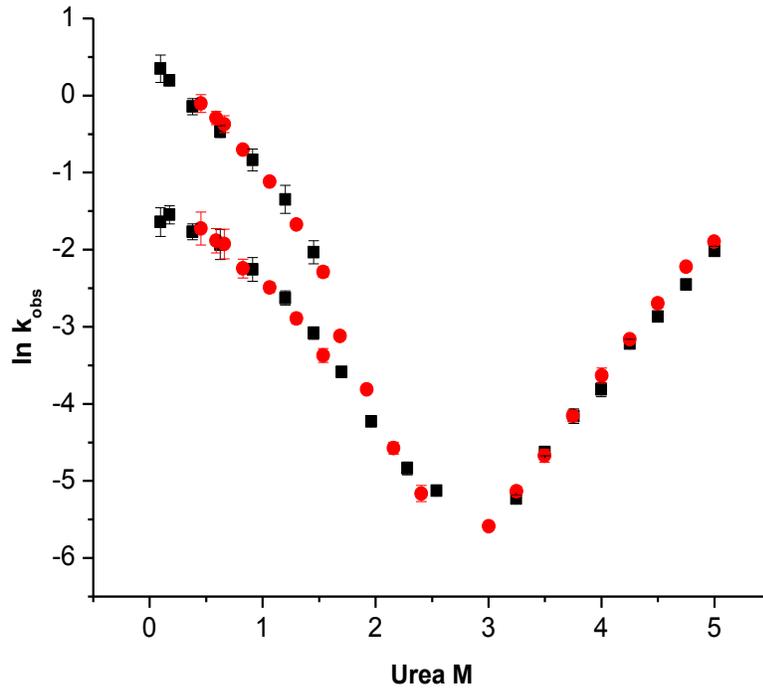


**Figura 19.** Curvas de desnaturalización térmica (A) e inducida por urea (B) de LAO a pH 9.0, seguida por IF (■) y DC (■). Traza calorimétrica de LAO en las mismas condiciones (C).

Por el contrario, los experimentos cinéticos mostraron una mayor complejidad. Las curvas de renaturalización a concentraciones bajas de desnaturalizante (0.45 a 1.5 M de urea), obtenidas por IF y DC, son biexponenciales (fig. 20), lo cual ocasiona la presencia de dos ramas en ésta zona del chevron, ambas con curvatura (fig. 21). En contraste, las cinéticas de desnaturalización fueron monoexponenciales y ésta rama del chevron no mostró curvatura.



**Figura 20.** Cinéticas de renaturalización (A) y desnaturalización (B) en 0.45M y 5M de urea respectivamente. Residuales de los ajustes a una (■) y dos exponenciales (■) de las cinéticas A (C y E) y B (D y F).



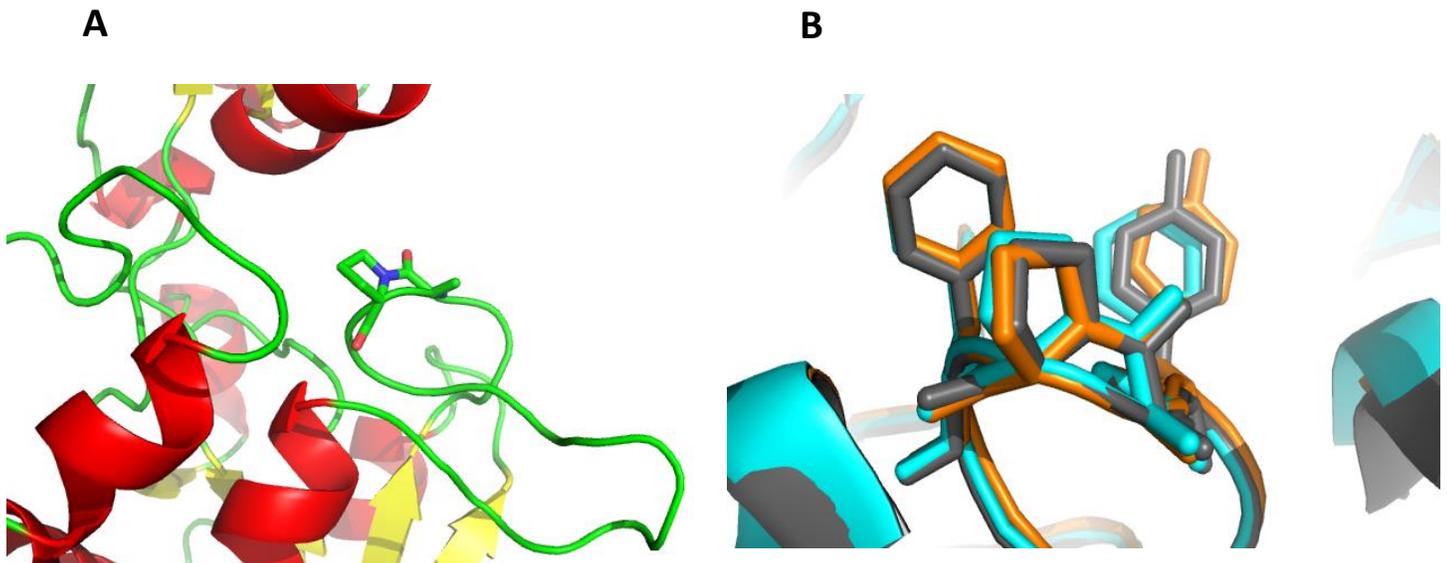
**Figura 21.** Comparación de los gráficos de Chevron de los experimentos cinéticos seguidos por DC (■) e IF (●). (Vergara, 2011)

La presencia de varias ramas en el chevron -dos de ellas con curvatura- implica algún tipo de heterogeneidad en el estado desplegado, como la presencia de isómeros de prolina en configuración *cis* y *trans*, y sugiere la existencia de al menos un intermediario, el cual puede estar fuera o dentro de la vía de plegamiento, formando parte de vías paralelas o secuenciales. Existen por lo tanto varios modelos cinéticos compatibles con los datos experimentales. Una de las motivaciones centrales de esta tesis es llevar a cabo los experimentos y análisis requeridos para determinar cuál es el mecanismo cinético del plegamiento de LAO. Los experimentos de doble salto y replegamiento interrumpido son dos herramientas que permiten discriminar entre diversos modelos de plegamiento. De igual manera, los experimentos en presencia de ciclofilina y la mutagénesis dirigida permiten determinar el papel de las prolina en el mecanismo de plegamiento.

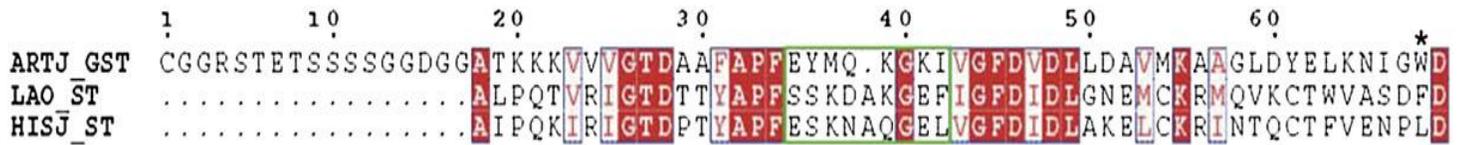
## Mutante de LAO, P16A

La gran mayoría de los enlaces peptídicos en las proteínas presentan la configuración *trans*; sin embargo, los residuos de prolina pueden presentarse con frecuencia en la configuración *cis*. La interconversión *cis/trans* del enlace peptídico de los residuos de prolina en las proteínas muestra una energía de activación relativamente alta, es por ello que cuando una proteína presenta una prolina en *cis* en el estado nativo, generalmente se observa una fase lenta en el replegamiento. El análisis de la estructura cristalográfica de LAO muestra la presencia de una prolina en configuración *cis* en la posición 16 (fig. 22A), la cual podría ser la responsable de la fase lenta observada en el replegamiento de LAO (fig. 20 y 21)

Este residuo se encuentra ubicado cerca del sitio de unión, en un asa importante para el reconocimiento del transportador en la membrana celular, y está conservado entre las PBPs que unen aminoácidos. (Fig. 23). Tanto en LAO como en HisJ y ArtJ (PBP responsable del transporte de arginina en *Bacillus stearothermophilus*) la P16, así como los residuos aledaños igualmente conservados (A15, F17 y Y18), presentan la misma conformación (fig. 22B). Para determinar el efecto de P16 en el plegamiento y la unión de ligandos a la proteína LAO, se estudiara la mutante P16A.



**Figura 22.** A) Prolina 16 en configuración *cis* en la estructura de LAO. B) Residuos APFY correspondientes a las posiciones 14, 15, 16 y 17 en LAO (azul) e HisJ (naranja), y a las posiciones 31, 32, 34 y 34 en ArtJ (negro). PDB: LAO (1LST), HisJ (1HSL) y ArtJ (2Q2A).



**Figura 23.** Alineamiento de los primeros 70 residuos de ArtJ con los primeros 50 residuos de LAO e HisJ. En letras blancas se muestran las posiciones conservadas en las tres PBPs, en rojo se muestran las conservadas en dos de ellas, y en un recuadro verde se encuentran los residuos que interaccionan directamente con el transportador de histidina. Imagen (Vahedi- Faridi, 2007)

**OBJETIVO**

Las PBPs son un grupo de proteínas cuyo tamaño y complejidad es superior a la mayor parte de los modelos estudiados hasta el momento. Dado que comparten una estructura general, las PBPs son un buen modelo para el estudio comparativo del plegamiento. Por ello, el objetivo general de este trabajo es la caracterización del mecanismo de plegamiento de la proteína LAO, así como el estudio de las repercusiones estructurales y funcionales de la mutación P16A.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Generación de la mutante P16A**

La mutante P16A se generó en colaboración con el Biólogo Haven Arturo López Sánchez. Para ello se sintetizaron oligonucleótidos en los cuales se sustituyó el codón CCT que codifica para la prolina 16 por GCT que codifica para alanina y se realizó una PCR en presencia del plásmido portador del gen de LAO silvestre y DNA polimerasa *Pfu* Turbo. Posteriormente el DNA parental metilado se degradó al agregar endonucleasa DpnI y el plásmido con la mutación producto de la PCR se transformó en células competentes de la cepa de *E. coli* XL1-Blue para su posterior purificación.

### **Purificación de LAO y LAO P16A**

La sobreexpresión de LAO y LAO P16A se realizó en células de la cepa BL21 AI de *Escherichia coli*, las cuales tienen el gen de la RNA polimerasa T7 bajo el control del promotor *araBAD*. Se transformaron 100 µL de células electrocompetentes con el plásmido portador del gen de LAO silvestre o mutante (PET 12b) y se inocularon dos tubos de 10 mL de medio LB + 100 µg/mL de ampicilina (50 µL de células por tubo). Ambos cultivos se crecieron toda la noche a 37 °C, 250 rpm. Posteriormente se inocularon dos matraces de 1L con 250 mL de medio YT2x (1.6% de triptona, 1% de extracto de levadura y 1% de NaCl) + 100 µg/mL de ampicilina, cada uno con un tubo de LB, y se incubaron por una hora en las mismas condiciones de agitación y temperatura. Es muy importante que a partir de este paso se use sólo medio YT2x. Transcurrido el tiempo de incubación se transfirió cada cultivo a un matraz de 2 L con 750 mL de medio + ampicilina y se dejó crecer hasta alcanzar una DO<sub>550</sub> entre 0.8 y 1. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada se indujo la expresión de LAO agregando arabinosa al 0.25% y se incubó por un tiempo de 4 hr. Después de la expresión, los 2 L de medio se colectaron en seis tubos de centrifuga para el rotor SLA-1500 y se centrifugaron a 5000 rpm por 15 min. Se desechó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en una solución de Tris 50 mM, pH 7.5 (50 mL por tubo), para lavar y eliminar el medio remanente. Las células se juntaron en solo dos tubos y se centrifugaron a 5000 rpm por 15 min. Se desechó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en una

solución de sacarosa al 20% y 1 mM de EDTA, en amortiguador de acetato de potasio (AcK) 10 mM, pH 5.1 (150 mL por tubo). Se dejó reposar en hielo por 10 min y se centrifugó a 5000 rpm por 15 min. Nuevamente se desechó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió por tercera ocasión, ahora en una solución de AcK 10 mM, pH 5.1, sin sacarosa ni EDTA (30 mL por tubo), esto con el fin de provocar un choque osmótico y permitir la liberación de LAO del periplasma celular. Se centrifugó por última ocasión, a 10000 rpm por 20 min y se colectó el sobrenadante, el cual contiene a la proteína.

Los 60 mL de sobrenadante se filtraron con un filtro WHATMAN® para jeringa, de 0.2 µm, y posteriormente se concentró hasta un volumen de 10 mL en un tubo Amicon® 8400. Se agregó una solución de bis-tris-propano 5 mM, pH 8.5, con 2 M de cloruro de guanidinio (GdnCl), hasta un volumen de 50 mL y se volvió a concentrar a 10 ml. Esto se realizó cinco veces con el objetivo de desnaturalizar a LAO y eliminar la mayor cantidad posible de ligando. Después de ello, se agregó amortiguador bis-tris-propano 5mM, pH 8.5, hasta un volumen de 50 mL y nuevamente se concentró hasta 10 ml. Al igual que con el GdnCl, este procedimiento se realizó cinco veces para eliminar el desnaturalizante y propiciar la renaturalización de la proteína. Para el tubo Amicon® se usaron membranas de celulosa con poros de 5 kDa.

Para purificar la proteína se usó una columna de intercambio aniónico (Source 15Q) equilibrada con bis-tris-propano 5 mM, pH 8.5, conectada a un equipo de HPLC Waters 600. Se colectaron los 10 mL de muestra del tubo Amicon® y se filtraron. La muestra se inyectó en el equipo y posteriormente se aplicó un gradiente de 0% a 30% de una solución de NaCl 250 mM, en un tiempo de 90 min. La proteína eluyó a una concentración de 50 mM (20%) de sal. Las fracciones con la proteína se colectaron en un tubo Amicon® Ultra de 4 mL y se concentraron hasta un volumen de aproximadamente 2 mL por centrifugación a 5000 rpm. La muestra se diluyó con una solución de bis-tris propano 10 mM hasta un volumen de aproximadamente 4 ml, y se volvió a concentrar hasta 2 mL. Este procedimiento se repitió 5 veces con el fin de eliminar la sal proveniente del gradiente y dejar a la proteína en el amortiguador al pH requerido para los experimentos. Es importante agitar el tubo antes de

cada centrifugación. Por último, la muestra se llevó a un volumen de 4 mL y se alicuotó en fracciones de 1 mL, las cuales se refrigeraron.

### **Experimento de doble salto**

Un experimento de doble salto consiste en la desnaturalización de diversas muestras de proteína manteniendo a cada una de ellas en dicho estado por un tiempo determinado, para después transferirlas a condiciones nativas y monitorizar el proceso de replegamiento. En la primera etapa o salto, se colocó una muestra de LAO en 2M de urea (condición nativa necesaria para llegar a la concentración de desnaturalizante requerida), a 2.2 mg/mL en la jeringa A del módulo de *stopped flow* de un espectropolarímetro Chirascan™ de Applied Photophysics (fig. 24), y urea 10 M en la jeringa B. Dichas soluciones se mezclaron en el conector de 4 entradas (relación 1:1) desnaturalizando a LAO a una concentración de urea de 6 M. La proteína permaneció en tales condiciones por tiempos de 0 a 240 segundos. Posteriormente, en la segunda etapa o salto, la muestra desnaturalizada se mezcló con amortiguador en la cámara de observación (relación 1:10) hasta alcanzar una concentración final de urea de 0.5 M (condiciones nativas). Las cinéticas de replegamiento se monitorizaron siguiendo la señal de dicroísmo circular a 220 nm.

Todos los experimentos mostrados en esta tesis se realizaron a una temperatura de 25°C y a una concentración final de proteína de 0.1 mg/ml, utilizando como amortiguador bis tris propano 10 mM, pH 9.0.

### **Ensayos de desnaturalización de ciclofilina (CyP)**

La enzima ciclofilina utilizada en este trabajo fue sobrexpresada y purificada por el Biólogo Haven Arturo López Sánchez. Ya que el efecto de esta enzima sobre el replegamiento de LAO se estudia en presencia de urea, se realizaron experimentos de desnaturalización de ciclofilina a distintas concentraciones de desnaturalizante (0.25 a 8 M) para conocer su estabilidad. Las muestras se excitaron a 295 nm y se midió la señal de fluorescencia a 325 nm en un espectrofluorómetro ISS PC1, utilizando celdas de cuarzo de 0.5 cm de paso de luz.

## Experimento de renaturalización en presencia de CyP

Por una parte, se realizaron experimentos de renaturalización de LAO en presencia de distintas concentraciones de CyP (1 a 10  $\mu\text{M}$ ). Para ello, se colocó una muestra de proteína a 1.1 mg/ml, la cual se desnaturalizó en 5 M de urea, en la jeringa A del módulo de *stopped flow*, y amortiguador con CyP en la jeringa B. Ambas soluciones se mezclaron en la cámara de observación (relación 1:10) alcanzando una concentración final de urea de 0.45 M. Las cinéticas de replegamiento se monitorearon siguiendo la señal de dicroísmo circular a 220 nm.

Por otra parte, se llevaron a cabo ensayos de replegamiento a varias concentraciones de urea, en presencia de una concentración fija de CyP. Al igual que en los experimentos mencionados anteriormente, una muestra de LAO a 1.1 mg/ml, desnaturalizada en 5M de urea, se mezcló en la cámara de observación (relación 1:10) con una solución amortiguadora a la concentración de urea adecuada para llegar a concentraciones finales de desnaturizante de 2.75 M a 0.45 M. Todas las cinéticas replegamiento se realizaron en presencia de 5  $\mu\text{M}$  de CyP y se siguieron por dicroísmo circular a 220 nm.

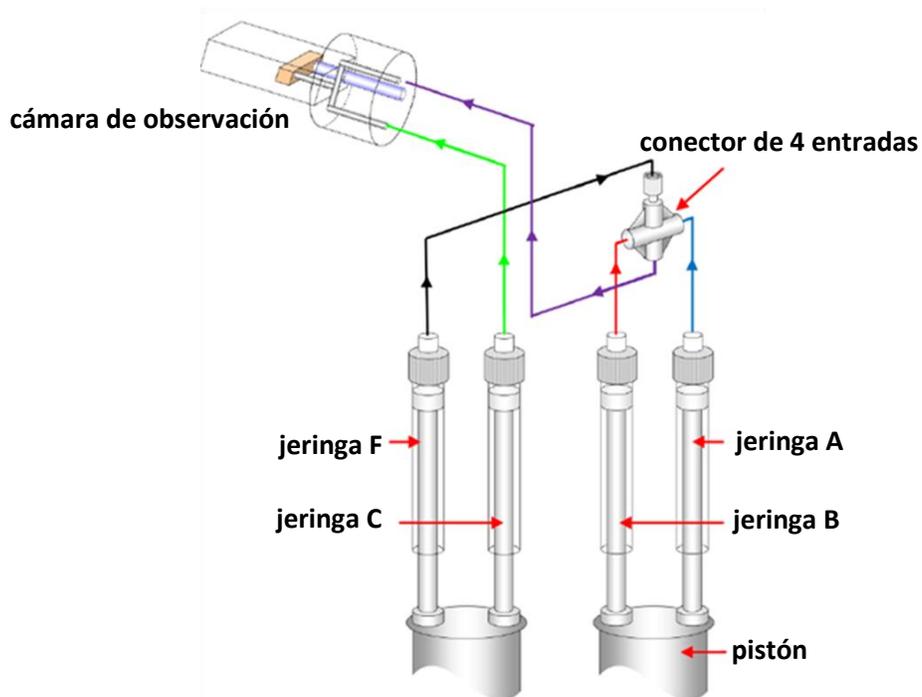


Figura 24. Módulo de *stopped flow* de un espectropolarimetro Chirascan™ de AppliedPhotophysics

### **Experimento de replegamiento interrumpido**

Los experimentos de replegamiento interrumpido inician con proteína previamente desnaturalizada, la cual es renaturalizada al ponerse en contacto con amortiguador, y se mantiene en dicho estado por un tiempo determinado para después transferirla a condiciones desnaturalizantes y seguir el proceso de desplegamiento. En la primera etapa se colocó una muestra de LAO a 2.2 mg/ml, desnaturalizada en 5 M de urea por 12 horas, en la jeringa A del módulo de *stopped flow*, y amortiguador en la jeringa B. Dichas soluciones se mezclaron en el conector de 4 entradas (relación 1:5), renaturalizando a LAO a una concentración final de 0.83M de urea. La proteína permaneció en tales condiciones por tiempos de 0 a 30 segundos. Posteriormente, en la segunda etapa, la muestra se mezcló con urea 5.4 M en la cámara de observación (relación 1:10) hasta alcanzar una concentración final de 5 M. Las cinéticas de desplegamiento se monitorearon siguiendo la señal de dicroísmo circular a 220 nm.

### **Ensayos de desnaturalización de LAO P16A**

Se realizaron experimentos de desnaturalización térmica de la mutante sencilla de LAO, P16A, aumentando la temperatura de 20°C a 75 °C a una velocidad de 0.5 °C por minuto. La desnaturalización se siguió por DC a 220 nm en un espectropolarímetro JASCO-700, utilizando una celda de cuarzo de 0.1 cm de paso de luz.

Por otra parte, se realizaron experimentos de desnaturalización de LAO P16A a distintas concentraciones de urea (0.25 a 5 M) y se siguieron por DC a 220 nm.

### **Experimentos cinéticos de renaturalización y desnaturalización de LAO P16A**

Se llevaron a cabo experimentos cinéticos de renaturalización y desnaturalización de LAO P16A. Las cinéticas de renaturalización se realizaron a partir de una muestra de proteína a 1.1mg/ml, desnaturalizada en 5 M de urea, por 12 horas. Dicha muestra se mezcló en la cámara de observación con las soluciones de urea adecuadas para llegar a concentraciones

finales de desnaturizante de 0.45 a 2.75 M. Los experimentos de desnaturalización se realizaron a partir de una muestra de LAO a la misma concentración de proteína, en ausencia de desnaturizante, y se mezcló con las soluciones adecuadas de urea para alcanzar concentraciones finales de 0.27 a 5 M.

### **Calorimetría de titulación isotérmica (ITC) de LAO P16A**

Los experimentos de ITC se llevaron a cabo en un microcalorímetro ITC<sub>200</sub> (GE Healthcare), en colaboración con la Dra. Nancy Pulido y el Dr. Enrique García del Instituto de Química de la UNAM. Para ello se realizaron inyecciones consecutivas de 1µl de ligando (histidina 10.5 mM) a una muestra de 200 µL de LAO P16A (0.1 mM) hasta llegar a saturación. Las muestras de ligando y proteína se encontraban en amortiguador de HEPES 10 mM, pH 8.0. La temperatura se mantuvo a 25 °C a lo largo del experimento.

### **Análisis de datos**

Los datos experimentales de los ensayos de desnaturalización inducida por temperatura o urea se normalizaron y transformaron a fracción de proteína desnaturizada (ec. 7) basándose en un modelo de dos estados (ec. 1).

$$f_D = \frac{(y_{obs} - (y_N + m_N x))}{((y_D + m_D x) - (y_N + m_N x))} \quad (\text{ec. 7})$$

donde  $f_D$  es la fracción de proteína desnaturizada,  $y_{obs}$  es la señal observada (IF o DC) y  $y_N + m_N x$  y  $y_D + m_D x$  son las ecuaciones del ajuste de las zonas pre y post transición a una recta ( $y$ =ordenada al origen,  $m$ =pendiente y  $x$ =temperatura o [urea]).

Se obtuvieron las constantes de equilibrio (ec. 8) de la transición y su logaritmo natural se graficó contra el inverso de la temperatura (grafico de Van't Hoff). De este gráfico se obtuvieron los valores del  $\Delta H$  y  $T_m$  (ec. 9).

$$K_{eq} = \frac{f_D}{1-f_D} \quad (\text{ec. 8})$$

$$\ln Keq = -\frac{\Delta Hvh}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (\text{ec. 9})$$

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

Los datos obtenidos de los experimentos de desnaturalización por urea se transformaron a fracción de proteína desnaturalizada (ec. 7) y se ajustaron a la ecuación de Santoro y Bolen (ec. 10), la cual supone un modelo de dos estados.

$$y_{obs} = \frac{\{(y_N + m_N[urea]) + (y_D + m_D[urea]) \exp\left(-\frac{\Delta G_{H_2O} - m_{ND}[urea]}{RT}\right)\}}{\left(1 + \exp\left(-\frac{\Delta G_{H_2O} - m_{ND}[urea]}{RT}\right)\right)} \quad (\text{ec. 10})$$

donde  $\Delta G_{H_2O}$  es la energía libre de desnaturalización en ausencia de urea, y  $m$  es la pendiente de la transición, la cual se relaciona con el área accesible al solvente.

Las cinéticas de desnaturalización y renaturalización, obtenidas en los diversos experimentos realizados, se ajustaron a una o dos exponenciales (ec. 11 y 12) en Origin® 8.

$$y = y_0 + A_1 \exp(x/t_1) \quad (\text{ec. 11})$$

$$y = y_0 + A_1 \exp(x/t_1) + A_2 \exp(x/t_2) \quad (\text{ec. 12})$$

El mejor ajuste se determinó a través del análisis del gráfico de residuales el cual muestra la dispersión de los datos experimentales alrededor de la regresión. EL gráfico de residuales para un ajuste adecuado presenta una dispersión homogénea y lineal de los datos, de manera contraria, un ajuste inadecuado muestra tendencia en la dispersión. En la mayor parte de los casos se muestra el gráfico de residuales con respecto a la variable independiente, sin embargo, en algunos casos se presentan los residuales con respecto a la variable dependiente debido a la presencia de tendencia poco clara en el primer gráfico.

Los gráficos de chevron de LAO, LAO+CyP y LAO P16A se ajustaron a modelos de dos estados (ec. 1) y tres estados con un intermediario productivo o secuencial (ec. 2) y no productivo (ec. 3). El plegamiento de dos estados presenta una sola constante de velocidad aparente  $\lambda$

(también conocida como la constante observable  $k_{obs}$ ), la cual a su vez es la suma de las constantes microscópicas de plegamiento y desplegamiento,  $k_f$  y  $k_D$  respectivamente (ec.13).

$$\lambda = k_f + k_D \quad (\text{ec.13})$$

Puesto que el logaritmo natural de las constantes microscópicas cambia de manera lineal con la concentración de desnaturalizante, el valor de  $\lambda$  en un gráfico de chevron es descrito por la ecuación 14.

$$\ln \lambda = \ln(k_{f(H_2O)} \exp(-m_f [urea]) (-m_f + k_{D(H_2O)} \exp(m_D [urea]))) \quad (\text{ec.14})$$

donde  $k_{f(H_2O)}$  y  $k_{D(H_2O)}$  representan los valores de dichas constantes en agua y  $m_f$  y  $m_D$  la dependencia de estas constantes con la concentración de desnaturalizante.

Por otra parte, un proceso de tres estados presenta dos constantes de velocidad aparentes:  $\lambda_1$  y  $\lambda_2$ . Para un modelo secuencial (ec. 4), la relación entre las constantes aparentes y las microscópicas, asumiendo que las especies D e I se encuentran en equilibrio rápido, se muestra en las ecuaciones 15 y 16. Debido a que en muchos casos no es posible medir  $\lambda_1$ , nos referimos a  $\lambda_2$  como  $k_{obs}$ .

$$\lambda_1 = k_{DI} + k_{ID} \quad (\text{ec.15})$$

$$\lambda_2 = f_I k_{IN} + k_{NI} \quad (\text{ec.16})$$

$$f_I = \frac{[I]}{[I]+[D]} \quad (\text{ec.17})$$

Dividiendo el numerador y el denominador del miembro derecho de la ecuación 17 entre la concentración de proteína desnaturalizada [D] y sustituyendo  $\frac{[I]}{[D]}$  por  $K_{DI}$  - la cual representa a la constante de equilibrio entre ambas especies- obtenemos la siguiente ecuación:

$$f_I = \frac{K_{DI}}{1+K_{DI}} \quad (\text{ec.18})$$

Por lo tanto, si sustituimos la ecuación 18 en la 16 y tomamos en cuenta la linealidad de las constantes microscópicas y de equilibrio con la concentración de desnaturizante, obtenemos que la  $k_{obs}$  en el gráfico de chevron se describe por la ecuación 19.

$$\ln k_{obs}(\lambda_2) = \ln\left\{\left(\frac{K_{DI} \exp(-m_{DI}[urea])}{1 + K_{DI} \exp(-m_{DI}[urea])}\right) k_{IN} \exp(-m_{IN}[urea]) + k_{NI} \exp(m_{NI}[urea])\right\} \quad (\text{ec. 19})$$

De la misma manera, para un modelo con un intermediario no productivo (ec. 5), la relación entre  $k_{obs}$  y las constantes microscópicas se muestra en la ecuación 20.

$$k_{obs} = f_D k_{DN} + k_{ND} \quad (\text{ec.20})$$

$$f_D = \frac{[D]}{[I]+[D]} \quad (\text{ec.21})$$

Dividiendo el numerador y el denominador del miembro derecho de la ecuación 21 entre la concentración de proteína desnaturizada [D] y sustituyendo  $\frac{[I]}{[D]}$  por  $K_{DI}$ , obtenemos la siguiente ecuación:

$$f_D = \frac{1}{1+K_{DI}} \quad (\text{ec. 22})$$

Por lo tanto, si sustituimos la ecuación 22 en la 20 y tomamos en cuenta la linealidad del logaritmo natural de las constantes microscópicas y de equilibrio con la concentración de desnaturizante, obtenemos que la  $k_{obs}$  en el gráfico de chevron se describe por la ecuación 23.

$$\ln k_{obs}(\lambda_2) = \ln\left\{\left(\frac{k_{DN} \exp(-m_{DN}[urea])}{1 + K_{DI} \exp(-m_{DI}[urea])}\right) k_{ND} \exp(m_{ND}[urea])\right\} \quad (\text{ec. 23})$$

Las cinéticas de desnaturalización obtenidas de los experimentos de replegamiento interrumpido se ajustaron a dos exponenciales. Partiendo de la premisa de que los intermediarios son más inestables que el estado nativo, atribuimos la constante de velocidad rápida a la desnaturalización de la población de intermediario y la constante lenta a la de la especie nativa, ambas formadas en el primer salto. Los valores de las amplitudes relacionadas con cada constante se normalizaron y se graficaron contra el tiempo que la proteína permaneció en condiciones nativas después del primer salto. Para realizar la normalización se tomó como el cien por ciento a la suma de las amplitudes a los 60 s. Puesto que los valores normalizados representan la fracción de proteína nativa e intermediario que se desnaturaliza en el segundo salto, el gráfico contra el tiempo muestra cómo cambia la población de cada especie en el proceso de plegamiento. La fracción de proteína desplegada se obtuvo al restar las fracciones de proteína nativa e intermediario al cien por ciento.

Los datos obtenidos del experimento de replegamiento interrumpido se analizaron en colaboración con el Dr. Rogelio Rodríguez-Sotres de la Facultad de Química de la UNAM. El gráfico de las fracciones de proteína contra el tiempo se ajustó a un modelo de plegamiento con un intermediario secuencial, a un modelo con un intermediario no productivo y a un modelo triangular. Las ecuaciones diferenciales para cada uno de los modelos se integraron por métodos numéricos en el programa **MatLab**<sup>TM</sup>.

Las ecuaciones diferenciales para un modelo secuencial son las siguientes:

$$\frac{\partial[D]}{\partial t} = -k_{DI}[D] + k_{ID}[I] \quad (\text{ec.24})$$

$$\frac{\partial[I]}{\partial t} = k_{DI}[D] - (k_{ID} + k_{IN})[I] + k_{NI}[N] \quad (\text{ec.25})$$

$$\frac{\partial[N]}{\partial t} = -k_{IN}[I] + k_{NI}[N] \quad (\text{ec.26})$$

$$C_0 = [D] + [I] + [N] \quad (\text{ec.27})$$

Las ecuaciones diferenciales para un modelo con un intermediario no productivo son las siguientes:

$$\frac{\partial[N]}{\partial t} = -k_{ND}[N] + k_{DN}[D] \quad (\text{ec.28})$$

$$\frac{\partial[D]}{\partial t} = k_{ND}[N] - (k_{DN} + k_{DI})[D] + k_{ID}[I] \quad (\text{ec.29})$$

$$\frac{\partial[I]}{\partial t} = -k_{DI}[D] + k_{ID}[I] \quad (\text{ec.30})$$

$$C_0 = [N] + [D] + [I] \quad (\text{ec.31})$$

Las ecuaciones diferenciales para un modelo triangular son las siguientes:

$$\frac{\partial[N]}{\partial t} = -(k_{ND} + k_{NI})[N] + k_{DN}[D] + k_{IN}[I] \quad (\text{ec.32})$$

$$\frac{\partial[D]}{\partial t} = k_{ND}[N] - (k_{DN} + k_{DI})[D] + k_{ID}[I] \quad (\text{ec.33})$$

$$\frac{\partial[I]}{\partial t} = k_{NI}[N] + k_{DI}[D] - (k_{ID} + k_{IN})[I] \quad (\text{ec.34})$$

$$C_0 = [D] + [N] + [I] \quad (\text{ec.35})$$

Los valores de energía libre ( $\Delta G_{DN}$ ,  $\Delta G_{DI}$ ), phi ( $\phi_{\ddagger}$ ,  $\phi_I$ ),  $\beta$  de Tanford ( $\beta_{T(I)}$ ,  $\beta_{T(I\ddagger)}$ ) y  $m_{DN}$  al equilibrio se obtuvieron a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\Delta G_{DN} = -RT \ln(K_{DI} \frac{k_{IN}}{k_{NI}}) \quad (\text{ec.36})$$

$$\Delta G_{DI} = -RT \ln(K_{DI}) \quad (\text{ec.37})$$

$$\Delta \Delta G_{DN} = \Delta G_{DN}^{wt} - \Delta G_{DN}^{mut} \quad (\text{ec.38})$$

$$\Delta \Delta G_{DI} = \Delta G_{DI}^{wt} - \Delta G_{DI}^{mut} \quad (\text{ec.39})$$

$$\Delta\Delta G_{D\ddagger} = -RT \ln\left(\frac{k_{IN}^{wt}}{k_{IN}^{mut}}\right) \quad (\text{ec.40})$$

$$\phi_I = \Delta\Delta G_{DI} / \Delta\Delta G_{DN} \quad (\text{ec.41})$$

$$\phi_{I\ddagger} = (\Delta\Delta G_{DI} + \Delta\Delta G_{I\ddagger}) / \Delta\Delta G_{DN} \quad (\text{ec.42})$$

$$m_{DN} = (m_{DI} + m_{IN} - m_{NI}) \quad (\text{ec.43})$$

$$\beta_{T(I)} = (m_{DI}) / (m_{DI} + m_{IN} - m_{NI}) \quad (\text{ec.44})$$

$$\beta_{T(I\ddagger)} = (m_{DI} + m_{IN}) / (m_{DI} + m_{IN} - m_{NI}) \quad (\text{ec.45})$$

Los valores de  $\Delta G_{I\ddagger}$  y  $\Delta G_{N\ddagger}$  se obtuvieron en base a la teoría del estado de transición:

$$k_{IN} = \frac{k_b T}{h} e^{-\Delta G_{I\ddagger} / RT} \quad (\text{ec.46})$$

$$k_{NI} = \frac{k_b T}{h} e^{-\Delta G_{N\ddagger} / RT} \quad (\text{ec.47})$$

donde  $k_b$  es la constante de Boltzmann y  $h$  es la constante de Planck.

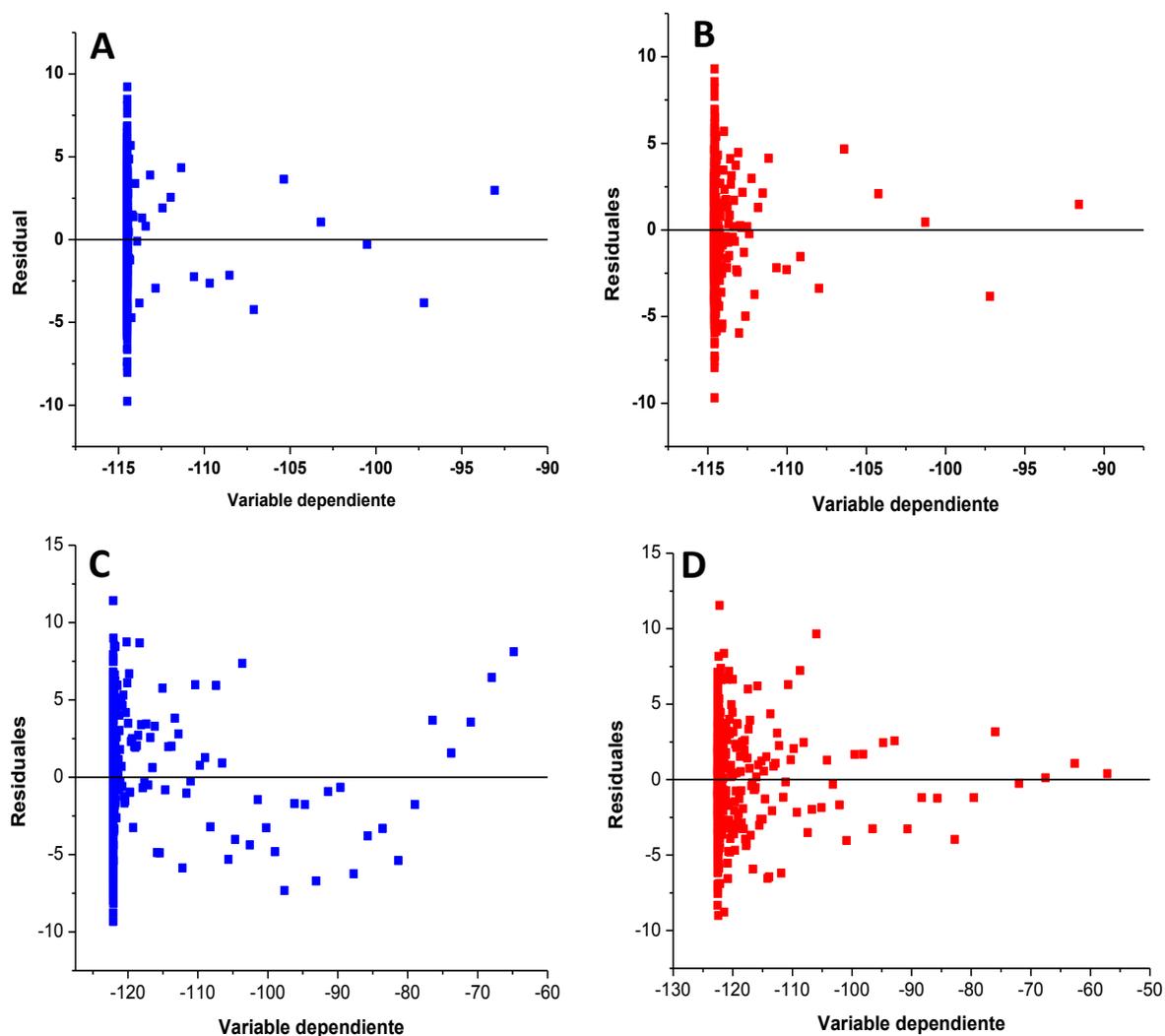
## RESULTADOS

Como se mencionó anteriormente, algunos estudios termodinámicos sobre el desplegamiento de LAO muestran que dicho proceso presenta un comportamiento de dos estados. Por el contrario, los experimentos cinéticos mostraron una mayor complejidad. Las curvas de renaturalización a concentraciones bajas de urea (0.45 a 1.5 M) son biexponenciales (fig. 20), lo cual ocasiona la presencia de dos ramas en ésta zona del chevron, ambas con curvatura (fig. 21). Dicho comportamiento puede originarse por dos causas principales: la presencia de intermediarios cinéticos y/o heterogeneidad en el estado desnaturalizado, generalmente por isomerización de prolinas.

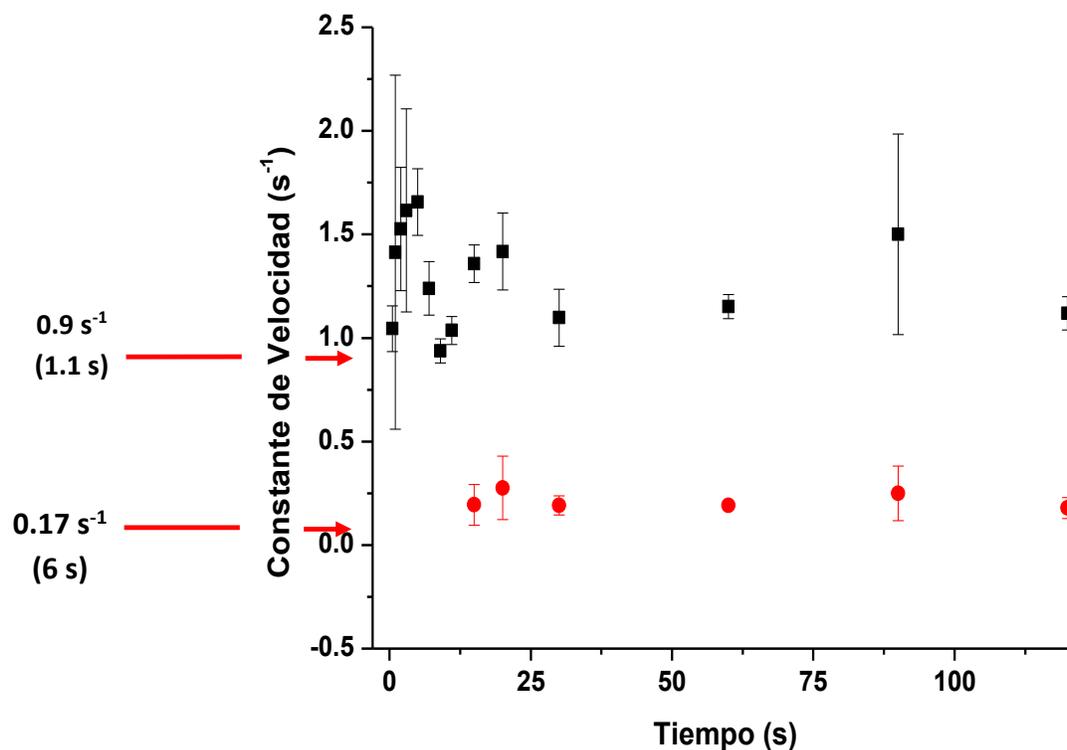
### Experimentos de doble salto

Para determinar si el plegamiento de LAO presenta isomerización de prolinas se realizaron experimentos de doble salto. Como se mencionó anteriormente, dichos experimentos están constituidos por dos pasos principales, en el primero de ellos la proteína en estado nativo se mezcla con urea hasta llegar a una concentración de desnaturalizante a la cual LAO se despliega totalmente. La muestra se mantiene en dichas condiciones por un tiempo determinado y posteriormente, en un segundo paso, se mezcla con amortiguador hasta llegar a condiciones nativas para replegar la proteína. El replegamiento se monitoriza por dicroísmo circular o fluorescencia. El experimento se repite variando el tiempo en el que la muestra permanece en condiciones desnaturalizantes. Dicho estudio se basa en que los residuos de prolina en el estado nativo presentan una configuración específica y su isomerización es un proceso lento. Por lo tanto, si existe isomerización en el proceso de plegamiento, su efecto desaparecerá cuando la muestra se mantiene en condiciones desnaturalizantes por tiempos cortos, debido a que no habrá tiempo suficiente para que las prolinas adquieran una configuración diferente a la que se encuentra en la estructura nativa. Por otra parte, su efecto reaparecerá cuando la proteína se mantiene desplegada por tiempos largos, ya que las prolinas podrán isomerizar y adquirir la configuración incorrecta antes de iniciar el replegamiento. Las cinéticas obtenidas a tiempos de desnaturalización menores a 10 segundos se ajustaron adecuadamente a una sola

exponencial, como se puede observar en el gráfico de residuales (fig.25 A y B ), presentando una sola constante de velocidad. Por el contrario, a tiempos mayores de desnaturalización el ajuste de las cinéticas requiere dos exponenciales (fig. 25 C y D). En la figura 26 se muestran los valores de las constantes de velocidad obtenidas al variar el tiempo de desnaturalización, ambas coinciden con aquellas obtenidas de los experimentos sencillos. La pérdida de la constante de velocidad lenta en las cinéticas de renaturalización a tiempos de desnaturalización menores a 10 segundos, sugiere fuertemente que la rama que corresponde a dicha constante en el gráfico de chevron está determinada por isomerización de prolinas.



**Figura 25.** Residuales de los ajustes a una (■) o dos exponenciales (■) de las cinéticas de renaturalización después de 1s (A y B) y 120s (C y D) de desnaturalización para LAO silvestre.



**Figura 26.** Constantes de velocidad rápida (■) y lenta (●) obtenidas de las cinéticas de renaturalización de los experimentos de doble salto. A la izquierda se muestran los valores de las constantes calculadas de los experimentos sencillos.

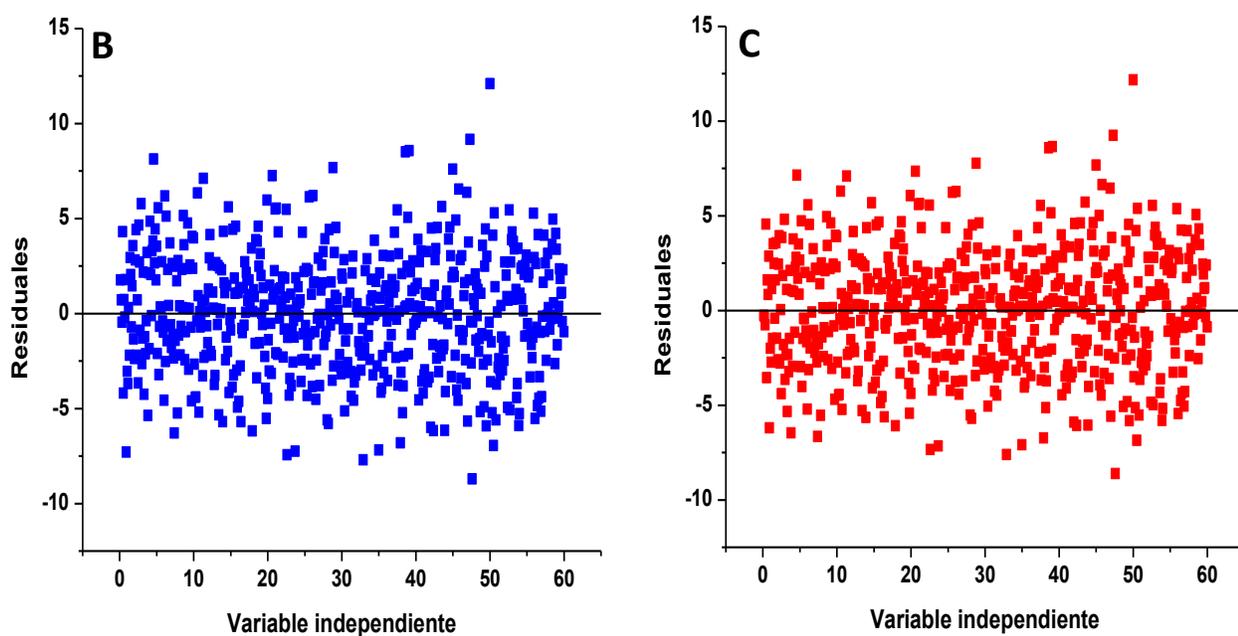
### Experimentos de replegamiento de LAO en presencia de CyP

Para corroborar los resultados de los experimentos de doble salto, se realizaron experimentos de renaturalización de LAO en presencia de distintas concentraciones de la enzima CyP (0 a 10  $\mu\text{M}$ ), la cual presenta actividad de prolil-isomerasa. Las cinéticas obtenidas a concentraciones de 0 a 2  $\mu\text{M}$  de CyP mostraron dos constantes de velocidad; sin embargo, a concentraciones mayores sólo se observa la constante rápida (fig. 27 y 28). Estos resultados confirman que la fase lenta en la renaturalización de LAO es debida a la isomerización de prolinas. En la figura 28 se muestran los valores de las constantes de velocidad obtenidas a cada concentración de CyP.

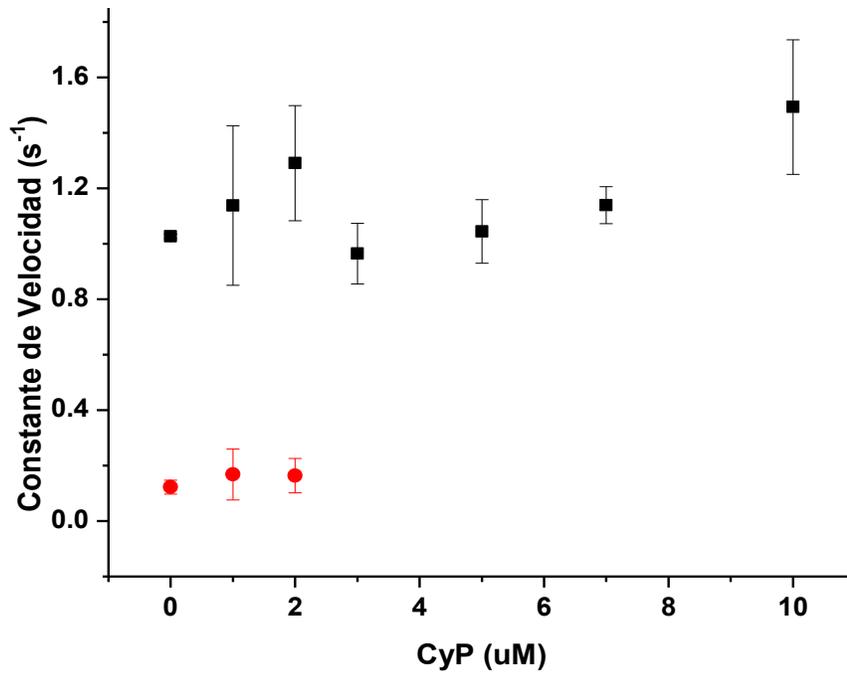
Con el objetivo de obtener la rama de replegamiento del chevron de LAO sin la contribución de la isomerización de prolinas, se llevó a cabo un experimento de renaturalización a distintas concentraciones de urea (0 a 3 M), agregando una concentración fija de ciclofilina (5  $\mu\text{M}$ ). Cabe mencionar que CyP mantiene su estructura a las concentraciones de

desnaturalizante empleadas en este experimento. Todas las cinéticas mostraron una sola exponencial y la rama del chevron que se obtuvo de dichos experimentos concuerda con la rama rápida en ausencia de CyP (fig. 29). Sin embargo, la curvatura no se eliminó, lo cual indica que existe un intermediario cinético independiente de la isomerización de prolinas.

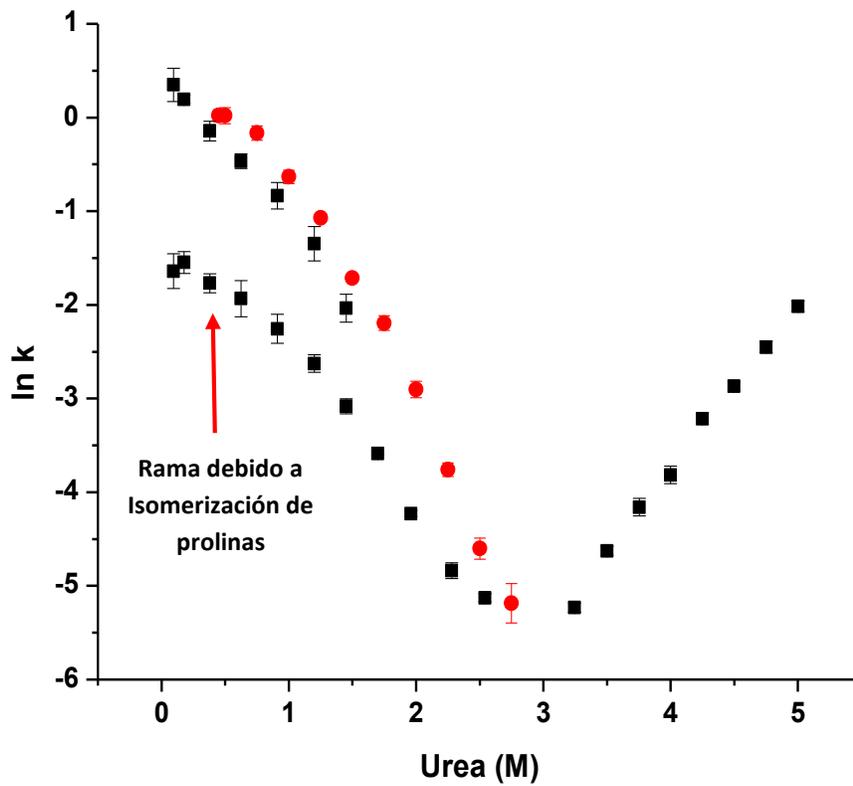
**A**



**Figura 27.** A) Cinética de renaturalización a 5  $\mu\text{M}$  de ciclofilina. B y C) Residuales de los ajustes a una (■) y dos exponenciales (■)



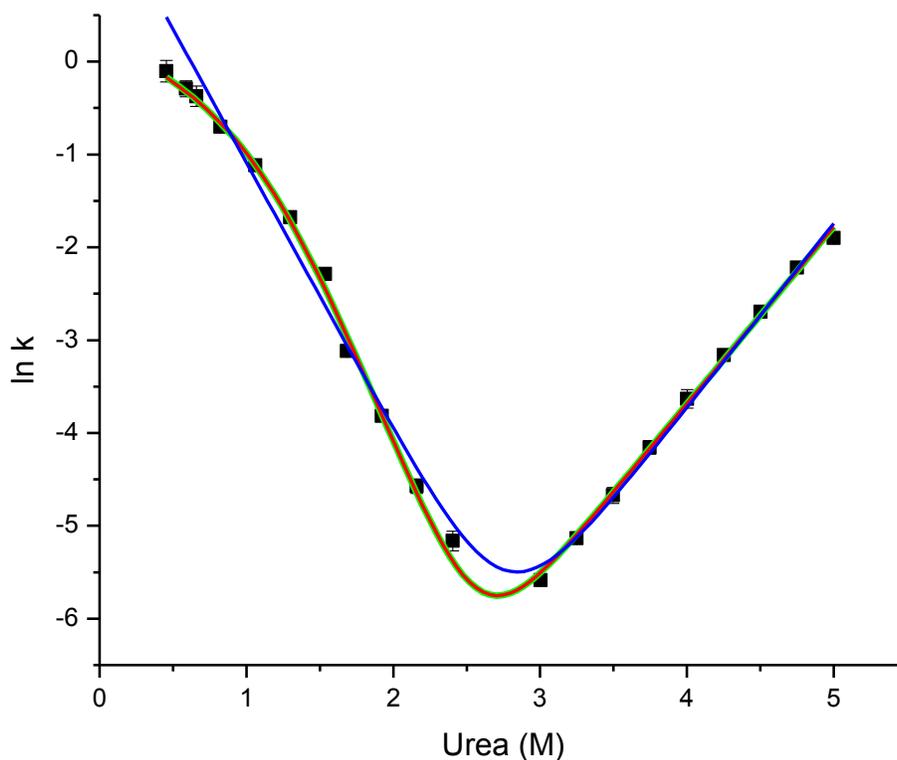
**Figura 28.** Constantes de velocidad rápida (■) y lenta (●) obtenidas de las cinéticas de renaturalización agregando concentraciones crecientes de CyP.



**Figura 29.** Gráfico de Chevron de los experimentos cinéticos seguidos por DC (■). Rama de repliegamiento en presencia de CYP (●)

## Experimentos de plegamiento interrumpido

Como se mencionó anteriormente, el gráfico de chevron de LAO no es característico de un proceso de dos estados. Para determinar el mecanismo de plegamiento, se realizaron ajustes al modelo de tres estados, tanto en su variante secuencial (ec.4) o con un intermediario no productivo (ec .5). Ambos describieron muy bien los datos experimentales (fig. 30) y los valores de  $\Delta G_{DN}$  calculados a partir de las constantes microscópicas fueron de  $-9.0 \text{ Kcal mol}^{-1}$  y  $-11.1 \text{ Kcal mol}^{-1}$  respectivamente, los cuales son muy similares al  $\Delta G_{DN}$  al equilibrio ( $-10.3 \text{ Kcal mol}^{-1}$ ). Sin embargo, mientras que el valor de  $m_{DN}$  calculado del ajuste al modelo secuencial ( $3.4 \text{ Kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ) concuerda muy bien con el valor al equilibrio ( $3.7 \text{ Kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ), el calculado a partir del modelo no productivo mostró mayor diferencia ( $5.2 \text{ Kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ). Las constantes de velocidad y de equilibrio obtenidas de los ajustes, así como los valores de las pendientes, se muestran en la tabla 1.



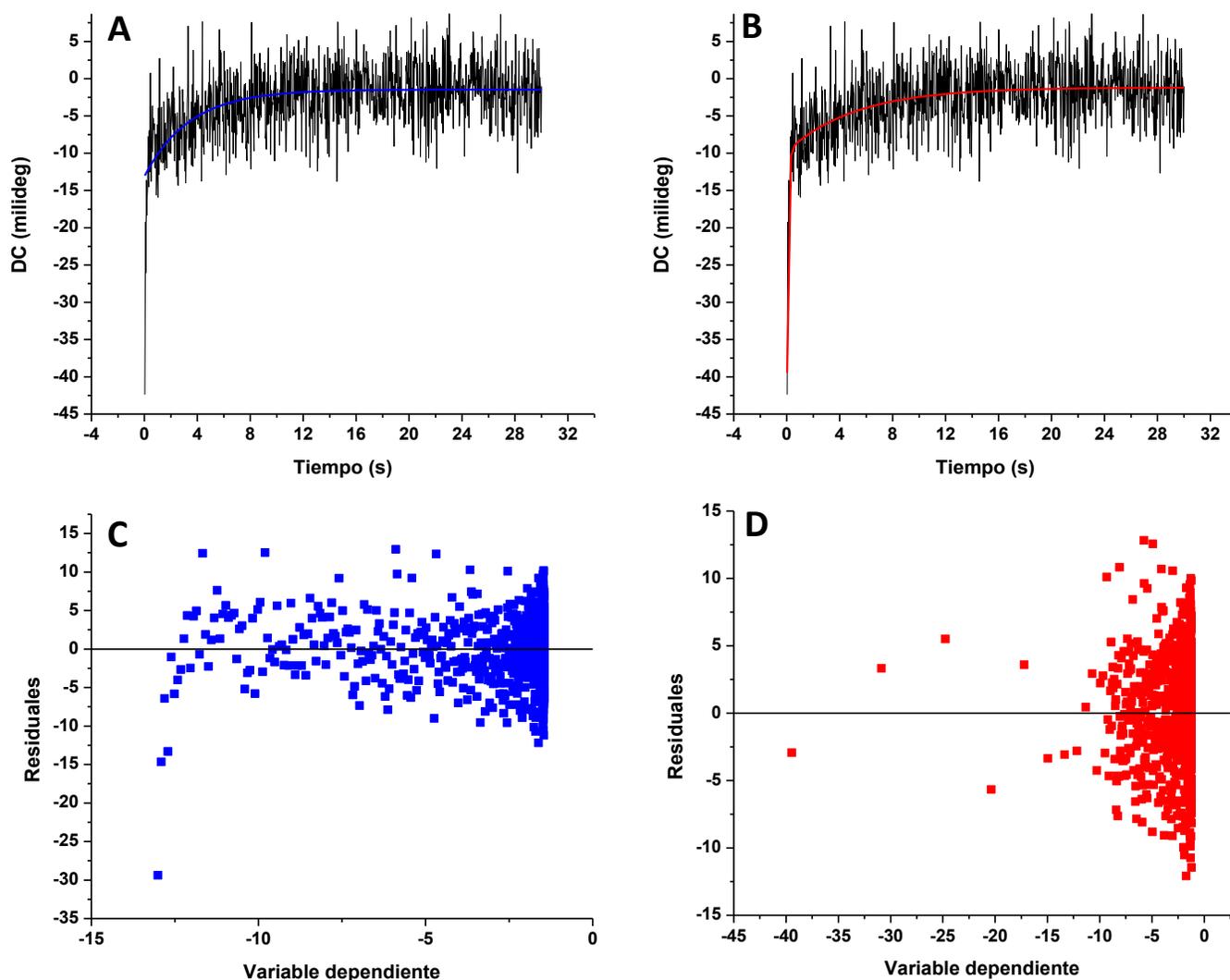
**Figura 30.** Ajuste del gráfico de chevron a un modelo de dos (—) y tres estados con el intermediario dentro (—) y fuera de la vía (—).

	$K_{DI}$	$k_{IN}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{NI}$ ( $s^{-1}$ )	$m_{DI}$	$m_{IN}$	$m_{NI}$	$\Delta G_{DN}$ (Kcal mol $^{-1}$ )	$\Delta G_{DN}$ Equilibrio	$m_{DN}$ (Kcal mol $^{-1}M^{-1}$ )	$m_{DN}$ Equilibrio
<b>Secuencial</b>	35.5 $\pm 22.2$	1.3 $\pm 0.5$	$1.2 \times 10^{-5}$ $\pm 2.3 \times 10^{-6}$	1.9 $\pm 0.2$	0.41 $\pm 0.3$	-1.12 $\pm 0.02$	-9.0	-10.3 $\pm 0.03$	3.4	3.7 $\pm 0.1$
	$K_{DI}$	$k_{DN}$	$k_{ND}$	$m_{DI}$	$m_{DN}$	$m_{ND}$				
<b>No productivo</b>	35.4 $\pm 22.2$	46.5 $\pm 41$	$1.2 \times 10^{-5}$ $\pm 2.3 \times 10^{-6}$	2.3 $\pm 0.2$	1.9 $\pm 0.2$	-1.1 $\pm 0.02$	-11.1		5.3	

**Tabla 1.** Parámetros cinéticos y termodinámicos obtenidos del ajuste del gráfico de chevron a modelos de tres estados con el intermediario fuera y dentro de la vía.

Estos resultados sugieren que el plegamiento de LAO presenta un intermediario dentro de la vía. Para corroborarlo, se realizaron experimentos de replegamiento interrumpido, los cuales permiten conocer las fracciones de proteína nativa, de proteína desplegada e intermediario a diferentes tiempos de replegamiento. Al igual que los experimentos de doble salto, los estudios de replegamiento interrumpido consisten en dos etapas. En el primer paso, la proteína desnaturalizada se mezcla con amortiguador propiciando su replegamiento. Después de que la muestra permanece en dichas condiciones por un tiempo determinado, se mezcla nuevamente con urea a una concentración a la cual la proteína se despliega. La cinética de desnaturalización se monitoriza por fluorescencia o dicróismo circular. El experimento se repite variando el tiempo en el que la muestra permanece en condiciones nativas. Dicho estudio se basa en el hecho de que los estados intermediarios son más inestables que el estado nativo y por lo tanto se desnaturalizan a una velocidad mayor. De este modo, si el plegamiento de una proteína es de dos estados, la única especie que se formará en el proceso será el estado nativo y, por lo tanto, las cinéticas de desnaturalización mostrarán una sola exponencial cuya velocidad corresponderá a la velocidad de desplegamiento de la proteína nativa. Por el contrario, la presencia de un intermediario se reflejará en la observación de una segunda exponencial de mayor velocidad en la cinética. Puesto que las amplitudes correspondientes a cada velocidad están relacionadas directamente con la población relativa de cada especie que se está

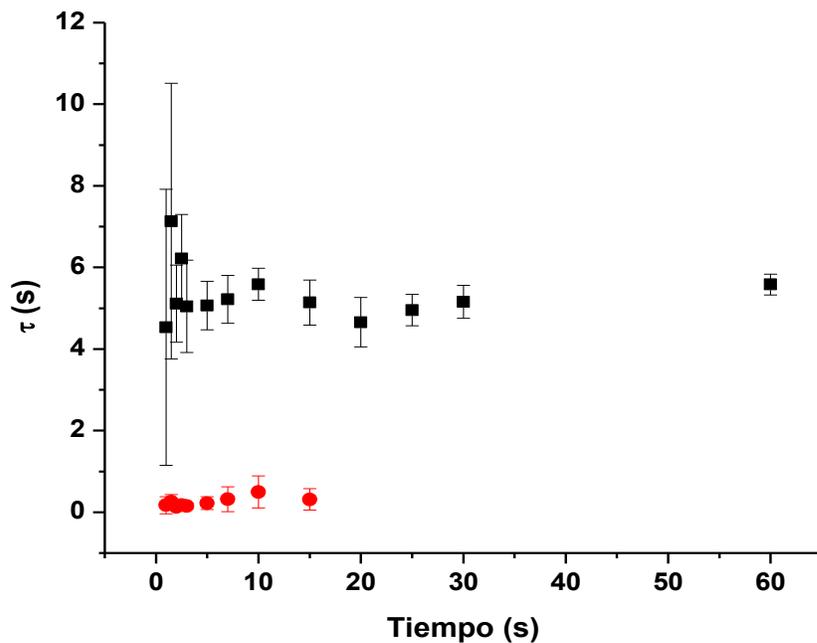
desnaturalizando, un gráfico de la amplitud contra el tiempo que la proteína permanece en condiciones nativas refleja directamente el cambio de la fracción de cada especie a través del tiempo en el proceso de plegamiento. Todas las cinéticas obtenidas para LAO se ajustaron a dos exponenciales (fig. 31).



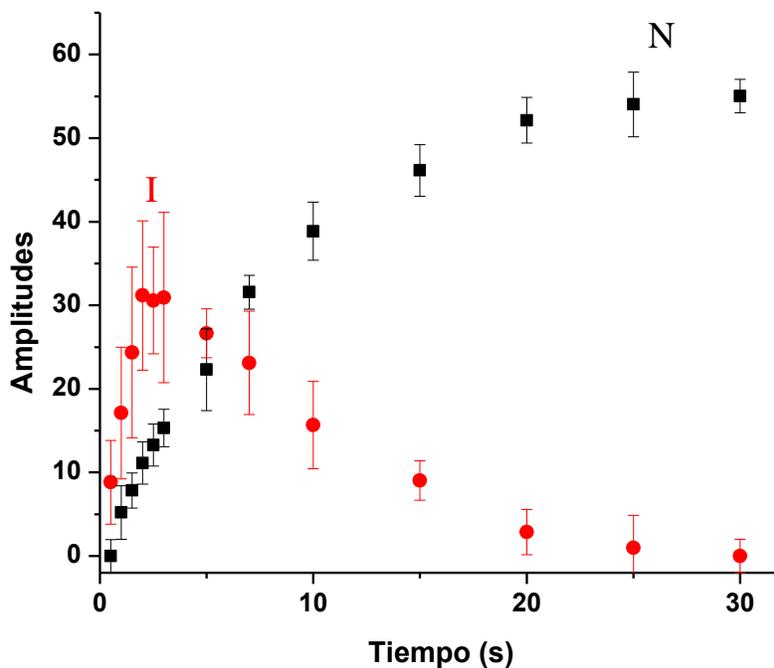
**Figura 31. Experimentos de replegamiento interrumpido seguidos por DC.** Cinéticas de renaturalización después de 2s en condiciones nativas ajustadas a una (A) y dos exponenciales (B). Residuales de los ajustes a una (■) y dos exponenciales (■).

La constante de velocidad lenta concuerda con la constante obtenida de los experimentos sencillos, lo cual indica que dicho valor corresponde a la desnaturalización del estado nativo

(fig. 32). La gráfica de las amplitudes sin normalizar contra el tiempo se muestra en la figura 33.

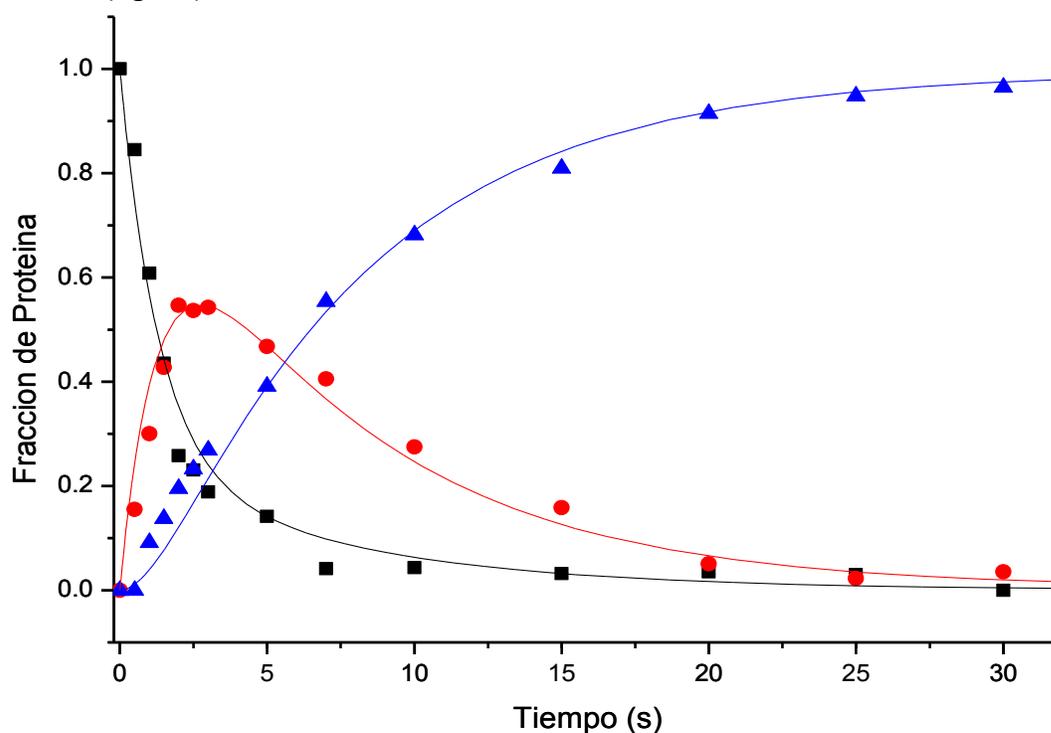


**Figura 32.** Tiempos de relajación ( $\tau$ ) rápido (●) y lento (■) obtenidos de las cinéticas de desnaturalización de los experimentos de replegamiento interrumpido. A la izquierda se muestran el valor de la constante calculada de los experimentos sencillos.



**Figura 33.** Gráfico de las amplitudes contra el tiempo obtenidas de las cinéticas de desnaturalización de los experimentos de replegamiento interrumpido (DC). Las amplitudes se encuentran relacionadas con la población relativa de especie de proteína nativa (■) e intermedio (●).

El cambio en la fracción relativa de cada especie de proteína con respecto al tiempo se ajustó a los modelos secuencial (ec. 4) y con un intermediario no productivo (ec. 5), así como a un modelo triangular (ec. 6). Como podemos observar en la figura 34, el modelo secuencial describe adecuadamente los datos experimentales y los valores calculados de las constantes  $k_{DI}$ ,  $k_{IN}$  y  $k_{NI}$  concuerdan con los valores obtenidos del chevron, extrapolados a 0.8 M de urea (tabla 2). De manera contraria, el modelo no productivo no se ajusta correctamente, por lo cual se puede descartar (fig. 35). Por otra parte, el modelo triangular se ajusta mejor a los datos a tiempos menores a los 5 s (fig. 36), en comparación al modelo secuencial. De hecho, los valores de  $k_{DI}$ ,  $k_{IN}$ ,  $k_{ID}$  y  $k_{NI}$  son muy similares entre ambos ajustes (tabla 2); sin embargo, el valor de la constante  $k_{DN}$  -que describe la vía directa entre D y N- es menor a las constantes  $k_{DI}$  y  $k_{IN}$  y no se observa fase explosiva en la formación de N, en contraste a lo reportado para otras proteínas cuyo plegamiento es descrito por un mecanismo triangular (Kiefhaber, 1997). Por ello concluimos que el mecanismo más sencillo que mejor describe el plegamiento de LAO es de tres estados con un intermediario dentro de la vía (fig. 37).



**Figura 34.** Ajuste de las fracciones nativa (●), desnaturalizada (■) e intermediaria (▲) a un modelo secuencial.

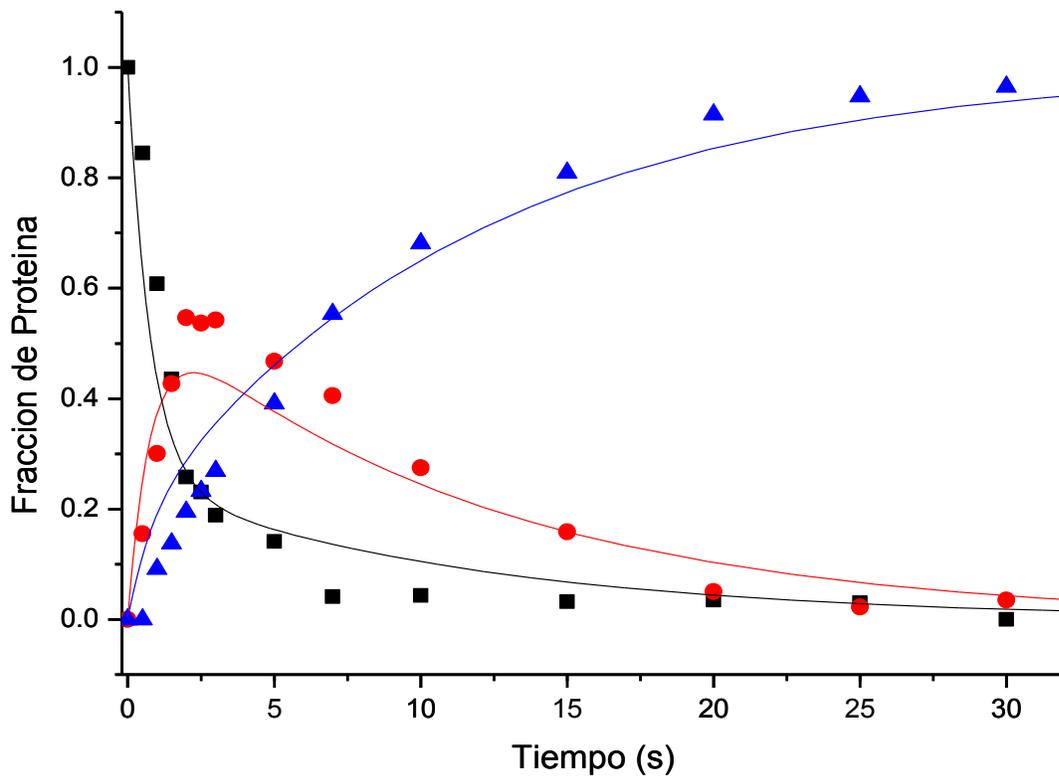


Figura 35. Ajuste de las fracciones nativa (●), desnaturalizada (■) e intermediario (▲) a un modelo no productivo.

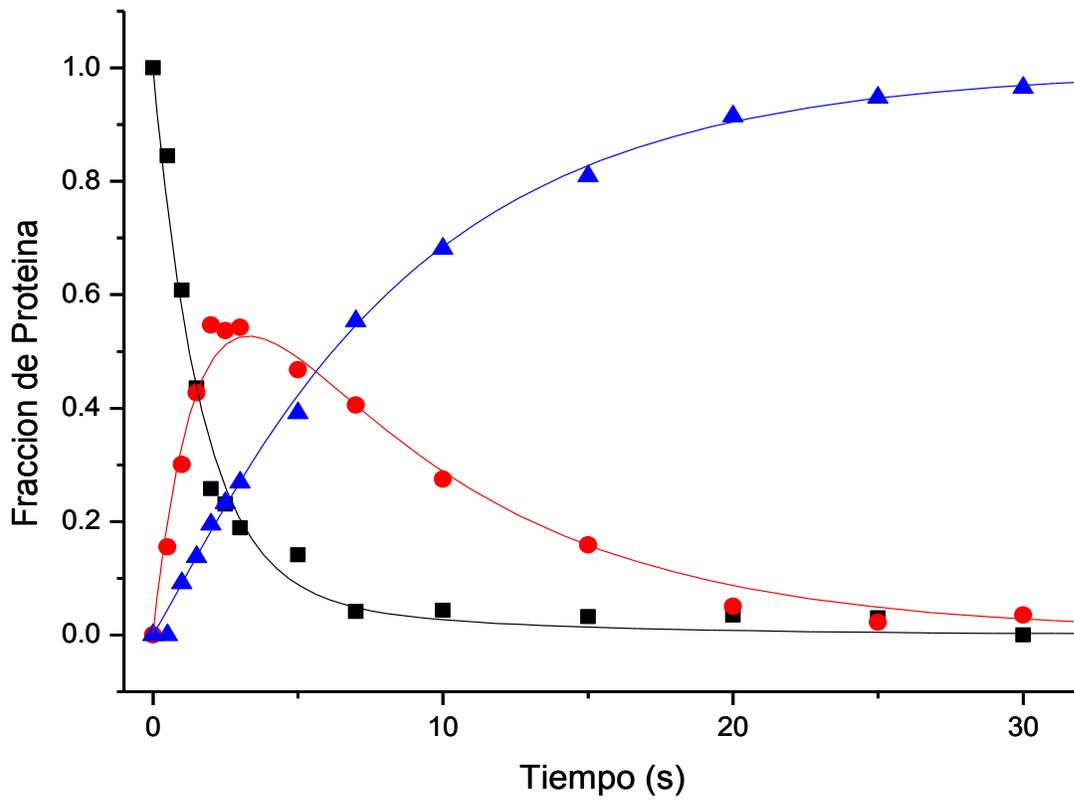
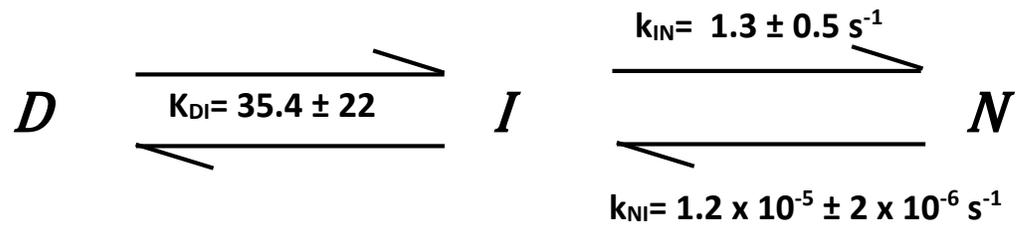


Figura 36. Ajuste de las fracciones nativa (●), desnaturalizada (■) e intermediario (▲) a un modelo triangular.

Como se mencionó anteriormente, el valor de  $\Delta G_{DN}$  calculado a partir de las constantes de velocidad es de  $-9.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ , muy similar al obtenido de los experimentos al equilibrio. Por otra parte, los valores de  $\beta$  de Tanford ( $\beta_T$ ), los cuales están relacionados con el área superficial expuesta al solvente de cada especie en comparación al estado nativo, son de 0.55 y 0.67 para el intermediario y el estado de transición respectivamente (Tabla 3). Dichos valores indican que ambas especies presentan aproximadamente la mitad del área accesible al solvente en comparación al estado nativo.

Constante (0.8M)	Secuencial (chevron)	Secuencial	Triangular
$K_{DI}$	2.7	5.1	12
$k_{IN} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	0.7	$0.17 \pm 0.01$	$0.12 \pm 0.01$
$k_{NI} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$5.6 \times 10^{-5}$	$8.4 \times 10^{-4} \pm 3 \times 10^{-3}$	$3 \times 10^{-4} \pm 2 \times 10^{-3}$
$k_{DI} \text{ (s}^{-1}\text{)}$		$0.6 \pm 0.06$	$0.45 \pm 0.05$
$k_{ID} \text{ (s}^{-1}\text{)}$		$0.12 \pm 0.04$	$0.03 \pm 0.03$
$k_{DN} \text{ (s}^{-1}\text{)}$			$0.08 \pm 0.01$
$k_{ND} \text{ (s}^{-1}\text{)}$			$3 \times 10^{-4} \pm 2 \times 10^{-3}$

**Tabla 2.** Constantes de velocidad y de equilibrio obtenidas del ajuste de las fracciones de cada especie de proteína a un modelo secuencial y triangular, así como de la extrapolación a 0.8 M de urea del ajuste del gráfico de chevron a un modelo secuencial.



**Figura 37.** Mecanismo de plegamiento de LAO. Las constantes mostradas provienen del ajuste del chevron a dicho modelo.

$\Delta G_{DN}$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	-9.0
$\Delta G_{DI}$	-2.1
$\Delta G_{IN}$	-6.7
$\Delta G_{I\ddagger}$	15.6
$\Delta G_{\ddagger N}$	22.4
$\beta_{T_I}$	0.55
$\beta_{T_{\ddagger}}$	0.67

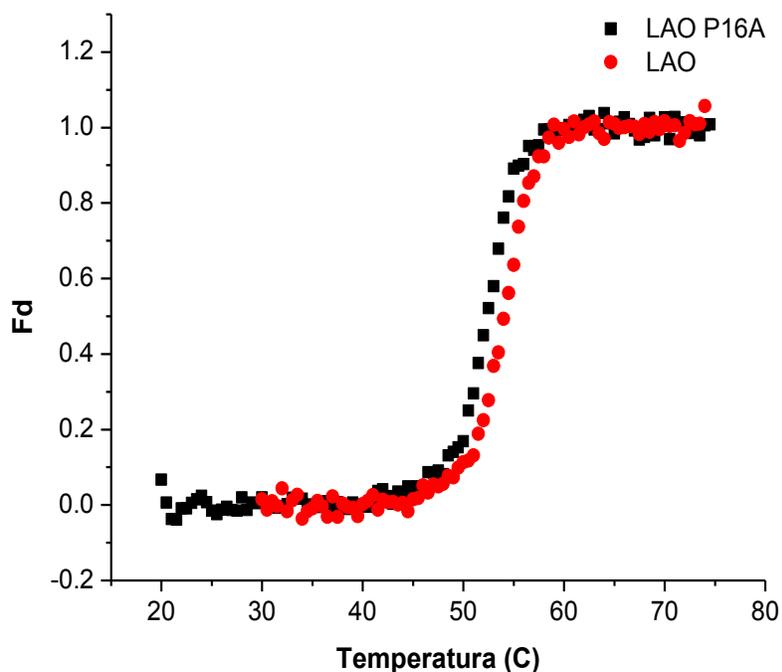
**Tabla 3.** Valores de  $\Delta G$  y  $\beta_T$  calculados a partir de las constantes y pendiente obtenidas del ajuste del chevron a un modelo secuencial.

## Mutante de LAO, P16A

Como se mencionó anteriormente, el residuo 16 en la estructura de LAO es una prolina en configuración *cis* la cual podría ser responsable de la isomerización observada en los experimentos de doble salto y renaturalización en presencia de ciclofilina. Para determinar el efecto de P16 en el plegamiento de LAO, se llevaron a cabo estudios termodinámicos y cinéticos de la mutante P16A.

### Experimentos de desnaturalización térmica

Se realizaron experimentos de desnaturalización térmica de LAO P16A seguidos por DC. Al igual que LAO silvestre, la curva de desnaturalización de la mutante es monofásica (fig. 38) y el  $\Delta H$  obtenido para ambas es el mismo ( $141 \pm 4.3$  y  $139 \pm 4.8$  Kcal mol<sup>-1</sup> para LAO silvestre y mutante respectivamente). La  $T_m$  de LAO P16A es de 52.3°C, 1.7°C menor a la de la silvestre (tabla 4). Éstos resultados indican que la estabilidad térmica de LAO no se ve afectada por la mutación.



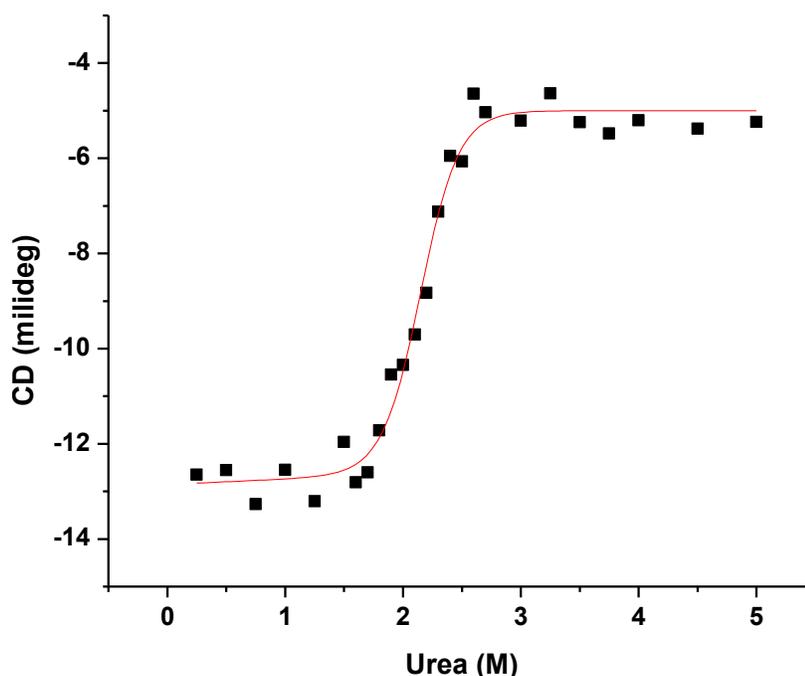
**Figura 38.** Curvas de la fracción desnaturalizada de proteína de los experimentos de desnaturalización térmica, seguidos por DC, de LAO wt (●) y LAO P16A (■).

	LAO wt	LAO P16A
$T_m$ (°C)	54	52.3
$\Delta H$ (Kcal mol <sup>-1</sup> )	141 ± 4.3	139.1 ± 4.8

**Tabla 4.** Valores de  $T_m$  y  $\Delta H$  obtenidos a partir de las curvas de desnaturalización térmica de LAO wt y LAO P16A.

### Experimentos de desnaturalización inducida por urea

Se realizaron experimentos de desnaturalización inducida por urea de LAO P16A, que fueron seguidos por DC. Al igual que LAO wt, la curva de desnaturalización de la mutante fue monofásica (fig. 39) y los valores de  $\Delta G_{DN}$ ,  $m_{DN}$  y  $C_m$  obtenidos del ajuste a un modelo de dos estados fueron de  $7.8 \pm 1.8$  Kcal mol<sup>-1</sup>,  $3.6 \pm 0.8$  Kcal mol<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup> y 2.2 M, respectivamente (Tabla 5). Como podemos observar, la estabilidad de LAO se ve comprometida por la mutación, ya que la mutante presenta un  $\Delta G_{DN}$  menor al de la proteína silvestre. Sin embargo, el valor de  $m$  no se modifica lo cual indica que la cooperatividad del proceso se conserva.



**Figura 39.** Curva de desnaturalización inducida por urea de LAO P16A, seguida por DC.

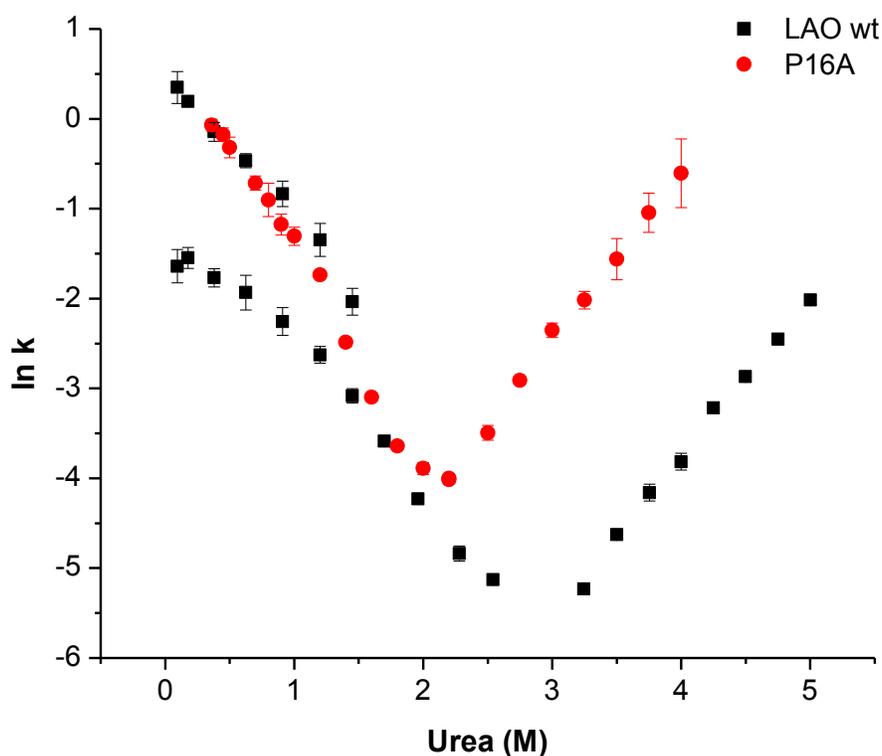
	LAO wt (CD)	LAO P16A (DC)
$\Delta G$ (Kcal mol <sup>-1</sup> )	10.3 ± 0.3	7.8 ± 1.8
$m$ (Kcal mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	3.7 ± 0.1	3.6 ± 0.8
$C_m$ (M)	2.7	2.2

**Tabla 5.** Valores de  $\Delta G_{DN}$ ,  $m_{DN}$  y  $C_m$  obtenidos a partir de las curvas desnaturalización inducida por urea, seguidas por DC, de LAO wt y LAO P16A.

### Experimentos cinéticos de replegamiento y desplegamiento

Se estudió la cinética de renaturalización y desnaturalización de LAO P16A inducida por urea, seguidos por DC. A diferencia de la proteína silvestre, todas las cinéticas de la mutante se ajustaron a una sola exponencial. De este modo, el gráfico de chevron presenta una rama con curvatura en la zona de replegamiento, la cual coincide con la rama rápida en el gráfico de LAO silvestre (fig. 40). Estos resultados indican que, como se había sugerido anteriormente, la isomerización de la prolina 16 determina la presencia del proceso lento observado en el replegamiento de LAO silvestre.

El ajuste del chevron de LAO P16A a un modelo secuencial muestra que las constantes  $K_{DI}$  y  $k_{IN}$  presentan valores muy similares a los obtenidos para LAO silvestre, sin embargo, la velocidad de desnaturalización se acelera un orden de magnitud (tabla 6). Por lo tanto, la mutación P16A tiene un impacto negativo en la estabilidad del estado nativo y no en el intermediario ni en el estado de transición ( $\phi_I=0$ ,  $\phi_{\ddagger}=0.1$ ). El valor de  $\Delta G_{DN}$  calculado a partir de las constantes de velocidad es 1.3 kcal mol<sup>-1</sup> menor al de la proteína silvestre y coincide con el obtenido de los experimentos al equilibrio (tabla 7). Por otra parte, los valores de  $\beta_{T\ddagger}$  y  $\beta_{T_I}$  son de 0.67 y 0.49, muy similares a los de LAO wt (tabla 7).



**Figura 40.** Comparación de los gráficos de Chevron obtenidos a partir de los experimentos cinéticos seguidos por DC, tanto de LAO wt (■) como LAO P16A (●).

	LAO wt	LAO P16A
$K_{DI}$	$35.4 \pm 22$	$45.4 \pm 46$
$k_{IN} (s^{-1})$	$1.3 \pm 0.5$	$1.5 \pm 0.25$
$k_{NI} (s^{-1})$	$1.2 \times 10^{-5} \pm 2 \times 10^{-6}$	$1.4 \times 10^{-4} \pm 4 \times 10^{-5}$

**Tabla 6.** Constantes de velocidad obtenidas del ajuste del gráfico de chevron de LAO wt y LAO P16A a un modelo secuencial.

	LAO wt	LAO P16A
$\Delta G_{DI} (kcal mol^{-1})$	-2.1	-2.2
$\Delta G_{DN}$	-9.0	-7.7
$\Delta G_{DN} (Equilibrio)$	$-10.3 \pm 0.3$	$-7.8 \pm 1.8$
$\beta_{T_i}$	0.55	0.49
$\beta_{T_{\ddagger}}$	0.67	0.67

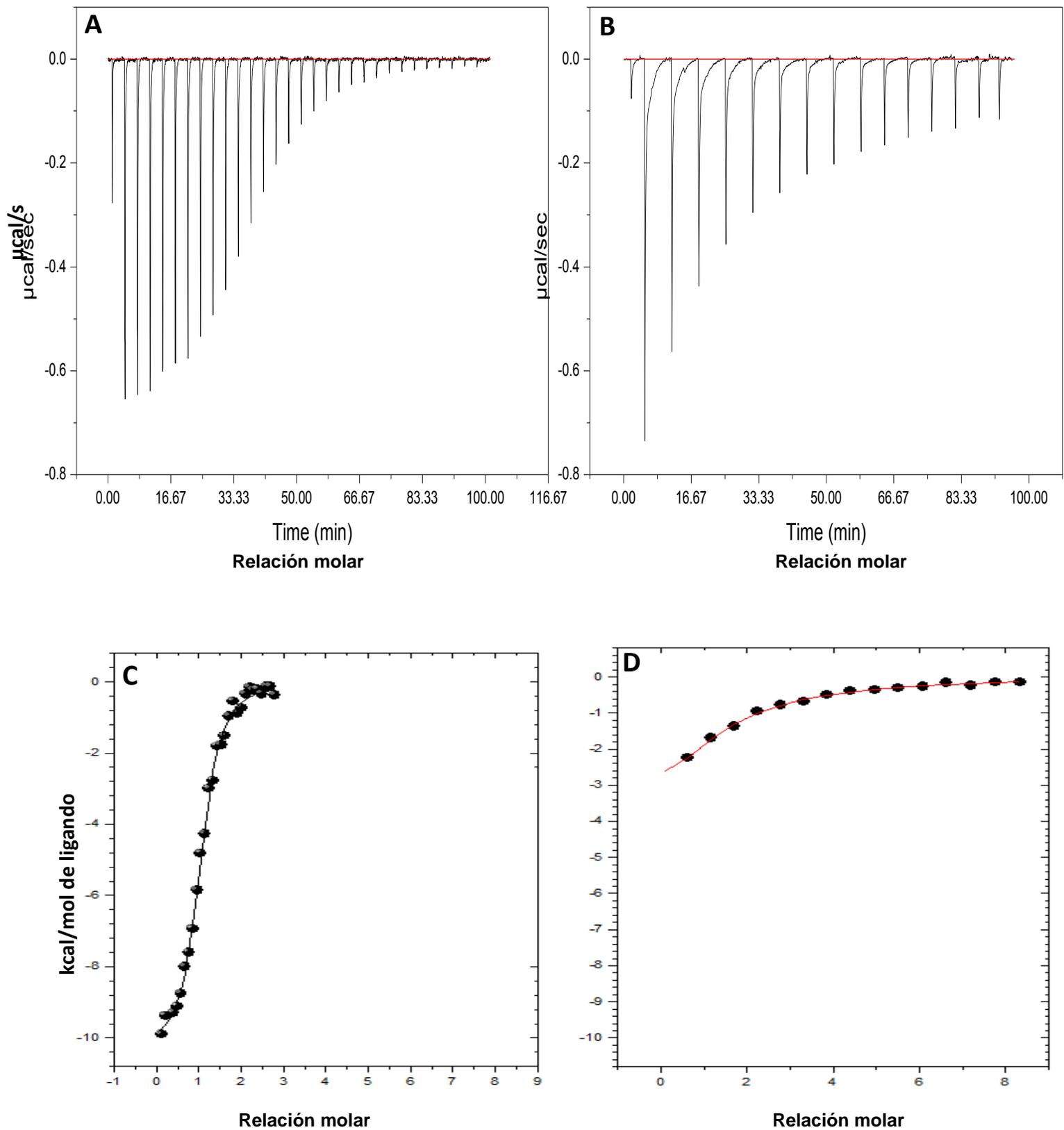
**Tabla 7.** Valores de energía libre y  $\beta_T$  calculados a partir de las constantes obtenidas del ajuste los experimentos cinéticos a un modelo secuencial, así como de los experimentos al equilibrio.

### Calorimetría de titulación isotérmica

Se realizaron experimentos de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) de LAO P16A en presencia de histidina para conocer el efecto de la mutación en la termodinámica de unión (fig. 41). Los resultados obtenidos muestran diferencias claras entre la proteína silvestre y la mutante (tabla 8). La constante de disociación ( $K_d$ ) calculada para LAO P16A es de 146  $\mu\text{M}$ , dos órdenes de magnitud mayor a la  $K_d$  de LAO wt (2.7  $\mu\text{M}$ ). Por otra parte, los valores de  $\Delta H$  y  $T\Delta S$  obtenidos fueron de -6.8  $\text{Kcal mol}^{-1}$  y -1.5  $\text{Kcal mol}^{-1}$  respectivamente, lo cual da como resultado un  $\Delta G$  de -5.3  $\text{Kcal mol}^{-1}$ , 2.3  $\text{Kcal mol}^{-1}$  menor a la proteína silvestre. Como se puede observar, la mutación de la prolina 16 tiene un efecto importante en la unión de LAO a histidina, ya que dicho proceso se vuelve menos entálpico y el  $\Delta G$  se reduce considerablemente (tabla 8), provocando así una disminución significativa en la afinidad.

	LAO wt	LAO P16A
<b><math>K_d</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	2.7 $\pm$ 1.9	146 $\pm$ 19
<b><math>\Delta H</math> (<math>\text{Kcal mol}^{-1}</math>)</b>	-8.2 $\pm$ 0.2	-6.8 $\pm$ 1.4
<b><math>T\Delta S</math> (<math>\text{Kcal mol}^{-1}</math>)</b>	-0.6	-1.5
<b><math>\Delta G</math> (<math>\text{Kcal mol}^{-1}</math>)</b>	-7.6	-5.3

**Tabla 8.** Valores de  $K_d$ ,  $\Delta H$ ,  $T\Delta S$  y  $\Delta G$  obtenidos a partir de los experimentos de ITC de LAO wt y LAO P16A en presencia de histidina.



**Figura 41.** Isothermas obtenidas de los experimentos de ITC para la unión de LAO wt (A) y LAO P16A (B) a histidina, y sus respectivas integraciones (C y D).

## DISCUSIÓN

### Termodinámica y cinética del plegamiento de LAO

Estudios de desplegamiento de LAO utilizando temperatura y urea como agentes desnaturalizantes, han mostrado que dicho proceso es altamente reversible y presenta un comportamiento de dos estados (Vergara, 2011). Estas observaciones también se ha reportado para la proteína de unión a maltosa (Ganesh. 1997) y la proteína de unión a arabinosa (Fukada, 1983), PBPs de tipo II de 370 y 306 residuos, respectivamente. Por otra parte, experimentos de DSC realizados para la proteína de unión a histidina, cuya identidad con LAO es del 80 % y comparten la misma topología (RMSD=1.1 Å), sugieren que su desplegamiento se ajusta a un modelo de tres estados (Kreimer, 2000). Sin embargo, debido a que las trazas calorimétricas presentadas son curvas simétricas, es muy probable que la desnaturalización de HisJ también pueda ser descrita por un modelo de dos estados. Los resultados obtenidos para estas proteínas son interesantes ya que sugieren que el desplegamiento de las PBPs no presenta intermediarios estables. En contraste, otras proteínas de igual o menor tamaño y complejidad, como son la triosa fosfato isomerasa e Im7 (Capaldi, 2001), se despliegan en dos o más etapas. Debido a que las PBPs muestran diferencias en tamaño y topología, es posible atribuir la alta reversibilidad y cooperatividad observada en la desnaturalización inducida por temperatura y urea a la estructura general que comparten dichas proteínas.

A diferencia de la sencillez mostrada en la desnaturalización de LAO al equilibrio, los estudios cinéticos fueron más complejos ya que el gráfico de chevron presentó dos ramas en la zona de replegamiento, ambas con curvatura. Estas características difieren a las esperadas para un proceso cinético de dos estados, tal como se observó para la proteína Csp, cuyo chevron muestra una sola rama lineal en esta región (Schindler, 1995). La presencia de dos constantes de velocidad en las cinéticas de renaturalización, así como de curvatura en la rama de replegamiento en el gráfico de chevron, se ha observado previamente para otras proteínas, como son la lisozima, RNasa A, Che Y, Ubiquitina, Citocromo c e Im7, entre otras (Capaldi, 2001; Gianni, 2003; Büchner, 2004; Bofill, 2005;

Kathuria, 2008). En la mayor parte de los casos se encontró que dichas características son consecuencia de la formación de intermediarios cinéticos. Sin embargo, en algunos de ellos, como fue para RNasa A y Che Y, este comportamiento estuvo determinado por la presencia de isomerización de prolina, o la combinación de ambos fenómenos.

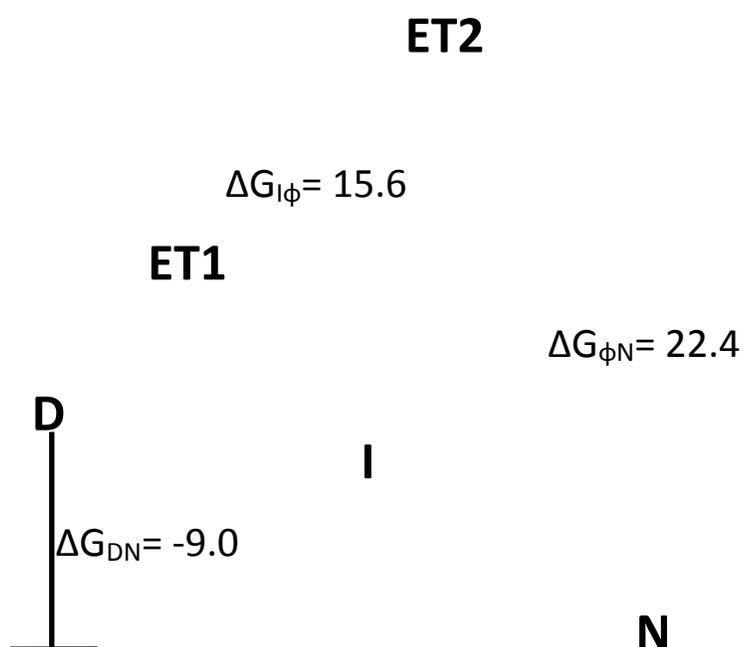
Los experimentos de doble salto, realizados inicialmente por Brandts y colaboradores en estudios sobre la RNasa A (Brandts, 1975), mostraron que a tiempos de desnaturalización menores a los 10 s la cinética de velocidad lenta en el replegamiento de LAO desaparece, y reaparece a tiempos mayores. Estos resultados coinciden con los tiempos de relajación reportados para la isomerización de prolina (10 s a 60 s), lo cual sugiere que dicho proceso está presente en el plegamiento de LAO. Los estudios de renaturalización en presencia de prolil-isomerasa confirman la existencia de isomerización de prolina, ya que todas las cinéticas perdieron la constante de velocidad lenta, al igual que en los experimentos de doble salto. Estos resultados indican que la rama correspondiente a dicha constante en el gráfico de chevron, está determinada por este fenómeno. Sin embargo, la existencia de curvatura en la rama rápida, aun en presencia de ciclofilina, demuestra la formación de un intermediario cinético.

Se ha reportado la presencia de intermediarios en el plegamiento de varias proteínas, los cuales han mostrado diferentes características estructurales y se han encontrado fuera o dentro de la vía, formando parte de vías paralelas o secuenciales. Por ejemplo, los estudios de plegamiento realizados para Im7 mostraron la formación de un intermediario dentro de la vía, cuya estructura se encuentra semiplegada y presenta interacciones no nativas (Friel, 2004). Por otra parte, en el trabajo realizado por Kiefhaber se observó que la lisozima puede plegarse a través de un intermediario secuencial o directamente en un proceso de dos estados (Kiefhaber, 1997). De acuerdo a estudios de intercambio deuterio-hidrógeno, este intermediario muestra uno de sus dos dominios totalmente plegado y el otro desplegado. Otro caso es el de la proteína Che Y, cuya duplicación génica dio origen a las PBPs, de acuerdo a lo propuesto (Fukami-Kobayashi, 1999). El proceso de plegamiento de esta proteína es un ejemplo de la existencia de isomerización de prolina en conjunto con la formación de un intermediario, tal y como se observa para LAO. En este caso, una parte de

la población del estado desnaturalizado muestra una prolina en configuración *cis* y la otra en *trans*. Ambas especies dan origen a un intermediario no productivo, el cual debe desplegarse nuevamente para poder llegar al estado nativo. De este modo, la estructura nativa es adquirida directamente desde el estado desnaturalizado y su formación es limitada por la presencia del intermediario. Al igual que la especie de proteína desplegada, los estados nativo e intermediario pueden encontrarse con la prolina en *cis* o *trans*.

El ajuste del gráfico de chevron de LAO a un modelo secuencial y a uno de tres estados con un intermediario no productivo parece indicar que el intermediario se encuentra dentro de la vía, y para corroborarlo se realizaron experimentos de replegamiento interrumpido. El modelo no productivo no logra describir correctamente el cambio de las fracciones de proteína a través del tiempo, por lo cual podemos descartarlo como posible mecanismo de plegamiento. De manera contraria, el modelo secuencial se ajustó adecuadamente y los valores calculados de las constantes  $k_{DI}$ ,  $k_{IN}$  y  $k_{NI}$  concuerdan con los valores obtenidos del chevron, extrapolados a 0.8M de urea. No obstante, el modelo triangular se ajusta mejor a tiempos menores a los 5 s. Los valores de las constantes de velocidad  $k_{DI}$ ,  $k_{IN}$ ,  $k_{ID}$  y  $k_{NI}$  obtenidas del ajuste a ambos modelos son muy similares, lo cual indica que efectivamente el intermediario se encuentra dentro de la vía. Sin embargo, a pesar de que el ajuste al modelo triangular es mejor que el secuencial, no es posible afirmar la existencia de una vía directa entre el estado desnaturalizado y el nativo. Para ello es necesario obtener mayor información, como se realizó para la lisozima (Kiefhaber, 1997). En dichos estudios, la presencia de una vía directa en el plegamiento de la lisozima se infirió a partir de la existencia de una fase explosiva en la curva de  $F_N$  con respecto al tiempo, de aproximadamente el 10% de la amplitud total. Estos resultados indicaron que la formación del estado nativo de la lisozima se lleva a cabo a partir de dos constantes de velocidad, una lenta debida a la formación del intermediario y una rápida debido a la vía directa. Estas observaciones fueron confirmadas a través de experimentos de resonancia magnética nuclear. En nuestro caso, no observamos fase explosiva ya que la extrapolación de  $F_N$  a  $t_0 \approx 0$ . (fig. 33). Además de ello, en el plegamiento de la lisozima, así como en otras proteínas (Kiefhaber, 1997; Gianni 2003), el valor de la constante  $k_{DN}$  que describe la vía directa entre

D y N es mayor a las constantes  $k_{DI}$  y  $k_{IN}$ , en contraste a lo observado para LAO al ajustar al modelo triangular. Con base a estas observaciones, concluimos en que el mecanismo más sencillo que describe el plegamiento de LAO es de tres estados con un intermediario dentro de la vía (fig. 40). Sin embargo no descartamos la posibilidad de una vía directa entre los estados N y D.



**Figura 40:** Coordenada de reacción de LAO.

Los valores de  $\Delta G_{DN}$  y  $m_{DN}$ , calculados para LAO a partir de las constantes y las pendientes del ajuste del chevron a un modelo secuencial, ( $-9.0 \text{ kcal mol}^{-1}$  y  $3.4 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$  respectivamente) son muy similares a los obtenidos de los experimentos al equilibrio ( $-10.3 \text{ kcal mol}^{-1}$  y  $3.7 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ). Por otra parte, la  $\beta$  de Tanford, calculada para el intermediario y el estado de transición (0.55 y 0.67 respectivamente), sugieren que el área accesible al solvente de ambas especies es aproximadamente la mitad del área en el estado nativo. Estos resultados son compatibles con un escenario en el cual el intermediario de LAO presenta un lóbulo plegado y el otro desplegado, o ambos dominios parcialmente plegados. Para ello, es necesario caracterizar con mayor detalle la estructura de ambas especies, ya sea a través de mutaciones y el análisis de valores  $\phi$  o de resonancia magnética nuclear.

Aun no existe información cinética sobre el plegamiento en otra PBP; sin embargo, experimentos de microscopía de fuerza atómica de molécula única han mostrado la existencia de un intermedio cuando MBP es sometida a estrés mecánico. De igual manera, también se ha realizado la caracterización termodinámica y cinética de Che Y, proteína que dio origen a la familia de PBPs. De acuerdo a estos estudios, al equilibrio el desplegamiento de CheY presenta un comportamiento de dos estados, tal y como se ha observado para LAO y otras PBPs. Sin embargo, el replegamiento de Che Y muestra un intermediario de fase “explosiva”, así como isomerización de prolinas. Está claro que un modelo de dos estados puede describir el desplegamiento al equilibrio de las PBPs y de Che Y, las cuales muestran un plegamiento tipo Rosmann y se encuentran relacionadas filogenéticamente. Por otra parte, los enfoques cinéticos y mecánicos han mostrado que el proceso de plegamiento para estas proteínas presentan características comunes todas ellas, así como diferencias. El estudio de varias PBPs por distintos métodos es importante para estudiar detalladamente el plegamiento de proteínas y determinar las propiedades que surgen como consecuencia de las características estructurales compartidas y aquellos que se originan a partir de las peculiaridades de cada grupo de PBPs.

## Mutante P16A

Puesto que la prolina 16 se encuentra en configuración *cis* en la estructura de LAO, se realizó la mutante P16A para determinar si dicho residuo es responsable de la reacción de isomerización observada en el plegamiento de LAO. Los experimentos de desnaturalización inducida por urea sugieren que la estabilidad de la proteína se ve afectada por la mutación. El  $\Delta G_{DN}$  calculado para LAO P16A ( $\Delta\Delta G$ ) es 2.5 kcal mol<sup>-1</sup> menor al de LAO wt. Por otra parte, los experimentos cinéticos indican que, efectivamente, el proceso lento observado en el replegamiento de LAO es determinado por la isomerización de P16. La amplitud de dicha constante contribuye aproximadamente al 70% de la señal, mientras que la amplitud de la constante rápida es del 30%. Estos valores concuerdan con las poblaciones de los isómeros *trans* y *cis* al equilibrio reportados en la literatura (Pappenberger, 2003). El ajuste del chevron de LAO P16A a un modelo secuencial muestra que las constantes  $K_{DI}$  y  $k_{NI}$  presentan valores muy similares a los obtenidos para LAO wt, sin embargo, la velocidad de desnaturalización se acelera un orden de magnitud (fig. 38). El valor de  $\Delta G_{DN}$  calculado es menor al de la proteína silvestre, tal y como se observó en los experimentos al equilibrio. Por lo tanto, la mutación P16A tiene un impacto negativo en la estabilidad del estado nativo (fig. 41). Por el contrario, el estado de transición y el intermediario no se ven afectados ( $\phi_{\ddagger}=0.1$ ,  $\phi_I=0.1$ ,  $\beta T_{\ddagger}=0.67$  y  $\beta T_I=0.49$ ).

Interesantemente, la mutación P16A también repercute de manera importante en la función. Los experimentos de ITC indican que la presencia del isómero *cis* de la prolina 16 es relevante para la unión, puesto que su mutación afecta significativamente al  $\Delta H$  y al  $\Delta S$  del proceso, lo cual se refleja directamente en la disminución de la afinidad de LAO por histidina (fig. 42). Los resultados obtenidos en éste trabajo muestran la relación estructura-función en LAO ya que la desestabilización de la estructura a causa de la mutación de la prolina 16, la cual se encuentra fuera del sitio de unión, también afecta de manera relevante su función.

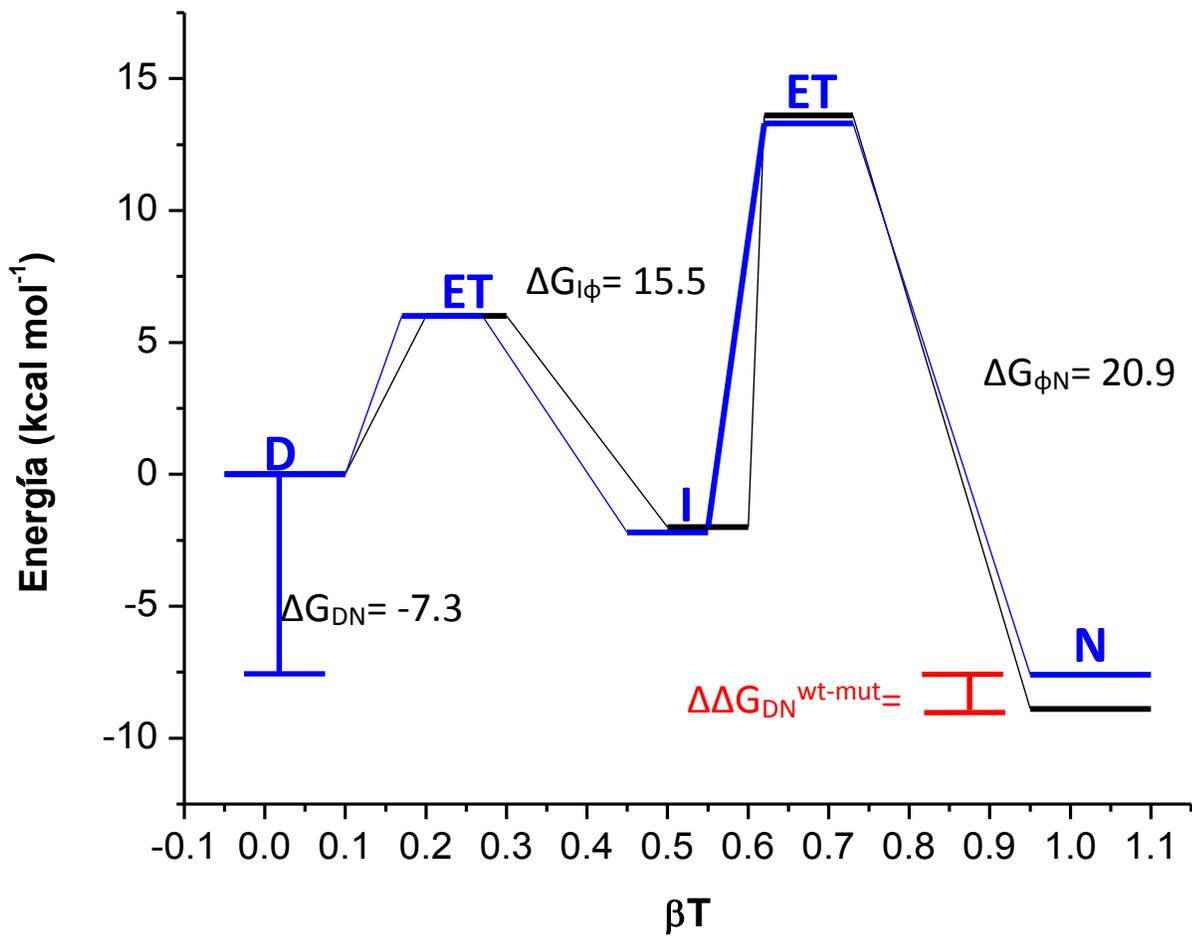


Figura 41: Coordenada de reacción de LAO P16A (azul), comparada con la coordenada de reacción de LAO wt (negro).

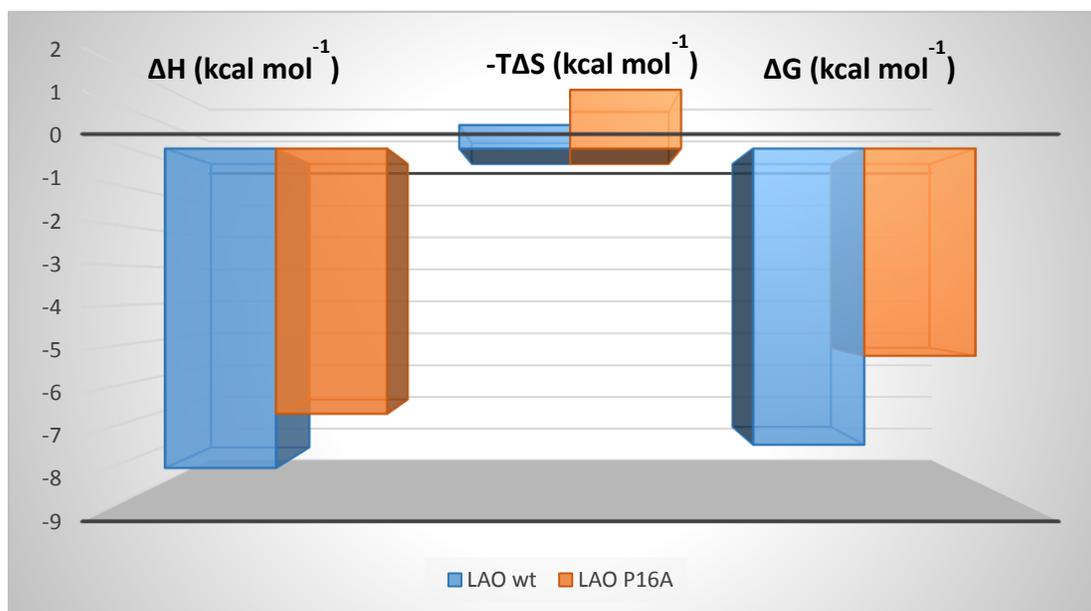
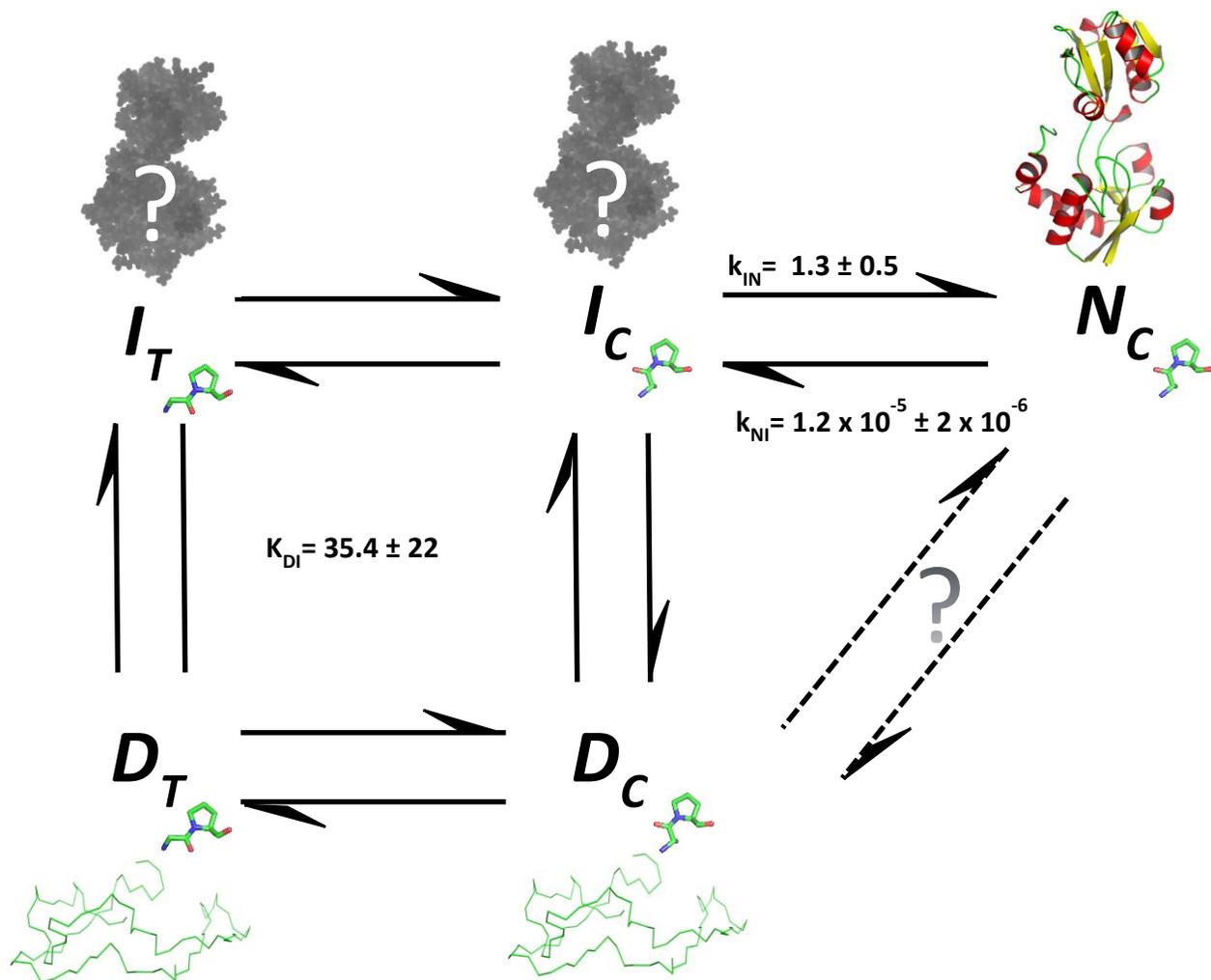


Figura 42: Comparación de los perfiles de energía para la unión de LAO wt y P16A a histidina.

## Mecanismo de plegamiento e isomerización de prolinas

La última incógnita en este trabajo es el papel de la isomerización de prolinas en el mecanismo de plegamiento. Como se ha reportado previamente (Kathuria, 2008), la isomerización de prolinas es un proceso independiente de la concentración de desnaturizante; sin embargo, la rama lenta del chevron depende de la concentración de urea. Además, dicha rama presenta curvatura. Este comportamiento se debe a que la velocidad de formación del estado nativo a partir del intermediario es muy similar a la velocidad de isomerización. De este modo, a concentraciones de urea de 1.5 a 2.75 M la constante de velocidad  $k_{IN}$ , la cual depende de la concentración de desnaturizante, es menor a la constante de isomerización  $k_{T-C}$ , por lo cual es limitante en esas condiciones. Esto propicia que las cinéticas de replegamiento sean monoexponenciales y el valor de la constante se modifique con la concentración de desnaturizante. De manera contraria, de 0 a 1.5 M de urea  $k_{IN}$  es mayor que  $k_{T-C}$ , lo cual vuelve a la isomerización el paso limitante. Por ello, a concentraciones menores a 1.5 M las cinéticas presentan dos constantes de velocidad, la lenta consecuencia de la isomerización. La transición entre uno y otro paso limitante provoca la curvatura en la rama lenta del chevron ya que el paso de I a N depende de la concentración de urea y la isomerización de prolinas no. Los estudios cinéticos de la mutante P16A indican que dicho residuo es responsable de la isomerización observada en el plegamiento de LAO. Más aun, dicha mutación afecta la estabilidad del estado nativo pero no del intermediario ni del estado de transición. Estos resultados sugieren que la región en la estructura de LAO que se ve afectada por la isomerización de la prolina 16 se forma en una etapa tardía del plegamiento. Por lo tanto, el intermediario se puede formar sin importar la configuración de la prolina. Con base en esta información y suponiendo que el estado nativo sólo se adquiere cuando la prolina se encuentra en la configuración adecuada, el mecanismo mínimo que explica los datos experimentales obtenidos hasta el momento para el plegamiento de LAO se muestra en la figura 44.



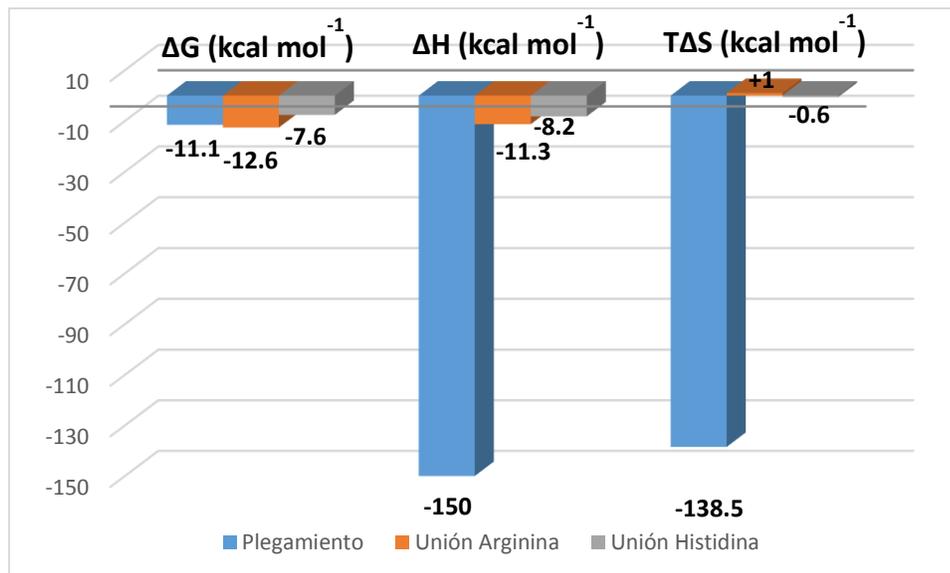
**Figura 44:** Mecanismo de plegamiento propuesto para LAO.

### Estabilidad y función

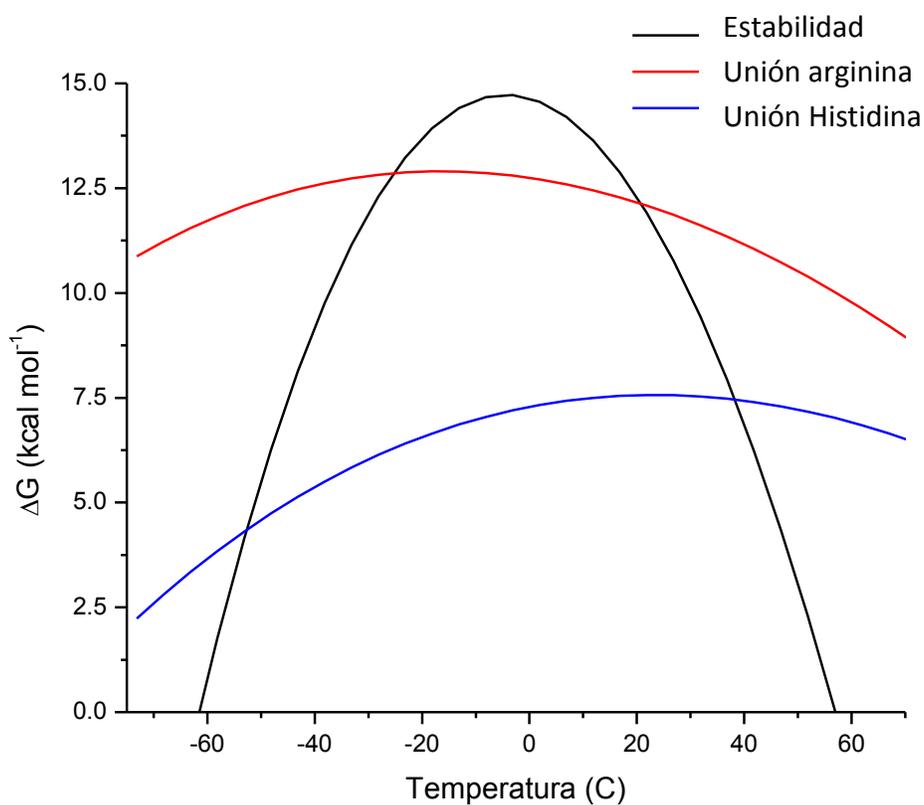
Como se mencionó anteriormente, las proteínas presentan una estabilidad muy pequeña debido a que las fuerzas que propician la formación de su estructura son compensadas por fuerzas que la desestabilizan. Sin embargo, la presencia de flexibilidad estructural es importante para la función y por ello se ha propuesto que la evolución de las secuencias con fines funcionales ha comprometido la estabilidad (Brockwell, 2007).

Como podemos observar en la figura 45, a 25 °C, el cambio en la energía libre de unión a arginina ( $\Delta G_b$ ) es ligeramente mayor al  $\Delta G$  de plegamiento ( $\Delta\Delta G = 1.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). Aunque el  $\Delta H$  de plegamiento es mucho mayor al de unión, el  $T\Delta S$  aumenta en la misma proporción, por lo cual ambos factores se compensan. De manera contraria, a 25 °C, el  $\Delta G_b$  para la unión a histidina es más pequeño que  $\Delta G_{N-D}$  ( $\Delta\Delta G = 4.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) (fig. 45). La dependencia del  $\Delta G_b$  con la temperatura, para ambos ligandos, es menor en comparación a la dependencia de  $\Delta G_{N-D}$  (fig. 46), lo cual asegura que la función de LAO persista aunque su estabilidad disminuya debido a cambios en la temperatura y puede estar relacionado con el ambiente cambiante en el cual las bacterias se desarrollan. La curva de  $\Delta G_b$  contra  $T$  interseca con la curva de estabilidad a -22 °C y 25 °C, indicando que la energía de plegamiento supera al de unión en este intervalo de temperaturas. A temperaturas mayores a 25 °C (y menores a -22 °C) y la energía de interacción proteína-ligando sobrepasa la estabilidad. Dichos resultados muestran como, en estas condiciones, la energía de interacción entre LAO y arginina es mayor a la energía que mantienen a la proteína en su estado nativo en conformación abierta. De igual manera, la curva para la unión de histidina interseca dos veces con la de estabilidad, sin embargo, en este caso a -53 °C y 38 °C, por lo cual el  $\Delta G_{N-D}$  es mayor a la energía de interacción con histidina en un intervalo más amplio de temperatura (fig. 46). Por otra parte, la temperatura de máxima estabilidad de LAO (-4 °C) se encuentra entre las temperaturas de unión máxima para ambos ligandos (-18 °C y 24 °C para arginina e histidina respectivamente), aunque más cercana a la de arginina.

A partir de estos resultados podemos observar como la estructura de LAO es estabilizada, de manera general, por un  $\Delta G_{N-D}$  cuyo valor es intermedio a los valores de energía para su interacción con arginina e histidina, ligandos de mayor y menor afinidad, respectivamente. Este comportamiento se debe, muy probablemente, a la existencia de un balance energético entre la estabilidad y la función, y para corroborarlo sería interesante estudiar a detalle ambas características en otros sistemas.



**Figura 45:** Comparación de los perfiles de energía para el plegamiento y la unión de LAO a arginina e histidina.



**Figura 46:** Dependencia del valor de  $\Delta G$  para la unión de LAO a arginina e histidina en comparación con la curva de estabilidad

## CONCLUSIONES

El estudio detallado del proceso de plegamiento en proteínas homólogas es un enfoque que se ha empleado con el objetivo de dilucidar las bases estructurales que rigen las características de dicho proceso. En este trabajo se caracterizó el mecanismo de plegamiento de LAO, el cual será la base para el estudio comparativo con HisJ y otras PBPs. Como pudimos observar, al equilibrio el plegamiento de LAO es un proceso altamente reversible y muestra un comportamiento de dos estados, tal y como se reportó para MBP y ABP, así como para Che Y. Probablemente esta sea una característica ligada a la estructura general de las PBPs, la cual podría favorecer la cooperatividad y reversibilidad del plegamiento de proteínas. Sin embargo, el estudio detallado del proceso en estas proteínas ha mostrado que todas ellas presentan intermediarios cinéticos o mecánicos, los cuales a su vez se encuentran formando parte de distintos mecanismos. Por ejemplo, el intermediario de Che Y parece encontrarse dentro de la vía, mientras que para MBP forma parte de vías paralelas. Sin embargo, a diferencia de CheY y MBP, el intermediario de LAO parece ser parte de un mecanismo secuencial. Por otra parte, el plegamiento de Che Y y LAO están caracterizados por la presencia de isomerización de prolina. Es necesario estudiar a fondo el plegamiento de otras PBPs para determinar si estas características están ampliamente distribuidas en los miembros de esta familia de proteínas, así como indagar en sus bases estructurales. Por último, los estudios con la mutante P16A han mostrado el estrecho lazo que existe entre la estructura y la función, dado que la perturbación estructural de LAO a causa de la mutación tiene un efecto directo sobre su función. Por ello, para profundizar en la comprensión de las propiedades de las proteínas es importante el estudio detallado de los factores que proporcionan estabilidad a dichas macromoléculas y aquellas que determinan sus características funcionales.

## REFERENCIAS

- Aghera, N., & Udgaonkar, J. B. (2012). Kinetic Studies of the Folding of Heterodimeric Monellin: Evidence for Switching between Alternative Parallel Pathways. *Journal of molecular biology*, 420(3), 235-250.
- Aggarwal, V., Kulothungan, S. R., Balamurali, M. M., Saranya, S. R., Varadarajan, Raghavan, & Ainavarapu, S. R. K. (2011). Ligand-modulated parallel mechanical unfolding pathways of maltose-binding proteins. *The Journal of biological chemistry*, 286, 28056-65.
- Anfinsen, C. B., Haber, E., Sela, M., & White, F. H. (1961). The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 47, 1309-14.
- Barrick, D. (2010). What have we learned from the studies of two-state folders, and what are the unanswered questions about two-state protein folding? *Phys Biol*, 6, 1-17.
- Baldwin, R. L. (1996). On-pathway versus off-pathway folding intermediates. *Folding and Design*, 1, 1-8.
- Bartlett, A. I., & Radford, S. E. (2009). An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms. *Nature structural & molecular biology*, 16, 582-8.
- Berntsson, R. P., Smits, S. H. J., Schmitt, L., Slotboom, D.-J., & Poolman, B. (2010). A structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS letters*, 584(12), 2606-17.
- Bofill, R., Simpson, E. R., Platt, G. W., Crespo, M. D., & Searle, M. S. (2005). Extending the folding nucleus of ubiquitin with an independently folding beta-hairpin finger: hurdles to rapid folding arising from the stabilisation of local interactions. *Journal of molecular biology*, 349(1), 205-21.

- Borgia, A., Bonivento, D., Travaglini-Allocatelli, C., Di Matteo, A., & Brunori, M. (2006). Unveiling a hidden folding intermediate in c-type cytochromes by protein engineering. *The Journal of biological chemistry*, *281*, 9331-6.
- Brockwell, D. J., Radford, S. E. (2007). Current Opinion in Structural Biology Intermediates : ubiquitous species on folding energy landscapes ? *Current Opinion in Structural Biology*, *17*, 30-37.
- Bryngelson, J. D. (1995). Funnels, Pathways and the Energy Landscape of Protein Folding: A Synthesis. *Proteins*, *21*, 164-195.
- Büchner, J., & Kiefhaber, T. (2004). *Protein folding handbook*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- Capaldi, A. P., Shastry, M. C. R., Kleanthous, C., Roder, H., & Radford, S. E. (2001). Ultrarapid mixing experiments reveal that Im7 folds via an on-pathway intermediate, *8*(1), 2-6.
- Creighton, T. E., (1997). *Proteins*. W.H. Freeman and Company.
- Daggett, V., & Fersht, A. R. (2003). Is there a unifying mechanism for protein folding? *Trends in biochemical sciences*, *28*, 18-25.
- Dill, K., Chan, H. S. (1997). From Levinthal to pathways to funnels. *Nature structural biology*, *4*, 10-9.
- Dinner, R., Abkevich, V., Shakhnovich, E., & Karplus, M. (1999). Factors that affect the folding ability of proteins. *Proteins*, *35*(1), 34-40.
- Fersht, A. R. (2008). Folding: delights and scepticisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *9*, 650-654.
- Friel, C. T., Beddard, G. S., & Radford, S. E. (2004). Switching two-state to three-state kinetics in the helical protein Im9 via the optimisation of stabilising non-native interactions by design. *Journal of molecular biology*, *342*, 261-73.
- Friel, C. T., Smith, D. A., Vendruscolo, M., Gsponer, J., & Radford, S. E. (2009). The mechanism of folding of Im7 reveals competition between functional and kinetic evolutionary constraints. *Nature structural & molecular biology*, *16*, 318-24.

- Fukami-Kobayashi, K., Tateno, Y., & Nishikawa, K. (1999). Domain dislocation: a change of core structure in periplasmic binding proteins in their evolutionary history. *Journal of molecular biology*, 286, 279-90.
- Gianni, S., Travaglini-Allocatelli, C., Cutruzzolà, F., Brunori, M., Shastry, M. C. R., & Roder, H. (2003). Parallel Pathways in Cytochrome c551 Folding. *Journal of Molecular Biology*, 330(5), 1145–1152.
- Gianni, S., Ivarsson, Y., Jemth, P., Brunori, M., & Travaglini-Allocatelli, C. (2007). Identification and characterization of protein folding intermediates. *Biophysical chemistry*, 128(2-3), 105-13. doi:10.1016/j.bpc.2007.04.008
- Ganesh, C., Shah, a N., Swaminathan, C. P., Surolia, a, & Varadarajan, R. (1997). Thermodynamic characterization of the reversible, two-state unfolding of maltose binding protein, a large two-domain protein. *Biochemistry*, 36, 5020-8.
- Gorski, S. , Capaldi, P., Kleanthous, C., & Radford, S. E. (2001). Acidic conditions stabilise intermediates populated during the folding of Im7 and Im9. *Journal of molecular biology*, 312(4), 849–63.
- Haq, S. R., Jürgens, M. C., Chi, C. N., Koh, C.-S., Elfström, L., Selmer, M., & Gianni, S., (2010). The plastic energy landscape of protein folding: a triangular folding mechanism with an equilibrium intermediate for a small protein domain. *The Journal of biological chemistry*, 285(23).
- Itzhaki, L. S., Otzen, D. E., & Fersht, a R. (1995). The structure of the transition state for folding of chymotrypsin inhibitor 2 analysed by protein engineering methods: evidence for a nucleation-condensation mechanism for protein folding. *Journal of molecular biology*, 254, 260-88.
- Ivarsson, Y., Travaglini-Allocatelli, C., Brunori, M., & Gianni, S. (2008). Mechanisms of protein folding. *European biophysics journal*, 37, 721-8.
- Jackson, S. E. (1998). How do small single-domain proteins fold ? *Folding and Design*, 3(4), 81–91.
- Kiefhaber, T. (1995). Kinetic traps in lysozyme folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 9029-33.

- Kloss, E., Courtemanche, N., Barrick, D. (2008). Repeat-protein folding: new insights into origins of cooperativity, stability, and topology. *Archives of biochemistry and biophysics*, 469, 83-99.
- Korzhnev, D. M., Religa, T. L., Banachewicz, W., Fersht, A. R., & Kay, L. E. (2010). Atomic Resolution, 329, 1312-1316.
- Kreimer, D. I., Malak, H., Lakowicz, J. R., Trakhanov, S., Villar, E., & Shnyrov, V. L. (2000). Thermodynamics and dynamics of histidine-binding protein, the water-soluble receptor of histidine permease. Implications for the transport of high and low affinity ligands. *European journal of biochemistry / FEBS*, 267, 4242-52.
- Lindberg, M. O., & Oliveberg, M. (2007). Malleability of protein folding pathways: a simple reason for complex behaviour. *Current opinion in structural biology*, 17, 21-9.
- Morris, E. R., & Searle, M. S. (2012). Overview of protein folding mechanisms: experimental and theoretical approaches to probing energy landscapes. *Current protocols in protein science, Chapter 28* (April), Unit 28.2.1–22.
- Nikaido, K., Ames, G. F. (1992). Purification and characterization of the periplasmic lysine-, arginine-, ornithine-binding protein (LAO) from *Salmonella typhimurium*. *The Journal of biological chemistry*, 267, 20706-12.
- Oh, B., Ames, G. F., Kim, S. H. (1994). Structural basis for multiple ligand specificity of the periplasmic lysine-, arginine-, ornithine-binding protein. *The Journal of biological chemistry*, 269, 26323-30.
- Oh, B., Pandits, J., Kang, C.-hee, Nikaido, K., Gokcen, S., Ames, G. F., et al. (1993). Three-dimensional Structures of the Periplasmic Lysine/Arginine/Ornithine-binding Protein with and without a ligand. *The Journal of biological chemistry*, 268, 11348-11355.
- Oldham, M. L., Chen, J. (2011). Crystal structure of the maltose transporter in a pretranslocation intermediate state. *Science*, 332, 1202-5.
- Onuchic, J. N., Wolynes, P. G. (2004). Theory of protein folding. *Current opinion in structural biology*, 14, 70-5.

- Pappenberger, G., Bachmann, A., Müller, R., Aygün, H., Engels, J. W., & Kiefhaber, T. (2003). Kinetic Mechanism and Catalysis of a Native-state Prolyl Isomerization Reaction. *Journal of Molecular Biology*, 326(1), 235–246.
- 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.
- Santoro M, Bolen D. Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry*. 1988; 27:8063–8068.
- Schindler, F. (1995). Extremely rapid protein folding in the absence of intermediates. *Nature structural biology*, 2, 663-673.
- Vergara Gutierrez, J. R. (2011). *El desplegamiento de la proteína LAO, estudios cinéticos y termodinámicos* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México, México DF.
- Wildegger, G., Kiefhaber, T. (1997). Three-state model for lysozyme folding: triangular folding mechanism with an energetically trapped intermediate. *Journal of molecular biology*, 270, 294-304.