



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Medicina

Licenciatura en Investigación Biomédica Básica

**“Caracterización fisicoquímica de la función y el
plegamiento de ArtJ e HisJ, dos proteínas de unión a
aminoácidos básicos”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

Presenta:

FRANCISCO AARÓN CRUZ NAVARRETE

Director de Tesis:

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos.

Agradecimientos institucionales.

A la UNAM, a la que le deseo procure mantener su autonomía y universalidad.

Al Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas (LFQIP), donde realicé la mayor parte de los experimentos de esta tesis.

A mi asesor de tesis, Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco, por permitirme realizar con holgada libertad este proyecto.

A los miembros del jurado, por sus valiosas y merecidas críticas al presente trabajo:

Dra. Adela Rodríguez Romero.

Dr. Rafael Arturo Zubillaga Luna.

Dr. Arturo Rojo Domínguez.

Dr. Miguel Antonio Costas Basín.

Al laboratorio de Biofisicoquímica de la Facultad de Química por el uso del calorímetro diferencial de barrido.

A la Dra. Gisela Edith Rangel Yescas por su invaluable asesoría y apoyo técnico en la biología molecular.

A la Dra. Isabel Velázquez López y la M. en C. Laura Álvarez Añorve por su apoyo técnico.

Esta tesis fue financiada por la Facultad de Medicina y el proyecto PAPIIT IN 219913.

Agradecimientos personales.

A mi hermana, mamá y papá, por su apoyo incondicional y su comprensión durante mi carrera.

A mi novia, Andrea, por estar a mi lado, ya sea dentro o fuera del laboratorio, y ofrecerme ayuda y consejo cuando yo no tenía la respuesta.

A Haven, por su férreo consejo e invaluable guía que influyó enormemente este trabajo y sin el cual esta tesis no se hubiera convertido en lo que es ahora.

A mis compañeros del LFQIP, por hacer más llevaderos los días de trabajo.

A mis mentores y compañeros de mis anteriores laboratorios, ya que todo lo que aprendí de ellos se ve reflejado en esta tesis.

Índice.

Índice.....	3
Abreviaturas.....	5
Resumen.....	6
Introducción.....	7
Proteínas.....	7
Fisicoquímica de proteínas.....	8
Conceptos termodinámicos.....	9
El plegamiento de proteínas desde el punto de vista termodinámico.....	12
Estudios de unión de ligandos a una proteína.....	16
Acoplamiento entre el plegamiento, la estabilidad y la unión.....	18
Proteínas de unión a ligandos.....	21
La proteína LAO.....	23
Modelos de estudio.....	24
ArtJ.....	24
HisJ.....	25
Hipótesis.....	29
Objetivo General.....	29
Objetivos Particulares.....	29
Materiales y Métodos.....	30
Materiales.....	30
Diseño de genes.....	30
Sobreexpresión y purificación de proteínas.....	30
Determinación de la concentración de proteína.....	32
Técnicas espectroscópicas.....	32
Determinación de la constante de disociación y la estequiometría de unión.....	36
Desnaturalización por temperatura.....	38
Desnaturalización por agentes químicos.....	39

Análisis de la desnaturalización térmica.....	41
Análisis de la desnaturalización química.....	43
Construcción de la curva de estabilidad.....	44
Análisis de acoplamiento unión-estabilidad.....	44
Resultados.....	46
Expresión y purificación de proteínas.....	46
Caracterización espectroscópica de ArtJ e HisJ.....	50
Experimentos de unión.....	53
Desplegamiento por temperatura.....	58
HisJ.....	58
ArtJ.....	63
Desplegamiento por agentes químicos.....	67
Curva de estabilidad.....	75
Acoplamiento unión-estabilidad.....	77
Discusión.....	81
Protocolo de expresión y purificación.....	82
Espectros de DC y fluorescencia.....	83
Caracterización de la unión.....	85
Desplegamiento térmico.....	87
Desnaturalización química.....	89
Curvas de estabilidad.....	92
Acoplamiento unión-estabilidad.....	92
Conclusiones.....	96
Perspectivas.....	97
Bibliografía.....	98

Abreviaturas.

°C	Grados Celsius.
Å	Angstroms.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ArtJ	Proteína de unión a arginina de <i>Bacillus stearothermophilus</i> .
ATP	Trifosfato de adenosina (en inglés adenosin triphosphate).
ASA	Área accesible al solvente.
BCA	Ácido bicinconínico, en inglés.
Cm	Concentración media de desnaturalización.
DC	Dicroísmo circular.
DSC	Calorimetría diferencial de barrido.
f_N	Fracción de proteína en estado nativo.
GdnHCl	Cloruro de guanidinio.
HisJ	Proteína de unión a histidina de <i>Escherichia coli</i> .
IPTG	Isopropil-b-D-1-tiogalactopiranosido.
ITC	Calorimetría de titulación isotérmica.
K	Kelvin.
K_D	Contante de disociación proteína-ligando.
K_U	Contante de equilibrio de desplegamiento.
LAO	Proteína de unión a lisina, arginina y ornitina de <i>Salmonella typhimurium</i> .
$[L]_T$	Concentración de ligando total.
λ_{ex}	Longitud de onda de excitación.
$[P]_T$	Concentración de proteína total.
PUL	Proteína de unión a ligando.
R	Constante universal de los gases ideales.
RMN	Resonancia magnética nuclear.
T_m	Temperatura media de desnaturalización.
UA	Unidades arbitrarias.
ΔH_{cal}	Entalpía de desplegamiento calorimétrica.
ΔH_D	Entalpía de desplegamiento.
ΔH_{vh}	Entalpía de desplegamiento de Van't Hoff.
ΔS_{vh}	Entropía de desplegamiento de Van't Hoff.
ΔG_D	Energía libre de Gibbs de desplegamiento.
ΔH_L	Entalpía de unión.
ΔS_L	Entropía de unión.
ΔG_L	Energía libre de Gibbs de unión.

Resumen.

Las proteínas son heteropolímeros de aminoácidos que poseen la capacidad de pasar de varias conformaciones desordenadas a una estructura tridimensional definida, estable, reproducible y funcional. El estudio fisicoquímico de las proteínas se basa en la búsqueda de un modelo microscópico (interacciones no covalentes, cambios conformacionales o de solvatación) para interpretar propiedades macroscópicas termodinámicas (entalpía, entropía y capacidad calorífica) que caracterizan su función o plegamiento.

Las proteínas de unión a aminoácidos básicos son ejemplo de proteínas con una estructura y selectividad conservadas, pero con distintas afinidades y gran diversidad de secuencia. En el laboratorio se ha estudiado la función y el plegamiento de la proteína LAO, de *Salmonella typhimurium*. Esta proteína se encarga de transportar hacia el citoplasma L-lisina, L-arginina, L-ornitina y L-histidina. Su plegamiento al equilibrio se puede explicar con un modelo de dos estados reversible. La afinidad de LAO por arginina e histidina está favorecida entálpicamente y se puede describir como un cierre de cuerpo rígido de ambos lóbulos sobre el sitio de unión.

En este trabajo se estudiaron dos proteínas de unión: HisJ, de *Escherichia coli*, y ArtJ, de *Bacillus stearothermophilus*, que comparten la misma estructura y la misma especificidad que LAO. HisJ tiene una gran afinidad por histidina y es menos afín por arginina. ArtJ precipita al unir los mismos ligandos, pero su afinidad aparente es más alta para arginina que para histidina.

El desplegamiento por temperatura de HisJ es reversible, pero ArtJ se agrega al aumentar la temperatura. Las temperaturas medias de desnaturalización (T_m) de HisJ y LAO son similares (53.2 ± 0.4 y $53.9 \pm 0.5^\circ\text{C}$ respectivamente) y mucho menores que la de ArtJ ($80.3 \pm 1.8^\circ\text{C}$). En el caso de HisJ, su T_m aumenta linealmente con respecto a la concentración de ligando, sin embargo la histidina no tiene efectos aparentes en la entalpía de desplegamiento, mientras que arginina la aumenta en casi el doble.

La estabilidad evaluada a través de desnaturalización química de HisJ es menor a la de LAO (7.7 ± 0.8 y $9.8 \pm 0.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ en urea, respectivamente) y la más estable de las tres es ArtJ ($13.5 \pm 1.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ en GdnHCl).

Aunque ArtJ e HisJ comparten estructura y función, poseen comportamientos termodinámicos diferenciados. ArtJ es más estable, esperado para una proteína termófila, su desplegamiento térmico es irreversible y se agrega en presencia de sus ligando. HisJ, aunque semejante a LAO en secuencia, es menos estable y sufre un gran cambio en sus propiedades termodinámicas al unir a sus ligandos. A partir de estos resultados se hace evidente la necesidad de considerar el efecto de la unión del ligando en la estructura, estabilidad y la dinámica conformacional de proteínas con estructura y funciones similares.

Introducción.

Proteínas.

Las proteínas son heteropolímeros de aminoácidos que poseen la capacidad de pasar de un conjunto de conformaciones desordenadas, el estado desnaturalizado, a una estructura tridimensional definida y estable, que le permite realizar su función, conocida como estado nativo (figura 1). Estas macromoléculas realizan virtualmente la totalidad de los procesos internos de la célula, por lo que poseen una enorme variedad de formas, esenciales para realizar su función (Nelson & Cox, 2008).

Dos características fundamentales que poseen las proteínas han tenido una gran relevancia en la bioquímica y la fisicoquímica de macromoléculas. La primera es el proceso por el cual una proteína pasa de un estado desnaturalizado a un estado nativo, se le conoce como plegamiento y es considerado el ejemplo más fundamental del autoensamblaje molecular en biología (Sanchez-Ruiz, 2011). C. B. Anfinsen *et al.* en 1961 concluyeron que toda la información necesaria para formar una estructura está contenida en la secuencia. Por su parte, C. Levinthal postuló en 1968 la imposibilidad de una búsqueda aleatoria en una escala de tiempo biológicamente relevante durante el plegamiento.

La otra característica importante es la función que una proteína cumple en la célula. Como resultado del plegamiento, la función depende de la secuencia de aminoácidos en la conformación espacial del estado nativo. Independientemente del tipo de función, las proteínas tienen una región (o regiones) donde la función toma lugar (un sitio de reconocimiento molecular o catalítico) y el resto de la proteína corresponde al andamiaje que mantiene estas regiones. En algunas proteínas, llamadas alostéricas, existen otros sitios de reconocimiento que pueden afectar positiva o negativamente la función, cambiando la arquitectura o el movimiento de toda la proteína. La relación entre secuencia, estructura y función es la premisa fundamental en el estudio de las proteínas, abarcando campos como la cinética

enzimática, el reconocimiento molecular y la etiología de ciertas enfermedades (Nelson & Cox, 2008).

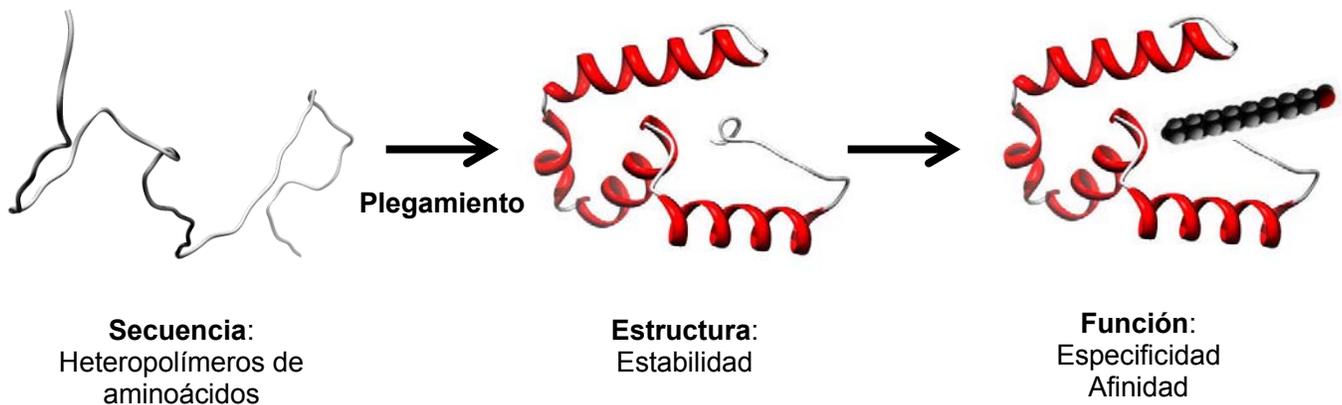


Figura 1. Ilustración de la relación secuencia-estructura-función en una proteína hipotética que une un ácido graso. El polímero de aminoácidos adopta una estructura terciaria a través del proceso de plegamiento, la cual posee una mayor estabilidad con respecto al estado desplegado. Esta estructura conocida como estado nativo es la responsable de llevar a cabo la función mediante sus sitios de reconocimiento o catálisis.

Fisicoquímica de proteínas.

De acuerdo con Gilbert Lewis “la fisicoquímica es cualquier cosa interesante” (Kasha, 1990). Formalmente, la fisicoquímica es el estudio de las propiedades macroscópicas (o de bulto) de la materia y la transformación de la energía en diferentes formas (Engel *et al.*, 2013). Utilizando las leyes, conceptos y herramientas de la física, particularmente de la termodinámica y la cinética, la fisicoquímica pretende describir fenómenos que ocurren en el mundo químico, como la catálisis, la transferencia de energía y el equilibrio químico.

En el estudio de las proteínas, la fisicoquímica ha sido, y sigue siendo, el marco teórico más sólido empleado para describir las propiedades bulto de estas macromoléculas. Uno de los objetivos más importantes en la descripción fisicoquímica del plegamiento, la estabilidad o la función de una proteína es la

interpretación molecular de estas propiedades. En otras palabras, cómo se pueden explicar las variables macroscópicas como calor en transferencia, entropía y capacidad calorífica en función de las interacciones, covalentes o no covalentes, que están presentes en las proteínas, ya sea manteniendo su estructura o siendo partícipes del sitio activo (Scheraga, 1992).

La termodinámica clásica estudia la diferencia entre un estado final y uno inicial, por lo tanto los parámetros que se obtienen representan el cambio o la diferencia entre estos estados (denotado por Δ). Dado que en este proyecto se utilizaron conceptos provenientes de la termodinámica, se introducirán brevemente éstos, usando su definición clásica y sus interpretaciones microscópicas (o moleculares).

Conceptos termodinámicos.

a) Entalpía (ΔH [=] kcal mol⁻¹).

La entalpía es el cambio en la energía interna de un sistema más la energía en forma de trabajo debido a un cambio en volumen del mismo a presión constante. A presión atmosférica, el trabajo de expansión no es significativo y en consecuencia la entalpía refleja directamente el cambio en la energía interna debido a una transferencia de energía en forma de calor. Si la dirección de transferencia de calor es hacia el sistema, el valor de ΔH es positivo y se denomina un proceso endotérmico; si el caso es el contrario, se le llama exotérmico (Engel *et al.*, 2013). Esta función de estado (dependiente sólo de los estados final e inicial) refleja microscópicamente la formación, o rompimiento, de enlaces no covalentes (figura 2), sea entre los residuos de la proteína, entre estos y el solvente o entre la proteína y otras moléculas (Lazaridis *et al.*, 1995).

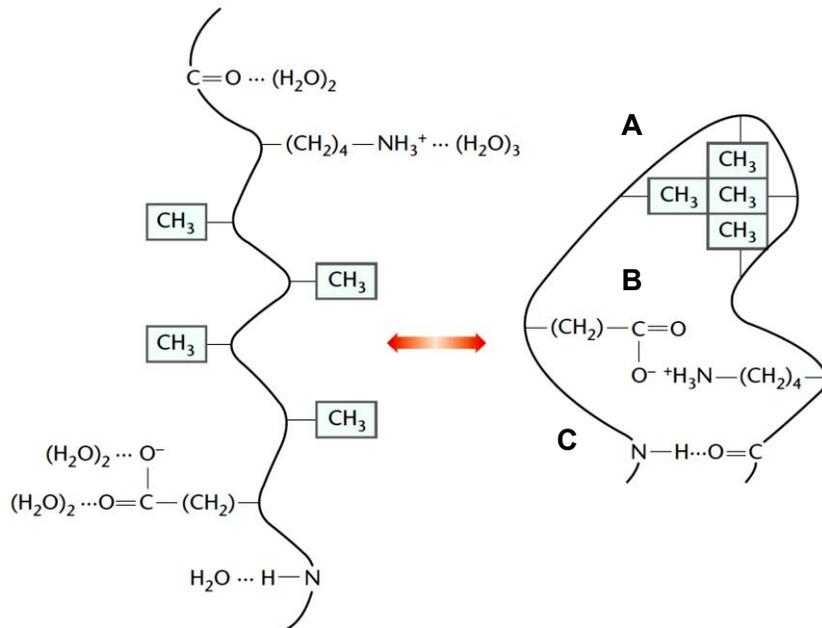


Figura 2. Esquema de un polipéptido donde se resaltan algunos grupos funcionales responsables de la formación de las interacciones no covalentes relevantes en el plegamiento de una proteína (o en su interacción con otras moléculas): **(A)** interacciones hidrofóbicas, **(B)** interacciones iónicas, **(C)** puentes de hidrógeno. La formación/destrucción o solvatación/desolvatación de estos grupos (como se ilustra en la parte izquierda) contribuyen al valor de entalpía de plegamiento o de reconocimiento (modificado de Pace, 2001).

b) Entropía ($\Delta S [=] \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$).

La entropía es una función de estado que, en su interpretación estadística, refleja el número de arreglos posibles, o grados de libertad, de un sistema, es decir, su desorden. Todo sistema aislado en equilibrio se encuentra en una configuración de máxima entropía. Los sistemas abiertos, como los seres vivos, pueden disminuir su entropía al aumentar la de sus alrededores en al menos la misma magnitud (Engel *et al.*, 2013). Esta función se puede interpretar a nivel molecular como los grados de libertad que una proteína gana o pierde al desplegarse o al interactuar con otras moléculas (figura 3). Los cambios en la capa de solvatación de la proteína también influyen en su magnitud (Pace, 2001).

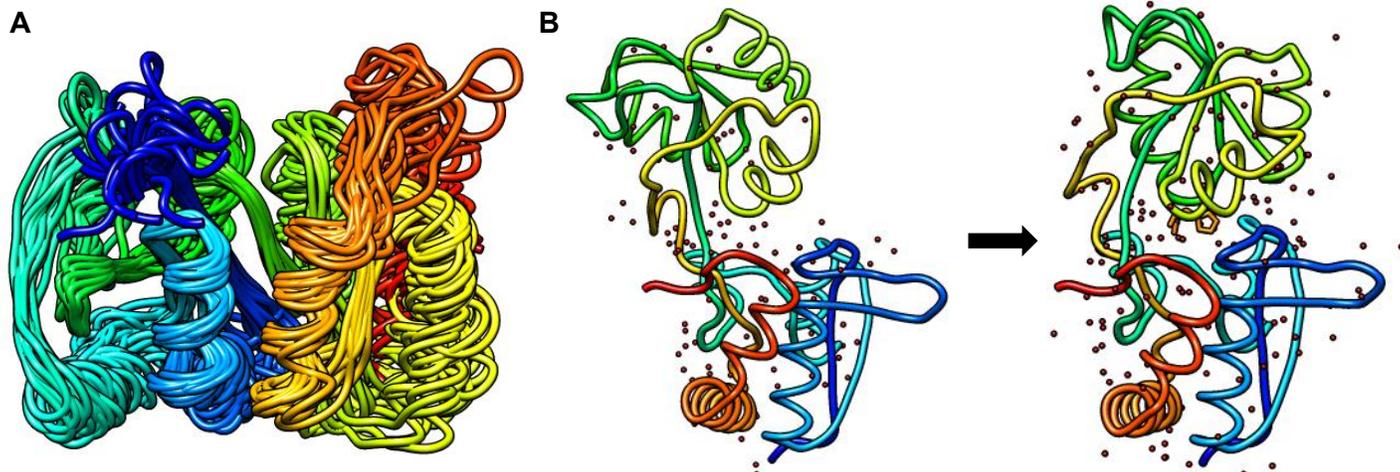


Figura 3. En las proteínas las bases moleculares de la entropía son: la dinámica conformacional de su estructura, representada en **A** por las diferentes conformaciones que puede adoptar una proteína en solución (estructura de la subunidad ALG13 de la UDP N-acetilglucosamina transferasa resueltas por resonancia magnética nuclear; PDB: 2KS6) y los cambios en los grados de libertad del solvente ilustrados en **B** por la modificación de la capa de solvatación (moléculas de agua en esferas rojas) de la proteína de unión a lisina, arginina y ornitina LAO al reconocer su ligando y cambiar su conformación de abierta a cerrada (PDB: LAO sin ligando, 2LAO; LAO con histidina, 1LAG).

c) Capacidad calorífica (C_P ; o su cambio, ΔC_P [=] kcal mol⁻¹ K⁻¹).

La capacidad calorífica, a presión constante, se define como la energía que tiene que suministrarse a un sistema para aumentar su temperatura. La naturaleza de las interacciones y enlaces que componen al sistema son las que determinan este valor (Engel *et al.*, 2013). Las interacciones térmicamente perturbables, es decir, que pueden absorber energía y traducirla en un aumento en su vibración, son las principales responsables del C_P . Cuando una proteína se despliega, los residuos hidrofóbicos son solvatados, y se genera una red de puentes de hidrógeno, que son térmicamente perturbables, alrededor de estos. En consecuencia, el C_P de la proteína desplegada es siempre mayor que la proteína plegada, y la diferencia es siempre positiva ($\Delta C_P > 0$). La capacidad calorífica también depende de los residuos polares que se exponen al solvente, ya que también forman interacciones con éste y pueden aumentar o disminuir el valor de ΔC_P (Cooper, 2000).

Adicionalmente, el ΔC_P define la dependencia con la temperatura del ΔH y ΔS :

$$\Delta C_P = \frac{\partial \Delta H}{\partial T} = \frac{T \partial S}{\partial T} \quad (1)$$

d) Energía libre de Gibbs (ΔG [=] kcal mol⁻¹).

La energía libre de Gibbs es la energía disponible en el sistema para hacer trabajo no expansivo (eléctrico, mecánico, etc.) a temperatura y presión constantes (Engel *et al.*, 2013). Esta función de estado es una combinación de las dos primeras funciones de estado descritas en este apartado y está relacionada con la constante de equilibrio (K) de cualquier proceso por:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K \quad (2)$$

A nivel molecular, este parámetro refleja la oposición de dos fuerzas fundamentales: la tendencia a llegar al nivel de menor energía (ΔH) y la propensión natural al desorden debido a la perturbación térmica (ΔS). Además define la condición de espontaneidad de cualquier proceso reversible (Engel *et al.*, 2013):

$\Delta G < 0$, el proceso es espontáneo

$\Delta G > 0$, el proceso no es espontáneo

El plegamiento de proteínas desde el punto de vista termodinámico.

La hipótesis termodinámica del plegamiento de las proteínas (Anfinsen, 1973), dicta que el estado nativo es un mínimo de energía, un estado al que todas las cadenas polipeptídicas con una misma secuencia llegan al equilibrio. Esta declaración implica que solo la secuencia de aminoácidos y las condiciones del medio son los factores que influyen en el plegamiento. Además, sugiere que no importa si el heteropolímero es sintetizado por el ribosoma en presencia de proteínas que coadyuvan al plegamiento (chaperonas) o es replegado *in vitro*. A partir de este

momento se validó el estudio del plegamiento de proteínas y proveyó de un marco teórico que se ha ido expandiendo desde ese momento hasta nuestros días (Dill *et al.*, 2012, Fersht, 2008).

Aunque todas las interacciones en una proteína son indispensables para explicar completamente la termodinámica de su plegamiento (figura 4), existen fuerzas dominantes en este proceso. Los puentes salinos son las interacciones que se presentan en menor número y algunas proteínas pueden adoptar su estructura nativa en su ausencia (Kurnik *et al.*, 2012). Los puentes de hidrógeno son los principales responsables de mantener la estructura secundaria (hélices α y hebras β ; Pauling *et al.*, 1951); sin embargo, estas estructuras aisladas no son estables en solución. Aunque se ha observado que existe una composición aminoacídica preferencial entre cada estructura secundaria (Creamer *et al.*, 1994), existen secuencias en las cuales esta conformación depende de su contexto en la estructura terciaria. Finalmente, existe evidencia de que las interacciones hidrofóbicas juegan un rol fundamental en el plegamiento. La mayoría de las proteínas globulares presentan un núcleo hidrofóbico. Se ha observado que la estructura secundaria se estabiliza por la compactación de la estructura terciaria, consecuencia del colapso hidrofóbico. Otra evidencia es que agentes que modifican la estructura del agua (solventes orgánicos o compuestos polares) que aumentan la solubilidad de los residuos hidrofóbicos desnaturalizan a las proteínas (Dill, 1990).

El estudio de plegamiento de proteínas *in vitro* se lleva a cabo mediante experimentos de desnaturalización y renaturalización utilizando temperatura o agentes químicos caotrópicos. La primera condición necesaria es que este proceso sea reversible (Creighton, 1996). Comúnmente, las proteínas monoméricas y pequeñas, como la lisozima, cumplen esta condición (Dobson *et al.*, 1994), mientras que las que son oligoméricas (por ejemplo la triosafosfato isomerasa; Tellez *et al.*, 2008), o de gran peso molecular (Ramshini *et al.*, 2011) se agregan o son parcialmente reversibles.

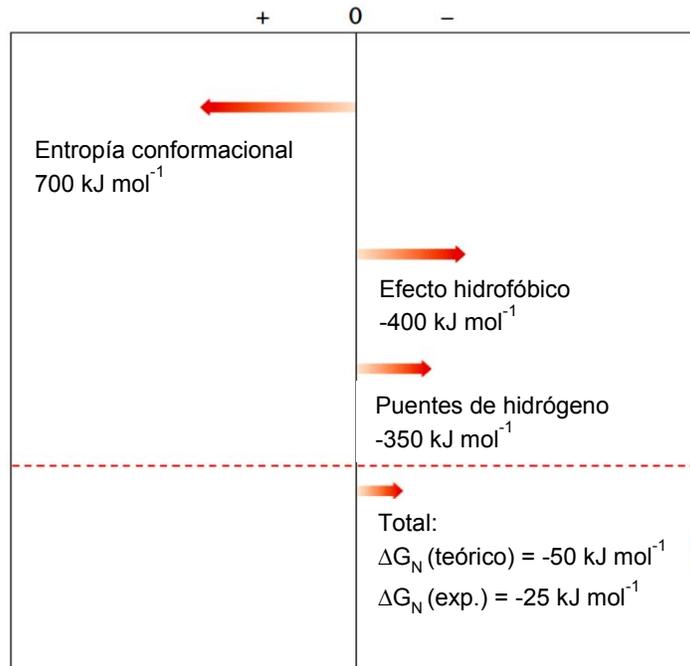


Figura 4. Estimación de las diferentes fuerzas que contribuyen, de forma favorable o desfavorable, al plegamiento de la ribonucleasa Sa. La entropía conformacional es una fuerza desfavorable de gran magnitud positiva. El efecto hidrofóbico es una fuerza de origen entrópico que favorece el plegamiento junto con la formación de puentes de hidrógeno entre todos los grupos funcionales de la proteína. La suma aritmética de estas fuerzas da como resultado la energía libre de Gibbs de plegamiento (ΔG_N). Se incluye el valor experimental (exp.) de estabilidad como comparación (modificado de Pace, 2011).

La temperatura afecta a las proteínas aumentando la energía cinética de la cadena polipeptídica completa y rompiendo las interacciones no covalentes que mantienen el estado nativo (Privalov, 2007). En conjunto, ambos factores aumentan la entropía y favorecen al estado desplegado. El análisis de estos ensayos se lleva a cabo mediante las ecuaciones de van't Hoff y de Gibbs-Helmholtz (descritas en métodos); de éstos resalta que cuando existe una diferencia de capacidad calorífica entre el estado desplegado y nativo (ΔC_{PD}) entonces la curva de estabilidad (construida a partir de la ecuación de Gibbs-Helmholtz) muestra un máximo de estabilidad y dos regiones donde el estado desplegado es favorable, una a alta temperatura y otra a baja temperatura (figura 5; LiCata *et al.*, 2011). Esta curva puede ser construida con los datos de T_m , ΔH_D y ΔC_{PD} obtenidos de experimento de desplegamiento térmico.

El parámetro más usado para describir y comparar la estabilidad térmica de las proteínas es la T_m , la temperatura donde la mitad de las moléculas de proteína están desplegadas (solo si durante el proceso de desnaturalización no se observan estados intermedios estables), aunque el mejor descriptor es el ΔG de desplegamiento (ΔG_D) a cada temperatura (LiCata *et al.*, 2011).

Los agentes caotrópicos también son empleados para desplegar proteínas. La urea y el cloruro de guanidinio (GdnHCl) aumentan la solubilidad de las cadenas hidrofóbicas de las proteínas, además de interactuar favorablemente con ellas y con la cadena principal. De los experimentos usando estos agentes químicos puede obtenerse el ΔG_D a la temperatura de interés, además del parámetro m , que está relacionado con la proporción de área accesible al solvente (ASA, en inglés) de la proteína que se expone al perder estructura (Myers *et al.*, 1995).

La concordancia de los ΔG_D provenientes de ambas aproximaciones es una prueba cotidiana de que el proceso de desplegamiento se encuentra al equilibrio (LiCata *et al.*, 2011). El equilibrio y la reversibilidad son condiciones necesarias para el tratamiento termodinámico del plegamiento. El ejemplo más sencillo es un proceso de dos estados, donde los únicos estados observables son el nativo y el desnaturalizado. En caso de existir una diferencia entre ambas técnicas deben considerarse modelos más complejos, presencia de estados intermedios o disociación de oligómeros (Ferguson *et al.*, 1999; Ropson *et al.* 2008).

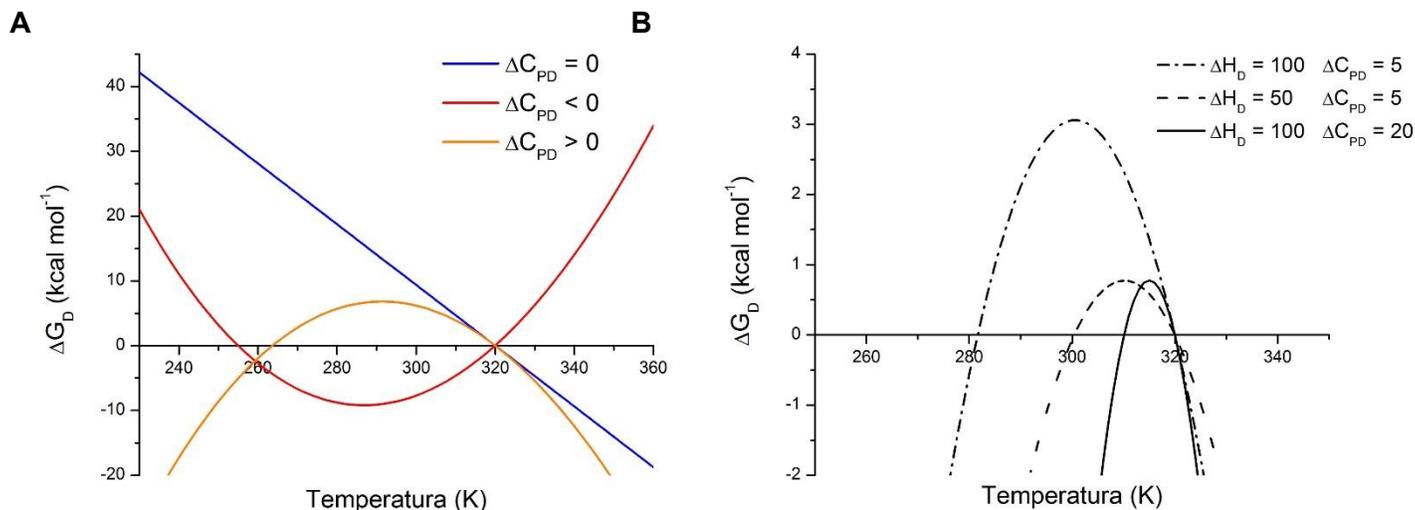


Figura 5. La dependencia del ΔG_D con respecto a la temperatura es una función del ΔC_{PD} y del ΔH_D de acuerdo con la ecuación de Gibbs-Helmholtz. En **A** se muestra el efecto del signo del ΔC_{PD} sobre la curva. La dependencia del ΔG_D es lineal solo si el ΔC_{PD} es cero, observándose únicamente una T_m . Cuando el ΔC_{PD} es menor a 0, la dependencia no es lineal y dos T_m delimitan un intervalo de temperatura (entre 255 y 320 K) donde teóricamente el desplegamiento es favorable. Si el ΔC_{PD} es mayor a 0, en la región entre 264 y 320 K el plegamiento es favorable; a temperaturas menores o mayores se la proteína se despliega. En **B** se muestra el efecto de la magnitud del ΔH_D o el ΔC_{PD} sobre la forma de la curva de estabilidad: el ΔH_D afecta principalmente la altura de la curva, mientras el ΔC_{PD} es responsable de su curvatura. Todas las curvas comparten una T_m (320 K) para facilitar la comparación.

Estudios de unión de ligandos a una proteína.

Una de las funciones más comunes que existen en las proteínas (y en la que este trabajo se enfoca) es el reconocimiento específico y la asociación con alta afinidad por parte una proteína a un ligando, que puede ser desde un ion hasta otra proteína. La selectividad y la afinidad son dos importantes conceptos descriptores de la unión proteína-ligando. La primera se define como la capacidad de reconocer e interactuar con un ligando (o un conjunto de ellos) con características geométricas y electrostáticas específicas y exclusivas. La afinidad describe que tan fuerte y favorable es esta interacción selectiva (Wyman *et al.*, 1990).

Este fenómeno, mejor conocido como reconocimiento molecular, ha sido estudiado desde los experimentos de unión de oxígeno a la hemoglobina hasta la asociación

de oligómeros de gran tamaño y fibras amiloides (Nelson & Cox, 2008). Su estudio tiene implicaciones desde entender la regulación génica, cómo y qué tan fuerte las proteínas reguladoras reconocen a otras y a las hebras de ácido desoxirribonucleico (ADN), hasta el diseño de proteínas, en donde se requiere el conocimiento de las bases moleculares que determinan la selectividad y la afinidad para crear nuevas proteínas que reconozcan ligandos de importancia médica o industrial (Whiteside & Krishnamurthy, 2005).

Para describir los mecanismos de unión encontrados en la naturaleza se han propuesto tres modelos basados en el grado de rearrreglo conformacional que ocurre durante el reconocimiento. En el primer caso no existe tal cambio, esto es una asociación de cuerpo rígido, conocido como modelo de “llave-cerradura”. El segundo, que propone que existe un cambio conformacional al formarse el complejo que optimiza las interacciones proteína-ligando, llamado “ajuste inducido”. El último es el modelo de “selección conformacional”, que se basa en que el receptor se encuentra en equilibrio entre varios conformeros, uno de ellos de alta afinidad, que es favorecido al unirse el ligando (Wyman *et al.*, 1990).

Desde el punto de vista fisicoquímico, el reconocimiento molecular comparte el mismo marco teórico que el plegamiento de proteínas. La determinación de los parámetros termodinámicos de unión (también conocidos como la firma termodinámica de unión) brinda información importante sobre las fuerzas que permiten y favorecen la unión. Uno puede también interpretar esta firma con base en un modelo microscópico, más aún si se cuenta con estructuras tridimensionales resueltas para el receptor solo y en el complejo (Pulido *et al.*, 2014).

Un obstáculo en esta interpretación es que estas estructuras no representan totalmente el fenómeno de unión, ya que la información dinámica, rearrreglos de interacciones internas de la proteína, el cambio en la capa de solvatación, intercambio de protones o iones no son observables (Cooper, 1999). Además el paisaje conformacional de la proteína es determinante en el mecanismo, y por lo tanto en la termodinámica, de la unión (Boehr *et al.*, 2009). Como consecuencia, los valores de entalpía y entropía de unión (ΔH_L y ΔS_L , respectivamente) que no

correlacionan con el número de interacciones presentes en la estructura del complejo. La energía libre de Gibbs de unión (ΔG_L) es relativamente constante en condiciones ambientales debido a una compensación entálpica-entrópica.

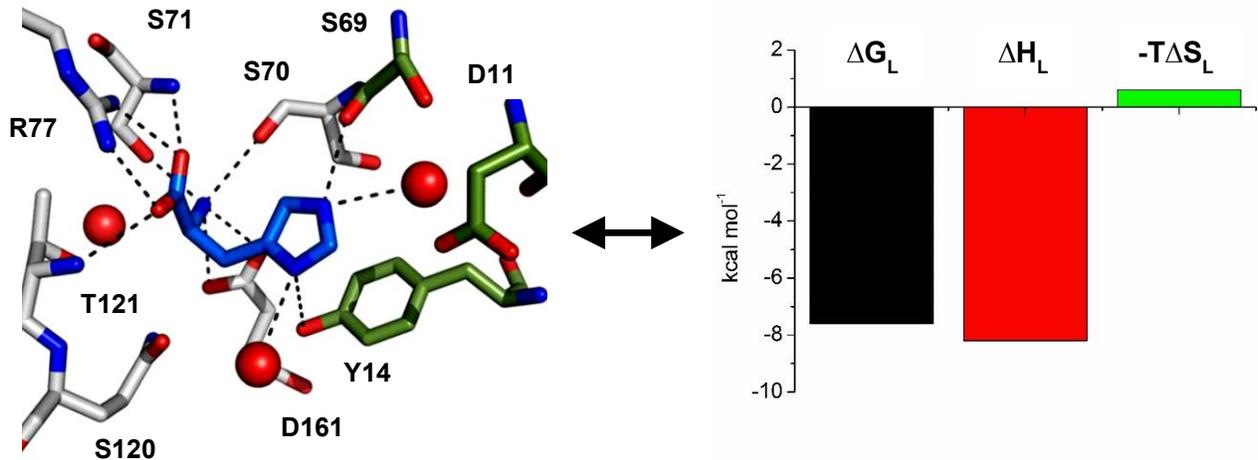


Figura 6. A la izquierda se muestra el sitio de unión de la proteína LAO en complejo con histidina (cadena lateral en azul; a partir de este momento se obviará el prefijo L-). Los residuos en verde interactúan con el anillo cargado positivamente; los residuos en blanco forman contactos con el amino y el carboxilo del ligando. Las esferas rojas representan moléculas de agua. La firma termodinámica de esta unión obtenida por calorimetría de titulación isotérmica (ITC) se presenta a la derecha. Existe un costo energético por la protonación de la histidina que no es evidente en la estructura cristalográfica del complejo pero se hizo evidente en la entalpía de unión (figura y datos tomados de Pulido *et al.*, 2014).

Acoplamiento entre el plegamiento, la estabilidad y la unión.

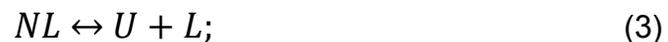
Desde el descubrimiento de las proteínas intrínsecamente desordenadas, quedó claro que el plegamiento y la unión son procesos conectados, donde uno puede facilitar o favorecer al otro. Al ser el estado nativo y funcional de estas proteínas carente de estructura definida, éstas tienen la ventaja de unir una gran cantidad de ligandos adoptando conformaciones específicas para cada uno, ganando selectividad y compensando la común baja afinidad del estado nativo (Shoemaker *et al.*, 2000; Dyson *et al.*, 2002).

En las proteínas globulares también se observa un acoplamiento entre el reconocimiento y el plegamiento. Mediante dinámicas moleculares se observó que la asociación entre monómeros de proteínas diméricas es más rápida si las

subunidades se encuentran parcialmente desplegadas (Levy *et al.*, 2003). Por otra parte, la presencia de ligando en el desplegamiento mecánico de la proteína de unión a maltosa afecta la proporción de moléculas que toman una de dos vías posibles: una directa y otra mediante un intermediario parcialmente desnaturalizado (Aggarwal *et al.*, 2011).

Con respecto al efecto de la unión en la estabilidad de una proteína, técnicamente es posible determinarlo mediante experimentos de desnaturalización térmica en presencia de su ligando, en donde la T_m debería aumentar o disminuir debido a una estabilización o desestabilización, respectivamente, al formarse el complejo proteína-ligando. Sin embargo, al realizar un experimento de este estilo, la T_m siempre aumenta proporcionalmente con la concentración de ligando (figura 7), sin que se llegue a observar un máximo y aunque todos los sitios de unión estén ya ocupados. Por lo tanto, interpretar un aumento en la T_m como un efecto positivo en la estabilidad de la proteína dado algún cambio conformacional al constituirse el complejo no es una inferencia exacta. Estas observaciones fueron reportadas por primera vez por el grupo de Julian Sturtevant en 1983 (Fukada *et al.*, 1983).

La causa de este fenómeno aparentemente contra intuitivo se basa en que a altas concentraciones de ligando se tiene el siguiente equilibrio:



en donde el desplegamiento del complejo NL conlleva una liberación del ligando L dado que en el estado desplegado U el sitio de unión no está formado. Si uno continúa aumentando la concentración de L, se favorece cada vez más la formación de la especie NL, dado que ambas especies se encuentran en equilibrio. Por lo tanto, al aumentar la concentración de ligando se necesita mayor energía (en este caso mayor temperatura) para desplegar NL, independientemente de la estabilidad intrínseca del complejo (Fukada *et al.*, 1983).

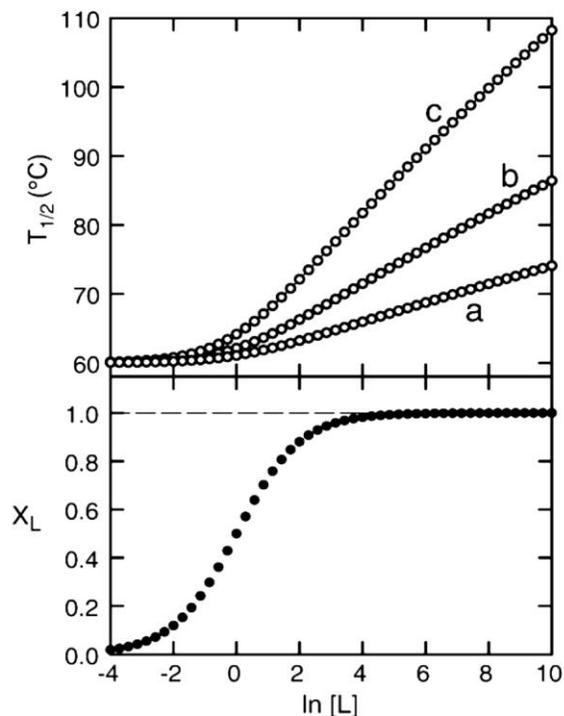


Figura 7. Dependencia de la T_m ($T_{1/2}$ en esta gráfica) con respecto al logaritmo de la concentración de ligando ($\ln [L]$) calculada asumiendo un modelo de desplegamiento de dos estados como se muestra en el texto (panel superior). En el panel inferior se muestra la fracción de complejo (X_L) en función del logaritmo de la concentración de ligando. Nótese que la T_m sigue aumentando aunque la proteína se encuentre totalmente saturada. Las tres curvas del panel superior (a, b y c) representan diferentes valores de ΔH_D (tomado de Sanchez-Ruiz, 2007).

Se ha descrito un método para determinar la entalpía de desplegamiento del complejo proteína-ligando (ΔH_{NL}) mediante el análisis de experimentos de desnaturalización térmica en presencia de varias concentraciones saturantes de ligando, utilizando la ecuación de van't Hoff y la relación entre las constantes de equilibrio de unión, desplegamiento de la proteína sin ligando y en complejo con éste (revisado en Sanchez-Ruiz, 2007). Este análisis ha sido aplicado en el estudio del efecto de la unión cooperativa de uno de los dos sustratos de la fenilalanina hidroxilasa humana en su estabilidad térmica (Thórólfsson *et al.*, 2002) y se describe en la sección de métodos.

Proteínas de unión a ligandos.

Las proteínas de unión a ligandos (PUL) son una superfamilia de proteínas que median el reconocimiento de gran variedad de moléculas, desde iones metálicos hasta oligopéptidos. Esta superfamilia se encuentra en todos los dominios de la vida, y está asociada principalmente, aunque no exclusivamente, a complejos de membrana como transportadores ABC (del inglés ATP binding cassette, proteínas de membrana que se encargan de transportar diferentes moléculas a través de la membrana bacteriana empleando ATP como fuente de energía), sistemas regulatorios de dos componentes y canales iónicos mediados por ligandos (figura 8; Berntsson *et al.*, 2010).

Una característica importante de esta superfamilia es que comparten la misma organización estructural, aunque varíen en tamaño (25 a 70 kDa) y en selectividad. Presentan dos dominios (comúnmente llamados lóbulos) unidos por una región bisagra. (Fukami-Kobayashi *et al.*, 1999). El sitio de unión de todas estas proteínas se encuentra entre estos dos lóbulos y al reconocer su ligando la proteína cambia a una conformación cerrada en donde los dos dominios se compactan y el ligando queda enterrado en la interface (figura 3; Felder *et al.*, 1999). Existen tres clases diferentes de PUL, de acuerdo a la estructura secundaria de su bisagra: dos asas, tres asas o una hélice α (figura 8; Berntsson *et al.*, 2010).

En los procariontes, las proteínas de unión existen como proteínas solubles aisladas en el espacio periplásmico en bacterias gram negativas. En su secuencia se incluye un péptido señal de translocación que es reconocido y proteolisado al pasar del citoplasma al periplasma. En bacterias gram positivas se encuentran ancladas a la membrana celular por un ácido graso unido covalentemente a la región N-terminal de la proteína (Felder *et al.*, 1999).

Los estudios que se han llevado a cabo en este tipo de proteínas se pueden dividir en dos grupos: estudios de plegamiento y estudios de unión. Con respecto a los primeros, se han estudiado a las proteínas de unión a D-maltosa, D-ribosa, leucina/isoleucina/valina e histidina mediante técnicas espectroscópicas y

calorimétricas (Ganesh *et al.*, 1997, Prajapati *et al.*, 2007, Kreimer *et al.*, 2000, respectivamente). Con excepción de la proteína de unión a histidina, todos los reportes concuerdan en que las proteínas de esta familia se despliegan reversiblemente siguiendo un modelo de dos estados al equilibrio, sin que se haya observado la presencia de intermediarios, usando como perturbador temperatura o agentes químicos. Se han considerado a las PUL modelos interesantes para estudiar el plegamiento debido a su alta reversibilidad y estabilidad, a pesar de ser más grandes que otras proteínas modelo usadas y con una topología más compleja (Ganesh *et al.*, 1997).

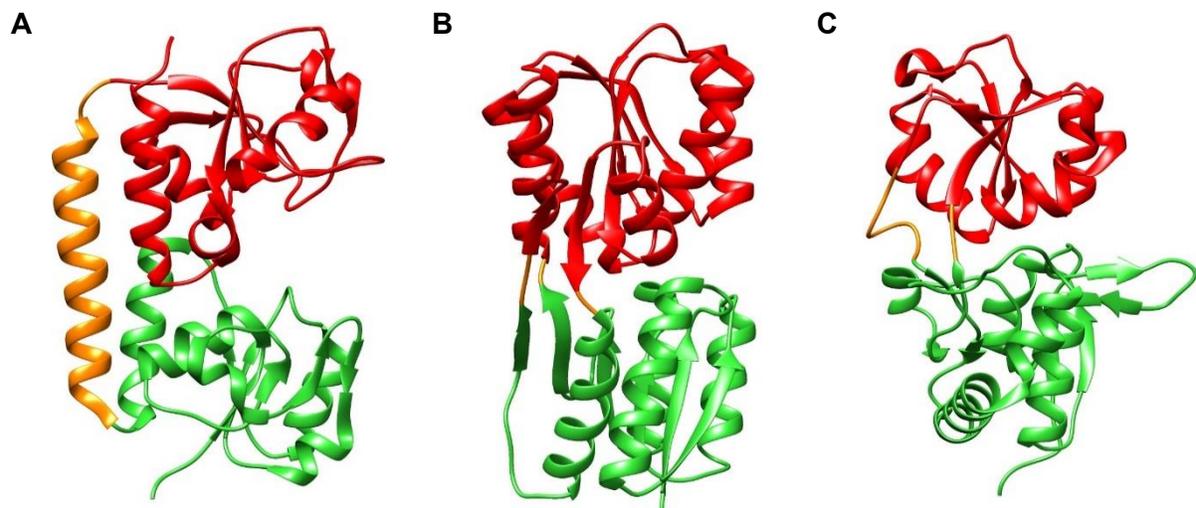


Figura 8. Ejemplos representativos de las tres clases de PUL conocidas. En naranja se señala la bisagra, y los dos lóbulos en verde y rojo. En **A** se muestra la proteína de unión a la vitamina B12 (BtuF, PDB: 1N2Z) que tiene una hélice α como bisagra. En **B** se encuentra la bisagra de la proteína de unión a ribosa (RBP, PDB: 1DRJ) que se compone de tres asas. La proteína de unión a histidina (HisJ, PDB: 1HSL) tiene una bisagra compuesta por dos asas, como se observa en **C**.

Además de los estudios de plegamiento, otro aspecto de interés en estas proteínas es su función: la alta afinidad y la variada selectividad que las caracteriza como proteínas de unión. Los grandes esfuerzos por explicar estas observaciones han llevado a la generación de una gran cantidad de información proveniente de muchas técnicas diferentes: resonancia magnética nuclear (RMN; Chu *et al.*, 2013), cinética de flujo detenido (Miller *et al.*, 1983), cristalografía de rayos X (Oh *et al.*, 1993), resonancia paramagnética (Hall *et al.*, 1997), mutagénesis dirigida (Vahedi-Faridi *et*

al., 2008), calorimetría de titulación isotérmica y calorimetría diferencial de barrido (Prajapati *et al.*, 2007, Pulido *et al.*, 2014), y dinámica molecular (Chu *et al.*, 2014). Las conclusiones de estos trabajos son: tanto el modelo de ajuste inducido como el de selección conformacional están presentes en las PUL; cinéticamente la formación del complejo está limitada por difusión y en algunos casos existe una conformación diferente en la misma proteína para cada uno de sus ligandos. Por último, proteínas que unen la misma molécula pueden presentar diferentes firmas termodinámicas de unión, sin una causa estructural aparente.

La proteína LAO.

Como antecedente directo, en el laboratorio donde se realizó esta tesis se estudió el plegamiento y los parámetros termodinámicos de unión de la proteína LAO, de *Salmonella typhimurium*. Esta proteína se localiza en el periplasma y se encarga del transporte de lisina, arginina, ornitina e histidina del medio extracelular al citoplasma, presentando estas moléculas a un transportador ABC. Su bisagra está compuesta por dos asas, que conectan los dos lóbulos característicos de las PULs (figura 8). La proteína madura se compone de 238 residuos, con un peso de 26.0 kDa y un punto isoeléctrico (pI) de 5.10 (en concordancia con Oh *et al.*, 1993).

En los estudios de estabilidad y plegamiento se ha encontrado que un modelo de dos estados reversible explica el desplegamiento al equilibrio por temperatura y urea. Sin embargo, experimentos cinéticos de desplegamiento por urea han sugerido la presencia de un estado intermediario inestable entre el estado nativo y el desplegado (Vergara, 2011).

Los estudios de unión, utilizando arginina e histidina, revelan que este es un proceso favorecido entálpicamente para ambos ligandos, es decir, es un proceso exotérmico ($\Delta H_L < 0$). Además, se determinó que en el sitio de unión estos aminoácidos están protonados e interactúan con varias moléculas de agua. El ΔC_{PL} es menor a cero en ambos casos, y concuerda con el ASA que se oculta al compactarse los lóbulos sobre el ligando, sin la presencia de cambios conformacionales o en la dinámica de la proteína adicionales (Pulido *et al.*, 2014).

Siguiendo con esta línea de investigación, en el presente trabajo se estudiaron dos PUL homólogas a LAO, proteínas de organismos diferentes que comparten la misma estructura, la misma función y tienen un origen evolutivo común. A continuación se describen estas dos proteínas.

Modelos de estudio.

ArtJ.

ArtJ es una proteína anclada a la membrana por un ácido graso perteneciente a *Bacillus stearothermophilus* (un organismo termófilo, con una temperatura óptima de crecimiento de 65 °C), con selectividad y alta afinidad a aminoácidos básicos, principalmente arginina, histidina y lisina. Su nombre proviene de su alta afinidad a arginina, su papel en el transporte de ésta y el orden del gen en el operon. Esta proteína comparte la misma estructura que LAO, con una desviación del valor cuadrático medio (RMSD, en inglés) entre sus cadenas principales de 0.9 Å (figura 10); sin embargo, en secuencia solo poseen un 30% de identidad (figura 9). La proteína completa, excluyendo una larga asa en la región N-terminal que sólo está implicada en el anclaje a la membrana, consta de 234 residuos y pesa 26.0 kDa, con un pI de 7.70 (Vahedi-Faridi *et al.*, 2008).

La caracterización de esta proteína se ha limitado a la determinación de su estructura con varios ligandos por cristalografía de rayos X, determinación de su afinidad por ensayos de diálisis al equilibrio y mutagénesis dirigida para identificar residuos clave en la interacción con su transportador (Vahedi-Faridi *et al.*, 2008). No se han encontrado reportes sobre una caracterización termodinámica de su estabilidad o su unión.

El interés de ArtJ se basa en su origen termófilo, ya que definir las bases fisicoquímicas o estructurales que le permiten mantener su topología y su función, similar a LAO, a una mayor temperatura que su contraparte mesófila puede expandir el conocimiento que se tiene acerca de las diversas estrategias que pueden utilizar las proteínas para reconocer sus ligandos con alta afinidad en diferentes ambientes.

HisJ.

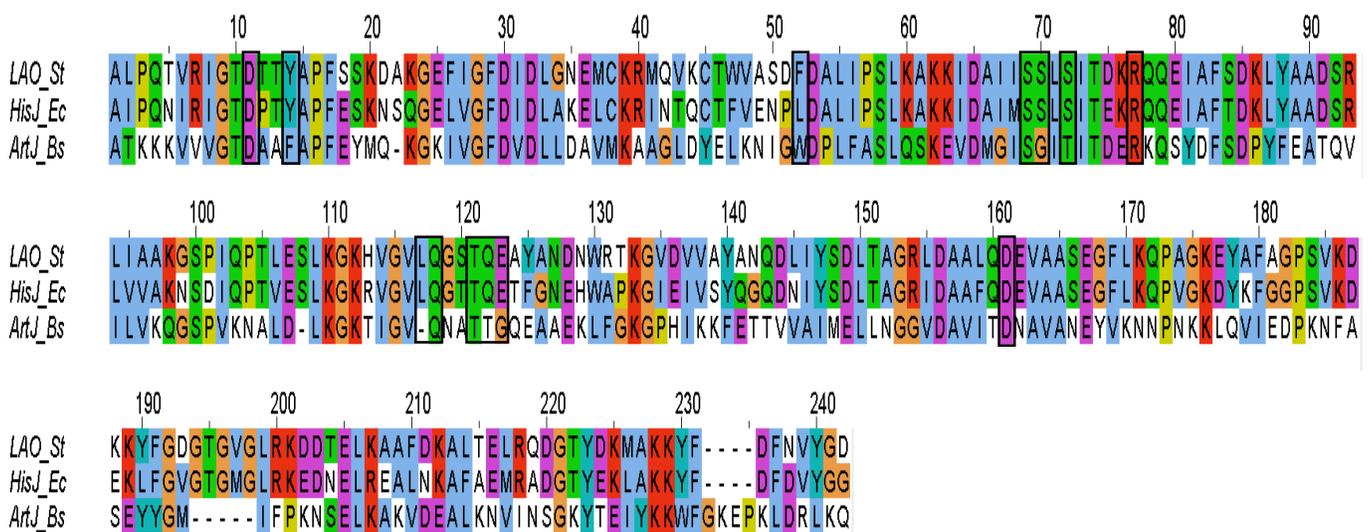
Contrario a ArtJ, HisJ es una proteína periplásmica de *Escherichia coli* (aunque también presente en *S. typhimurium*) con alta afinidad a histidina (de ahí su nombre) y menor para otros aminoácidos básicos, con una identidad de secuencia del 70% con LAO (figura 9). Estructuralmente mantiene la misma topología que LAO y ArtJ (RMSD de 1.2 Å con respecto a LAO; figura 10), sin embargo solo se ha podido cristalizar en presencia de histidina (Oh *et al.*, 1994).

En cuanto a su plegamiento, Kreimer *et al.* reporta que su desplegamiento térmico es reversible y sigue un mecanismo de tres estados al equilibrio, convirtiéndola en la única PUL reportada con este tipo de mecanismo. Sin embargo, en este mismo estudio no se analizaron los datos de acuerdo a un modelo de dos estados, sino que se asume *a priori* que cada lóbulo se despliega de manera independiente (Kreimer *et al.*, 2000).

En la caracterización de su función, en el reporte antes mencionado se realizaron experimentos de fluorescencia en presencia de diferentes ligandos, con los cuales concluyeron que cada complejo es diferente entre sí y a la conformación abierta. En otro estudio de RMN (Chu *et al.*, 2013) observaron que al unir histidina la proteína sufre cambios significativos en su dinámica conformacional. Diferencias entre complejos con distinto ligando también se han confirmado por espectroscopia de absorbancia (Wolf *et al.*, 1996), entrecruzamiento con el transportador (Ames *et al.*, 1996) y reconocimiento con anticuerpos específicos para la conformación cerrada (Wolf *et al.*, 1994). Esta información no se puede explicar mediante las estructuras tridimensionales resueltas hasta el momento, ya que todas las conformaciones cerradas parecen ser similares.

Por lo tanto, el estudio fisicoquímico de la estabilidad y la unión de HisJ permitirá develar estas incongruencias entre la información estructural y la unión, además de determinar si el desplegamiento de esta proteína sigue o no un modelo de tres estados.

La arquitectura y los residuos que componen el sitio de unión de LAO, HisJ y ArtJ se conservan entre las tres (figura 9 y 11, tabla 1). Las interacciones proteína-ligando se pueden dividir en las que se localizan en la cadena lateral del aminoácido unido (residuos 1 a 5, figura 11, tabla 1) y las que se forman con los grupos amino y carboxilo del carbono alfa del ligando (residuos 6 a 11, figura 11, tabla 1). La carga positiva de la cadena lateral interacciona con un residuo aspártico conservado, mientras que el resto se encuentra rodeada por dos aminoácidos aromáticos, mediante una interacción catión-pi (residuos 9, 8 y 10 respectivamente, figura 11). El grupo amino del ligando interactúa con un residuo aspártico, y un residuo de arginina tiene contacto con el grupo carboxilo del ligando (residuos 1 y 4 respectivamente, figura 11). Existen varias moléculas de agua fijas en el sitio de unión que median interacciones de largo alcance entre la cadena lateral del ligando y otros residuos (esferas rojas en la figura 11).



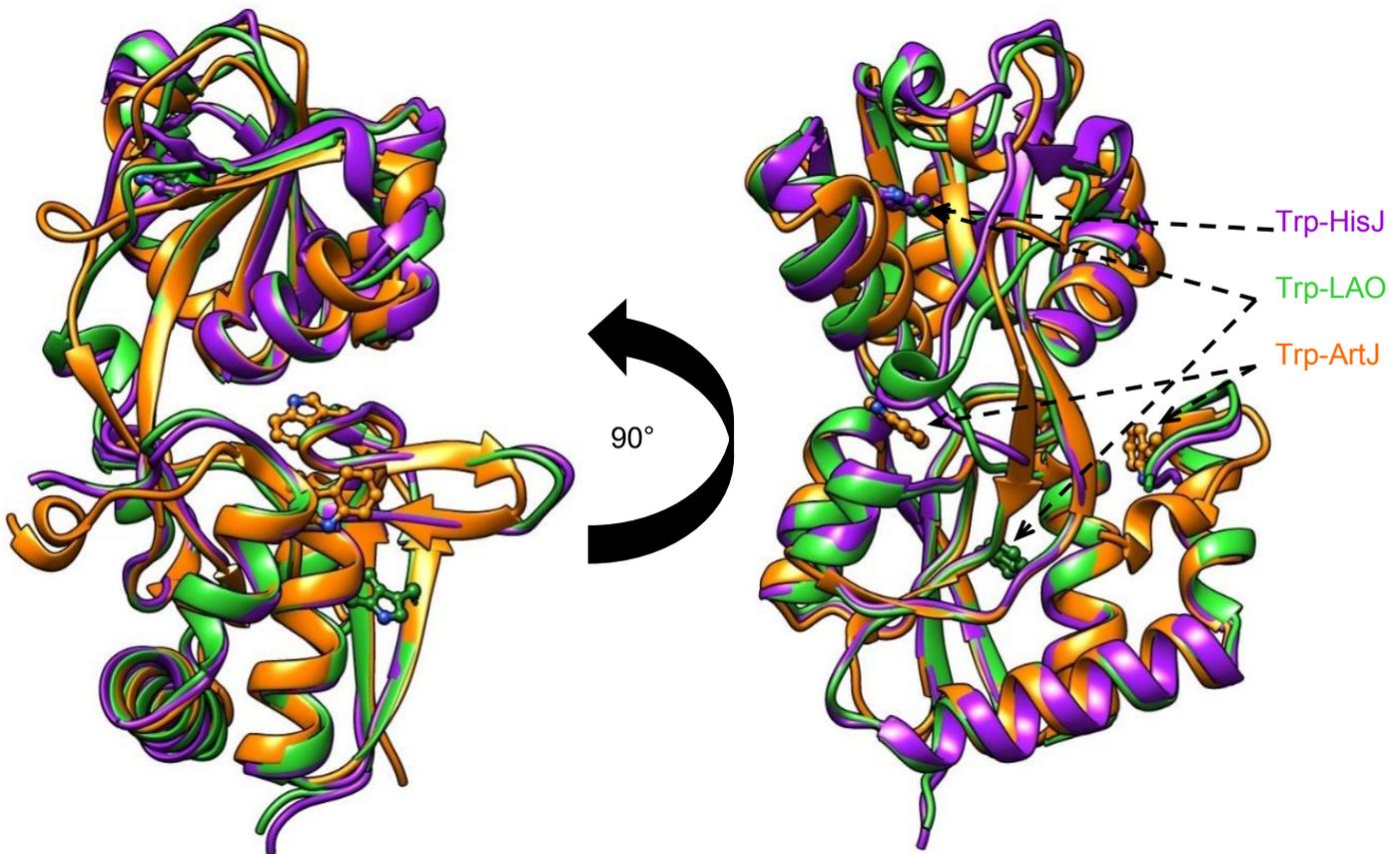


Figura 10. Comparación estructural de ArtJ (naranja), HisJ (morado) y LAO (verde). Nótese que las topologías son muy similares (RMSD promedio de 1.10 Å con respecto a LAO). El porcentaje general de estructura secundaria entre las tres proteínas es semejante, pero LAO posee mayor contenido de hélices α y menor de hebras β en comparación a las otras dos (tabla 2 en Resultados). El sitio de unión se encuentra en la interfase de los dos lóbulos. Aunque son proteínas homólogas, las posiciones de sus residuos de triptófano varían entre ellas. LAO tiene dos triptófanos: el triptófano 57 en el dominio inferior y el triptófano 130 en el dominio superior. HisJ solo posee uno en la posición 130 en el dominio superior. ArtJ contiene dos residuos de triptófano en las posiciones 51 y 222 ubicadas en el dominio inferior. La figura se realizó con el programa Chimera (Pettersen *et al.*, 2004). Los códigos PDB de las estructuras son: 2Q2C, ArtJ; 1HSL, HisJ; 1LAG, LAO. Todas las proteínas están en complejo con histidina.

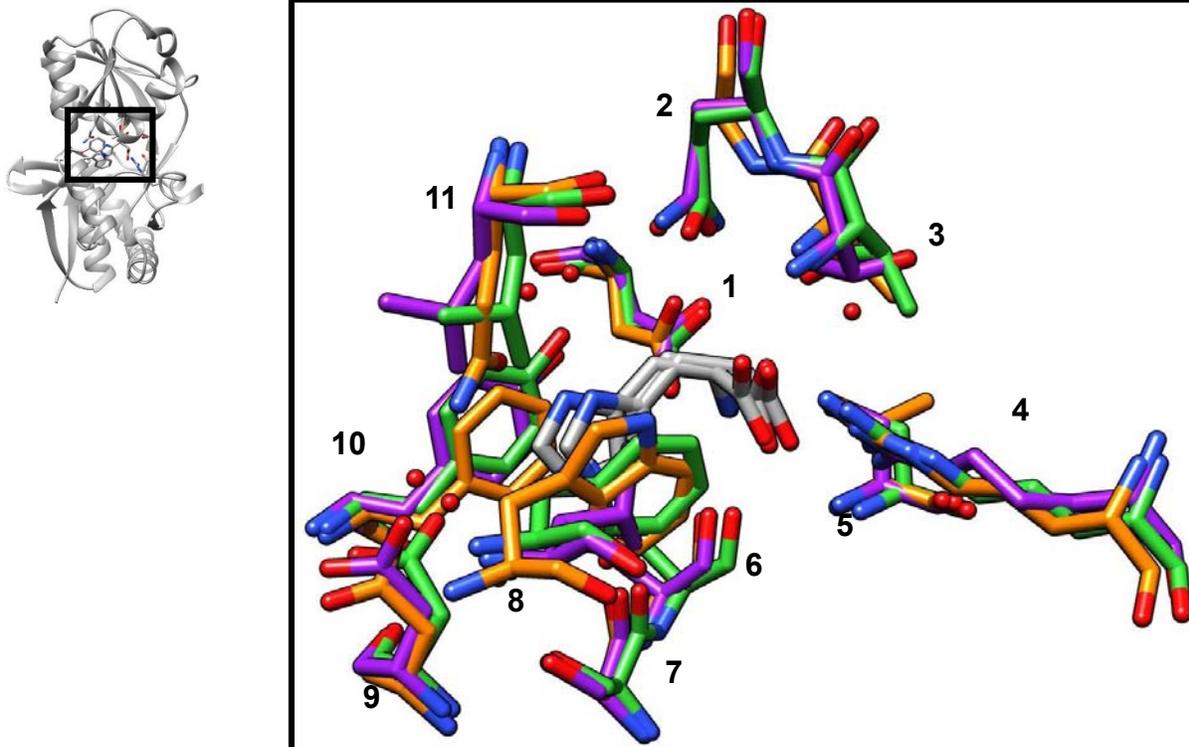


Figura 11. Comparación estructural del sitio de unión de LAO (verde), HisJ (morado) y ArtJ (naranja) en complejo con histidina (gris). Los residuos 1 a 5 forman contactos con los grupos funcionales unidos al carbono alfa del ligando. Los residuos 6 a 11 interaccionan con la cadena lateral de la histidina. En la tabla 1 se enlistan los residuos que componen el sitio de acuerdo a la numeración de esta figura (PDB: ArtJ, 2Q2C; HisJ, 1HSL; LAO, 1LAG).

Tabla 1. Residuos que forman el sitio de unión en LAO, HisJ y ArtJ.

Número ^a	HisJ ^b	ArtJ ^{b, c}	LAO ^b
1	Asp161	Asp158	Asp161
2	Gln122	Gly120	Gln122
3	Thr121	Thr119	Thr121
4	Arg77	Arg76	Arg77
5	Ser72	Thr71	Ser72
6	Ser70	Gly69	Ser70
7	Ser69	Ser68	Ser69
8	Leu52	Trp51	Phe52
9	Asp11	Asp11	Asp11
10	Tyr14	Phe14	Tyr14
11	Leu117	Gln115	Leu117

^a Numeración usada en la figura 10.

^b Se incluye el número de residuo en la secuencia de la proteína madura.

^c Se omite la región N-terminal de anclaje a la membrana de la numeración de la secuencia.

Hipótesis

Aunque HisJ y ArtJ compartan la misma estructura y función, sus secuencias son diferentes y éstas determinan las propiedades fisicoquímicas de la unión y el plegamiento.

Objetivo General

Caracterizar el plegamiento y la función de las proteínas ArtJ e HisJ desde el punto de vista fisicoquímico.

Objetivos Particulares

- Establecer un protocolo de purificación para ambas proteínas.
- Caracterizar por dicroísmo circular y fluorescencia intrínseca ambas proteínas.
- Determinar la afinidad de ambas proteínas por histidina y arginina.
- Caracterizar la desnaturalización térmica de ambas proteínas por técnicas espectroscópicas y calorimetría diferencial de barrido.
- Caracterizar el desplegamiento químico de ambas proteínas usando técnicas espectroscópicas.
- Caracterizar el acoplamiento entre la estabilidad y la unión de ambas proteínas.

Materiales y Métodos.

Materiales.

Todos los reactivos fueron adquiridos de la marca Sigma-Aldrich©, a menos que se especifique lo contrario. Los aminoácidos histidina y arginina se usaron en su forma de ión dipolar (no en complejo como sal) con una pureza $\geq 98\%$. Todas las soluciones se hicieron con agua bidestilada.

Diseño de los genes.

Para la sobreexpresión de HisJ se diseñó su gen tomando en cuenta sólo la secuencia de la proteína madura (UnitProtKB: P0AEU0[23-260]), para evitar su translocación al periplasma. En el caso de ArtJ se consideraron sólo los residuos que se alinean con la secuencia de LAO e HisJ, descartando así el fragmento N-terminal sin estructura que sólo permite el anclaje de la proteína a la membrana y no interactúa con el resto de la estructura tridimensional (UnitProtKB: D0VWX8[19-252]). Ambas secuencias son anteceditas por un codón de metionina para permitir su traducción y están flanqueadas por los sitios de restricción NdeI en el extremo 5' y XhoI en el extremo 3'. Para su sobreexpresión, los genes están subclonados en el vector de expresión pET-22b(+). Este vector contiene un sistema de expresión inducible por isopropil-b-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), ya que incluye el gen *lacI* y la secuencia *lacO*, que inhibe la transcripción en ausencia de inductor, corriente arriba del gen a expresar. Además incluye un gen de resistencia a ampicilina. La síntesis y subclonación de los genes se solicitó a la empresa *GenScript*.

Sobreexpresión y purificación de las proteínas.

La sobreexpresión de ambas proteínas se llevó a cabo en células de *E. coli* BL21 DE3 quimiocompetentes. Colonias aisladas de bacterias, ya transformadas con los vectores de expresión correspondientes y crecidas en cajas de Petri con medio Luria-Bertani (LB) sólido suplementado con ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), se colectaron e incubaron en tubos de 10 mL de medio LB con ampicilina toda la noche a 37°C con agitación a 250 rpm. Estos cultivos se usaron para inocular, con 5.0 mL de

cultivo, matraces con un litro de medio YT2X, que se incubaron a 37°C y 250 rpm hasta llegar a una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de entre 0.8-1.0. Posteriormente, a los cultivos se les agregó 1 mM de IPTG para inducir la sobreexpresión y se continuó la incubación durante cuatro horas a 37°C y 250 rpm. Las bacterias se cosecharon mediante centrifugación a 8000 rpm por 10 minutos, el medio fue descartado, y las bacterias resuspendidas en un amortiguador 10 mM bis-tris propano (BTP) pH 9.0, suplementado con 0.1 mM de inhibidor de proteasas de serina fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, en inglés). La lisis bacteriana se realizó mecánicamente usando una prensa de French. La fracción soluble se recuperó mediante centrifugación a 18000 rpm por 20 min. Para separar las proteínas de interés de los demás restos celulares se sometió al extracto a una precipitación por sulfato de amonio empleando tres porcentajes de saturación: 40%, 60% y 80%. Las proteínas precipitan reversiblemente en sulfato de amonio dependiendo de su solubilidad intrínseca, lo que puede ser aprovechado para separar las proteínas de interés de otros contaminantes antes de pasar a otros métodos más refinados, como la cromatografía. ArtJ e HisJ se localizaron en la fracción soluble al 80% de saturación, que fue dializada exhaustivamente por 48 horas contra un amortiguador 1.0 mM BTP pH 9.0. Posteriormente esa fracción fue concentrada a un volumen igual o menor a 10 mL en 10 mM BTP pH 9.0.

Para purificar las proteínas de interés se empleó cromatografía de intercambio aniónico y catiónico. Como primer paso, las muestras concentradas, previamente filtradas con membranas con poros de 22 μm , se inyectaron a una columna SourceQ o MonoQ, acoplada a un sistema HPLC Waters 600 (Waters©) o FLPC Äkta (General Electric©) respectivamente, anteriormente equilibradas con 10 mM BTP pH 9.0. La elución se llevó a cabo a un flujo de 2.0 mL min^{-1} con un gradiente lineal de 0.0 a 1.0 M de cloruro de sodio (NaCl) en 60 mL. Posteriormente se lavó la columna con 30 mL de 2.0 M NaCl. En el caso de HisJ sólo se observó un pico que eluye a 50 mL de volumen de elución, que después se confirmó que era la proteína deseada. Éste fue colectado y concentrado usando tubos Amicon® de 15 mL con una membrana de 10 kDa de corte (Millipore©) en 10 mM BTP pH 9.0. Para ArtJ se colectó el pico anterior al gradiente y se concentró hasta un volumen de 10 mL en

10 mM ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES) pH 6.0. Esta muestra se inyectó en una columna de carboximetil Sefadex (CM-S) previamente equilibrada con 10 mM MES pH 6.0. La elución se llevó a cabo a un flujo de 2.0 mL min⁻¹ con un gradiente lineal de 0.0 a 1.2 M de NaCl en 60 mL. Posteriormente se lavó la columna con 60 mL de 2.0 M NaCl. El único pico observado eluyó a 115 mL de volumen de elución. Este pico fue colectado y concentrado en 10 mM mM BTP pH 9.0. La pureza de las proteínas fue comprobada por cromatografía de exclusión molecular, usando una columna Superdex 75 (equilibrada con 10 mM BTP 150 mM NaCl pH 9.0) y electroforesis de SDS-PAGE. Las proteínas se mantuvieron a 4°C en 10 mM BTP pH 9.0 para su uso a mediano plazo. Para almacenamiento a largo plazo se guardaron a 4°C con sulfato de amonio al 80% de saturación.

Determinación de la concentración de proteína.

La concentración de proteína se midió por absorbancia a 280 nm utilizando los siguientes coeficientes de absorción (en mg⁻¹ mL cm⁻¹): 0.633 para HisJ y 0.937 para ArtJ (experimental, por el método de Edelhoch, y teórico respectivamente), y por el método colorimétrico del ácido bicinonínico (BCA, en inglés). Ambos métodos dieron valores de concentración similares. Las concentraciones de cada proteína se verificaron antes de cada experimento. En el caso de ArtJ se centrifugaba la muestra a 10000 rpm por 10 minutos antes de cada experimento dado que presentaba una ligera agregación.

Técnicas espectroscópicas.

La medición de los espectros de dicroísmo circular y fluorescencia intrínseca, así como los experimentos de desnaturalización por temperatura y por agentes químicos, se realizaron en un espectropolarímetro Chirascan™ (Applied Photophysics©) acoplado a un sistema Peltier (Quantum Northwest©) para controlar la temperatura y un módulo accesorio de monocromador de escaneo de emisión de fluorescencia.

En todos los experimentos el amortiguador usado fue 10 mM BTP pH 9.0, a menos que se especifique otro amortiguador. Todas las muestras de proteína se

prepararon un día anterior al experimento y se incubaron a 20°C, para dicroísmo circular, o 25°C, para fluorescencia toda la noche. Ésta misma temperatura se fijó en la obtención de los espectros.

Dicroísmo circular.

El dicroísmo circular (DC) es un fenómeno espectroscópico basado en la absorción desigual de luz polarizada circularmente a la izquierda y a la derecha. Esta polarización se logra al pasar un haz de luz sobre prismas o filtros específicos, donde el componente eléctrico del haz oscilará de forma sinusoidal sobre un plano. Este componente se puede visualizar como la suma de dos vectores de la misma magnitud que trazan círculos, uno a la derecha, otro a la izquierda. Estos son los haces circularmente polarizados que se inciden en la muestra. Si el material es ópticamente activo (tiene moléculas quirales o es asimétrico) absorberá de forma diferente a ambos haces, lo que cambiará la magnitud de cada uno de ellos y por lo tanto la suma de estos trazará una elipse. El DC comúnmente se reporta en unidades de grados de elipticidad, que es definida como el ángulo cuya tangente es la relación del eje menor sobre el eje mayor de la elipse, y se normaliza con respecto al paso de luz de la celda y la concentración de proteína ($[\theta] = [\theta] \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$). En las proteínas, los cromóforos son por una parte las amidas del enlace peptídico, que cuando se alinean en estructuras secundarias cambian su actividad óptica, y por otra los residuos aromáticos. Por lo tanto, cada tipo de estructura secundaria tiene su espectro de DC característico, por lo general en el rango de 180 a 260 nm (UV lejano). Las hélices alfa tienen dos mínimos a 222 y 208 nm, las hebras beta tienen un mínimo a 218 nm, mientras proteínas sin estructuras tienen poca elipticidad a longitudes de onda mayores de 210 nm. Dado esto, cada proteína tiene un espectro característico, que depende de su conformación. Además, en la región de 250 a 350 nm (UV cercano), los residuos aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptófano) también presentan dicroísmo circular debido a la asimetría de su ambiente local. Consecuentemente los espectros de DC de UV cercano dependen de la estructura terciaria de la proteína (Greenfield, 2007).

Los espectros de UV lejano (intervalo de 200 a 260 nm) se midieron en una celda de cuarzo con un paso de luz de 1 mm a una concentración de proteína de 0.3 mg mL⁻¹. Para los espectros de UV cercano, 250 a 340 nm, se utilizó una celda de cuarzo con un paso de luz de 5 mm y 0.5 mg mL⁻¹ de concentración de proteína. Se reporta un promedio de 5 mediciones individuales por espectro. La deconvolución de los espectros de UV lejano se realizó con el programa CDNN (Böhm *et al.*, 1992) y se comparó con el contenido de estructura secundaria de la estructura cristalográfica calculado con el programa DSSP (Kabsch *et al.*, 1983).

La desnaturalización térmica de ambas proteínas se siguió el cambio en elipticidad a 212 y 222 nm en función de la temperatura a una velocidad de barrido de 60 K hr⁻¹ en un celda de cuarzo con un paso de luz de 1 mm a una concentración de proteína de 0.300 mg mL⁻¹. Para evaluar la reversibilidad del proceso se enfrió la muestra a la misma velocidad barrido y se continuó registrando el cambio en la señal de elipticidad.

La pérdida de estructura secundaria por agentes caotrópicos se determinó obteniendo espectros en el UV lejano (intervalo de 215 a 260 nm) de cada proteína en función a la concentración de desnaturalizante en una celda de cuarzo con un paso de luz de 1 mm a una concentración de proteína de 0.200 mg mL⁻¹. Se reporta un promedio de 3 mediciones individuales por espectro.

Fluorescencia intrínseca

La fluorescencia es un proceso de emisión de luz dada la excitación previa con un haz de luz con una longitud de onda que siempre es menor a la de la luz emitida. Algunos compuestos, llamados fluoróforos, absorben energía a una determinada longitud de onda, que excita sus electrones, los cuales pasan a un nivel de alta energía. Al liberar esta energía, los electrones regresan a un estado basal, se liberan fotones con una longitud de onda mayor, ya que parte de la energía se perdió en forma de calor. En las proteínas, los fluoróforos intrínsecos más comunes son los residuos aromáticos, cada uno absorbe y emite de forma característica. Un espectro de emisión de una proteína promedio se determina en el intervalo de 300 a 420 nm.

Los residuos de tirosina y triptófano son los principales responsables de la intensidad de fluorescencia. Usando como excitación radiación electromagnética de 280 nm, ambos residuos se excitan y el espectro de emisión resultante contiene información sobre el ambiente y la conformación de los dos tipos de residuos. Con una excitación de 295 nm, el triptófano es el principal responsable del espectro de emisión. La fluorescencia de este residuo es muy sensible al ambiente en el que se encuentra. Si se localiza en el núcleo hidrofóbico de la proteína, la intensidad de fluorescencia es mayor y su máximo se encuentra alrededor de 328 nm. Cuando éste se transfiere, ya sea por desplegamiento o unión de algún ligando, a un ambiente polar, su intensidad disminuye y el máximo se recorre hacia 350 nm. Sin embargo, estos residuos pueden ser apagados (es decir, ver disminuida su intensidad de fluorescencia) por otros cercanos a ellos, principalmente cisteínas o aminoácidos muy polares, y al desnaturizarse la proteína el triptófano se aleja de estos aminoácidos, entonces la intensidad aumentará en lugar de disminuir. Por lo tanto los cambios de fluorescencia dado el reconocimiento o el plegamiento son particulares para cada proteína (Vivian & Callis, 2001).

Los espectros de fluorescencia intrínseca se determinaron a dos longitudes de onda de excitación (λ_{ex}): 280 y 295 nm, con un rango de longitud de onda de emisión (λ_{em}): 310 a 420 nm. Se utilizaron rejillas de 3 mm en todos los ensayos. Las mediciones se realizaron en una celda de cuarzo con un paso de luz de 10 mm a una concentración de proteína de 25 μM (0.659 mg mL^{-1} para HisJ, 0.651 mg mL^{-1} para ArtJ). Se reporta un promedio de 3 mediciones individuales por espectro. En todos los experimentos el voltaje del fotomultiplicador se fijó a 750 mV.

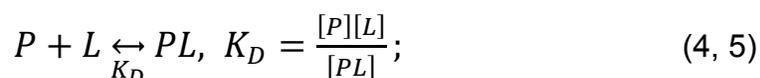
En la desnaturalización térmica de HisJ, en ausencia o presencia de ligando, se siguió el cambio en la señal de fluorescencia a 325 nm, excitando a 280 y 295 nm con pulsos intercalados, en función de la temperatura a una velocidad de 60 K hr^{-1} en un celda de cuarzo con un paso de luz de 5 mm a una concentración de proteína de 10 μM (0.264 mg mL^{-1}). La evaluación de la reversibilidad se realizó del mismo modo que en los ensayos de dicroísmo circular.

Los espectros de fluorescencia intrínseca en función de la concentración de desnaturalizante se determinaron a dos longitudes de onda de excitación: 280 y 295 nm, y a un rangos de longitud de onda de emisión: 310 a 420 nm. Las mediciones se realizaron en una celda de cuarzo con un paso de luz de 5 mm a una concentración de proteína de 0.200 mg mL⁻¹.

Determinación de la constante de disociación y la estequiometría de unión.

Para evaluar la constante de disociación (K_D) y la estequiometría de la unión de histidina y arginina de las proteínas estudiadas, se determinó el cambio del espectro de emisión de fluorescencia intrínseca de la proteína al agregar cantidades conocidas de ligando. Todos los experimentos se llevaron a cabo a una concentración de proteína de 25 μ M (0.66 mg mL⁻¹ para HisJ, 0.65 mg mL⁻¹ para ArtJ) en un amortiguador 10 mM BTP pH 9.0 en una celda de cuarzo con un paso de luz de 10 mm en agitación a 25°C (para ArtJ se realizaron adicionalmente experimentos a 60°C). Las soluciones “stock” de histidina y arginina fueron preparadas el mismo día del experimento, con el mismo amortiguador que el de la proteína, verificando que el valor de pH se mantuviera en 9.0. Todas las soluciones (proteína, amortiguador y ligandos) fueron microfiltradas con una membrana de 22 μ m antes de cada experimento. El volumen inicial fue 2.0 mL y el aumento máximo debido a la adición del ligando fue del 2%, por lo que se considera a la concentración de proteína total constante durante el experimento. La concentración total de ligando ($[L]_T$) agregada en la celda fue corregida de acuerdo al aumento de volumen correspondiente.

La unión proteína-ligando fue analizada de acuerdo al modelo:



donde [P] es la concentración de proteína libre, [L] es la concentración de ligando libre, [PL] es el complejo formado y la K_D es la constante de disociación. Este modelo fue elegido debido a que ArtJ e HisJ presentan un único sitio de unión, por lo que la estequiometría debe ser igual a uno (Wyman *et al.*, 1990; figura 10).

El valor de fluorescencia a 325 nm, para HisJ, o 336 nm, para ArtJ, de cada espectro a una concentración conocida de ligando fue normalizado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$f_{PL} = \frac{[PL]}{[P]_T} = \frac{|F-F_0|}{F_{max}}; \quad (6)$$

donde:

f_{PL} es la fracción del complejo proteína-ligando.

$[PL]$ (M) es la concentración del complejo proteína-ligando.

$[P]_T$ (M) es la concentración de proteína total.

F (mV) es el valor de fluorescencia de la proteína a cada concentración de ligando.

F_0 (mV) es el valor inicial de fluorescencia de la proteína.

F_{max} (mV) es el valor de fluorescencia de la proteína a concentraciones saturantes de ligando.

Los datos de fracción de complejo formado (f_{PL}) contra la concentración total de ligando ($[L]_T$) fueron ajustados a la siguiente ecuación:

$$f_{PL} = \frac{([L]_T + [P]_T + K_D) - \sqrt{([L]_T + [P]_T + K_D)^2 - 4[P]_T[L]_T}}{2[P]_T}; \quad (7)$$

donde:

$[L]_T$ (μ M) es la concentración total de ligando en la celda.

$[P]_T$ (μ M) es la concentración total de proteína.

K_D (μ M) es la constante de disociación.

Los parámetros del ajuste son $[P]_T$ y K_D . Aunque la $[P]_T$ es conocida, si este parámetro se fija, la ecuación no se ajusta a los datos. Esto puede deberse a la incertidumbre en la determinación de la concentración de proteína. La estequiometría (n) se calculó como el cociente entre el valor de $[P]_T$ obtenido a partir del ajuste entre el $[P]_T$ conocido de la celda:

$$n = \frac{[P]_T \text{ ajuste}}{[P]_T \text{ celda}} \quad (8)$$

Desnaturalización por temperatura.

El rango de temperatura empleado fue 20 a 75°C para HisJ y de 20 a 85°C para ArtJ, medido directamente en el interior de la celda usando un termosensor incorporado al espectropolarímetro. Para evitar evaporación, la celda se selló con Parafilm®. Todas las muestras de proteína se prepararon un día anterior al experimento y se incubaron a 20°C toda la noche.

El desplegamiento térmico de HisJ también se llevó a cabo en 10 mM BTP pH 8.0. En el caso del desplegamiento por temperatura de ArtJ se utilizaron diferentes valores de pH, empleando los siguientes amortiguadores (todos a la misma concentración de 10 mM): citrato en el intervalo de pH 3.0 a 6.0, BTP de 7.0 a 9.0, y borato para pH 10.0. El valor de pH 8.0 se omitió ya que el pI teórico de ArtJ es de 7.7 y precipita por la ausencia de carga.

Calorimetría diferencial de barrido.

En contraste con la desnaturalización por temperatura seguida por técnicas espectroscópicas, donde los parámetros termodinámicos se calculan asumiendo un modelo de desplegamiento, la calorimetría diferencial de barrido (DSC, en inglés) permite medir directamente la energía que absorbe una proteína al perder su estructura al aumentar la temperatura a velocidad constante. Esto lo convierte en una técnica muy poderosa, ya que sin asumir ningún modelo uno puede medir con alta precisión la energética de estos cambios conformacionales. En esta técnica se mide la diferencia de capacidad calorífica como función de la temperatura entre dos líquidos contenidos en celdas gemelas separadas. Para esto se registra la energía eléctrica requerida para mantener la misma temperatura en ambas celdas mientras se conserva un incremento constante de la temperatura. Como la solución con proteína requiere más energía para igualar la temperatura durante el barrido que la celda con amortiguador, siempre habrá una diferencia en la energía eléctrica que el equipo aplica, registra y convierte a capacidad calorífica. En la desnaturalización de proteínas siempre se observa una o varias transiciones, donde el área bajo la curva es el ΔH calorimétrico. La pretransición y postransición del pico corresponde a la

capacidad calorífica del estado nativo y desplegado, respectivamente (Privalov, 2009). El desplegamiento térmico de HisJ y ArtJ fue evaluado utilizando un calorímetro capilar VP-Capillary DSC (Microcal®). En todos los experimentos el amortiguador usado fue 10 mM BTP pH 9.0, a menos que se especifique otro amortiguador.

Todas las muestras fueron dializadas exhaustivamente en el amortiguador correspondiente durante una noche antes del experimento, con el fin de usar el buffer de diálisis como referencia para obtener la línea base instrumental. Los experimentos para evaluar la reversibilidad de la desnaturalización se realizaron a una concentración de 0.5 mg mL⁻¹ de proteína en un rango de 20 a 75°C para HisJ y de 20 a 110°C para ArtJ a una velocidad de barrido de 60 K hr⁻¹. Los valores de pH usados fueron: 8.0 y 9.0 para HisJ, 4.5 y 9.0 para ArtJ (para el valor de pH de 4.5 se utilizó 20 mM de acetato de potasio como amortiguador). Inmediatamente después del primer barrido, se dejó enfriar la muestra, se dejó equilibrar por 20 minutos, y se realizó un segundo barrido.

Adicionalmente se probaron diferentes velocidades de barrido: 30 K hr⁻¹, 90 K hr⁻¹ y 150 K hr⁻¹ para HisJ; 60 K hr⁻¹ y 150 K hr⁻¹ para ArtJ. Todos estos ensayos se llevaron a cabo a pH 9.0.

Para determinar el valor del cambio en la capacidad calorífica (ΔC_P), en el caso de un desplegamiento térmico reversible, se llevaron a cabo experimentos con una velocidad de barrido de 90 K hr⁻¹ a un pH de 9.0 con tres diferentes concentraciones de proteína: 1.5, 2.0 y 2.5 mg mL⁻¹.

Desnaturalización por agentes químicos.

Las soluciones de urea e hidrocloreuro de guanidinio (GdnHCl) fueron preparadas antes de cada experimento a una concentración cercana a la deseada. La concentración real fue determinada midiendo el índice de refracción de cada solución, junto con el del amortiguador base, usando un refractómetro ATAGO 3T. Los índices de refracción obtenidos se introdujeron en el servidor de internet: <http://sosnick.uchicago.edu/gdmcl.html>, que calcula la concentración basándose en

una curva patrón de la diferencia entre el índice de refracción de la solución con desnaturalizante y la del amortiguador base.

Todas las mediciones de desnaturalización química de HisJ y ArtJ (con excepción de la evaluación de la reversibilidad y el tiempo de equilibrio), se realizaron en el espectropolarímetro descrito anteriormente. En todos los experimentos el amortiguador usado fue 10 mM BTP pH 9.0. Las muestras se prepararon el mismo día del experimento y se incubaron por 2 horas a 25°C antes de realizar las mediciones. Los espectros se obtuvieron a 25°C. Los espectros de DC y fluorescencia a cada concentración de desnaturalizante se midieron con la misma muestra.

Determinación del tiempo de equilibrio y la reversibilidad del desplegamiento químico.

Los ensayos para determinar la reversibilidad y el tiempo que requiere el proceso de desplegamiento químico para llegar al equilibrio fueron realizados en un lector de placas multifuncional POLARstar Omega (BMG LABTECH©) en su configuración de intensidad de fluorescencia. La excitación se llevó a cabo con un filtro de 280 nm y se registró la intensidad de fluorescencia de emisión total con un filtro de 320 nm. Se prepararon dos muestras de proteína a 1.0 mg mL⁻¹, una de ellas contenía además 5.0 M Urea o 3.0 M de GdnHCl, dependiendo del agente químico a probar. Ambas se incubaron a 25°C toda la noche. Posteriormente usando las dos soluciones anteriormente incubadas se elaboraron diferentes muestras a 0.100 mg mL⁻¹ de proteína (12 para el desplegamiento, 11 para el replegamiento) en un rango de 0.0 a 5.0 M para urea o de 0.0 a 3.0 M para GdnHCl. Las muestras preparadas se colocaron en una placa de 96 pozos, con las soluciones blanco correspondientes. Cada concentración de desnaturalizante se midió por triplicado. Las placas se aislaron con una mica y se incubaron a 25°C. Se realizaron mediciones cada 2 horas y se evaluó en que tiempo la curva de desnaturalización y renaturalización se empalmaban, indicando que el proceso llegó al equilibrio.

Análisis de la desnaturalización térmica.

Todos los análisis de datos se realizaron asumiendo un modelo de dos estados reversible:



donde:

N es la proteína en el estado nativo.

U es la proteína en el estado desplegado.

K_U es la constante de desplegamiento (unfolding, en inglés) del proceso:

$$K_U = \frac{[U]}{[N]}; \quad (10)$$

Datos obtenidos por técnicas espectroscópicas.

Los datos del cambio en la señal espectroscópica (dicroísmo circular o fluorescencia) en función de la temperatura fueron normalizados y se presentan de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$f_U = \frac{[U]}{[N]+[U]} = \frac{(y_N+m_N T)-y_{obs}}{(y_N+m_N T)-(y_U+m_U T)}, \quad f_N = 1 - f_U; \quad (11, 12)$$

donde:

f_U es la fracción de proteína en estado desnaturalizado

f_N es la fracción de proteína en estado nativo

y_{obs} es la señal espectroscópica a una temperatura dada.

$(y_N + m_N T)$ y $(y_U + m_U T)$ son los ajustes a una línea recta de la pre y post transiciones respectivamente (y es la ordenada al origen, m la pendiente y T la temperatura)

Con el fin de calcular los parámetros termodinámicos del desplegamiento por temperatura los datos fueron analizados de la siguiente manera:

Primero los datos de la transición de la gráfica de f_N vs T se convirtieron al logaritmo natural de la constante de equilibrio de acuerdo a:

$$\ln K_D = \ln \frac{1-f_N}{f_N} \quad (13)$$

Los datos de $\ln K_U$ vs $1/T$ (temperatura en Kelvin) se graficaron y ajustaron a una línea recta (asumiendo un ΔC_P igual a cero), donde la pendiente es proporcional a la entalpía de desplegamiento y la ordenada al origen es proporcional a la entropía de desplegamiento de acuerdo a la ecuación de van't Hoff:

$$\frac{d \ln K_U}{d\left(\frac{1}{T}\right)} = -\frac{\Delta H_{vh}}{R}, b = \frac{\Delta S_{vh}}{R}; \quad (14,15)$$

donde:

ΔH_{vh} (kcal mol⁻¹) es la entalpía de van't Hoff de desplegamiento.

ΔS_{vh} (kcal mol⁻¹ K⁻¹) es la entropía de van't Hoff de desplegamiento.

R es la constante de los gases ideales ($R = 1.987$ cal mol⁻¹ K⁻¹)

T_m (K) es la temperatura media de desnaturalización, definida como la temperatura donde $\ln K_U = 0$, es decir, donde la mitad de las moléculas de proteína han perdido su estructura.

$$T_m = \frac{\Delta H_{vh}}{\Delta S_{vh}} \quad (16)$$

Calorimetría Diferencial de Barrido.

Todas las trazas calorimétricas se corrigieron por el tiempo de respuesta del equipo (usando el algoritmo incluido en el programa de análisis), se les restó la línea instrumental y se normalizaron con respecto a la concentración de proteína.

Todos los experimentos de HisJ se ajustaron a un modelo de dos estados reversible con ΔC_{PD} (incluido en la paquetería de DSC de Microcal en el programa Origin 7.0, OriginLab®). De este ajuste se obtiene la entalpía de desplegamiento calorimétrica

(ΔH_{cal}), la temperatura media de desnaturalización (T_m) y el cambio en la capacidad calorífica de desplegamiento (ΔC_{PD}).

El porcentaje de reversibilidad se determinó como el cociente entre la entalpía de desplegamiento (ΔH_D) del segundo escaneo con respecto al primero:

$$\% \text{ reversibilidad} = \frac{\Delta H_{cal} \text{ segundo barrido}}{\Delta H_{cal} \text{ primer barrido}} * 100 \quad (17)$$

Análisis de desnaturalización química.

Para el análisis se tomaron los datos de dicroísmo circular a 222 nm (en ambas proteínas), y el valor del máximo de intensidad de fluorescencia (325 nm para HisJ, 336 nm para ArtJ), en las dos longitudes de onda de excitación: 280 nm y 295 nm.

Los datos espectroscópicos sin normalizar, a diferentes concentraciones de desnaturalizante, se ajustaron sin normalizar a la ecuación de Santoro-Bolen (Santoro *et al.*, 1988):

$$y_{obs} = \frac{(y_N + m_N[A]) + (y_D + m_D[A]) * e^{-\left(\frac{\Delta G_D - m[A]}{RT}\right)}}{1 + e^{-\left(\frac{\Delta G_D - m[A]}{RT}\right)}}; \quad (18)$$

donde:

y_{obs} es la señal espectroscópica a una concentración de desnaturalizante dada.

($y_N + m_N[A]$) y ($y_D + m_D[A]$) son los ajustes a una línea recta de la parte previa y posterior a la transición respectivamente (el término y es la ordenada al origen, el término m es la pendiente y $[A]$ es la concentración de agente desnaturalizante, en ambos casos).

ΔG_D (kcal mol^{-1}) es la energía libre de Gibbs de desplegamiento de la proteína en agua (a una concentración de desnaturalizante igual a 0)

m ($\text{kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$) es la pendiente del cambio del ΔG_D con respecto a la concentración de desnaturalizante.

La C_m (M) es la concentración media de desnaturalización, donde la mitad de las moléculas de proteína han perdido su estructura (Santoro *et al.*, 1988). Se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$C_m = \frac{\Delta G_D}{m} \quad (19)$$

Construcción de la curva de estabilidad.

La curva de estabilidad, que refleja la dependencia la energía libre de Gibbs con respecto a la temperatura, se construyó usando los datos derivados de las mediciones calorimétricas usando la ecuación (LiCata *et al.*, 2011):

$$\Delta G_D(T) = \Delta H_D \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) - \Delta C_{PD} \left(T_m - T + T \ln \frac{T}{T_m}\right) \quad (20)$$

donde:

ΔG_D (kcal mol⁻¹) es la energía libre de Gibbs de desplegamiento.

ΔH_D (kcal mol⁻¹) es la entalpía de desplegamiento.

ΔC_{PD} (kcal mol⁻¹ K⁻¹) es el cambio en la capacidad calorífica.

T_m (K) es la temperatura media de desnaturalización.

Análisis de acoplamiento unión-estabilidad.

Para este análisis se utilizó el procedimiento descrito por Sánchez Ruiz (Sanchez-Ruiz, 2007). El cambio en la señal de fluorescencia en función de la temperatura en presencia de concentraciones crecientes de ligando se analizó como se describió en la sección de desplegamiento térmico. La influencia de la unión de ligando en la estabilidad se determinó usando los datos donde la T_m aumenta de manera lineal con respecto a la concentración de ligando (donde el equilibrio se comporta de acuerdo a la ecuación 3), construyendo la gráfica $\ln [L]_T$ vs $1/T_m$ (también conocido como gráfico de Sturtevant) y ajustando los datos a una línea recta.

La pendiente de esta línea es proporcional al ΔH_{NL} :

$$\frac{d \ln[L]}{d\left(\frac{1}{T_m}\right)} = -\frac{\Delta H_{NL}}{R}; \quad (21)$$

donde:

ΔH_{NL} (kcal mol⁻¹) es la entalpía de desplegamiento y disociación al desnaturalizar el complejo proteína-ligando.

T_m (K) es la temperatura media de desnaturalización a cada concentración de ligando [L].

R es la constante de los gases ideales.

La estimación teórica del desplegamiento del complejo se calculó con la siguiente ecuación (Sanchez-Ruiz, 2007):

$$\Delta H_{NL} = \Delta H_D - \Delta H_L; \quad (22)$$

donde fue usada la entalpía de desplegamiento proveniente de los datos calorimétricos (ΔH_D) y la entalpía de unión a ligando proveniente de experimentos de ITC realizados en colaboración la Dra. Nancy Pulido Mayoral (Pulido *et al*, en preparación).

Resultados.

Expresión y purificación de ArtJ e HisJ.

Preliminarmente al protocolo de purificación reportado en este trabajo se intentó expresar las proteínas en el periplasma de *E. coli* y extraerlas por choque osmótico, estrategia empleada para la proteína LAO (Vergara, 2011). HisJ sí es transportada al periplasma, con un rendimiento total de 9 mg por litro de cultivo. Lamentablemente, en ninguna de las varias condiciones probadas (diferentes medios y tiempos de inducción, datos no mostrados) se localizó a ArtJ en el periplasma. Dado el bajo rendimiento de HisJ y la imposibilidad de encontrar a ArtJ en el espacio periplásmico, se optó por cambiar el protocolo y extraer a las proteínas del citoplasma.

En la nueva estrategia a seguir, de distintas condiciones probadas (densidad óptica, tiempo de inducción y concentración de IPTG) se encontró que la mejor condición de sobreexpresión es: un crecimiento bacteriano que alcance una densidad óptica 600 nm de entre 0.8 a 1.0, tiempo de inducción de 4 horas y 1 mM IPTG. Las células fueron lisadas mecánicamente usando una prensa de French. Este proceso fue preferible a la sonicación ya que es altamente eficiente lisando las bacterias, al menos en el sistema de expresión usado. El extracto celular que se recupera al centrifugar el lisado contiene gran cantidad de contaminantes: lípidos, ácidos nucleicos y otras proteínas, por lo que debe clarificarse antes de ser inyectado en un sistema de cromatografía líquida. Para lograr esto se usó el sulfato de amonio como precipitante. Se agregó a los extractos sulfato de amonio a tres porcentajes de saturación: 40, 60 y 80%. En cada porcentaje se recuperó el precipitado, se dializó una muestra y mediante en un gel de acrilamida desnaturalizante se evaluó la presencia de las proteínas de interés. Las dos proteínas se encontraron en la fracción soluble a 80% de saturación, sin que se pudieran observar otras bandas en el gel (datos no mostrados). Además, gran parte de los lípidos y ADN coprecipita con las proteínas, lo que clarificó bastante el extracto e hizo la purificación más sencilla.

Como siguiente paso de purificación, se decidió inyectar a ambas proteínas en una columna de intercambio aniónico (se usaron dos resinas diferentes que tienen carga positiva: SourceQ y MonoQ, ambas con resultados similares) ya que en las condiciones usadas (10 mM bis tris propano pH 9.0) ambas proteínas están cargadas negativamente (el pI teórico de ambas es: 5.17 para HisJ y 7.70 para ArtJ), por lo que están en condiciones favorables para purificarse mediante este tipo de resina. En la figura 12 se muestra el perfil de elución de HisJ en una columna SourceQ acoplada a un sistema de HPLC Waters 600 (Waters©). Se observa un solo pico a 50 mL, aproximadamente a 90 mM NaCl. Este pico corresponde a HisJ. El pico que se observa en el lavado con 1.0 M NaCl corresponde a ADN, confirmado por un gel de agarosa (datos no mostrados).

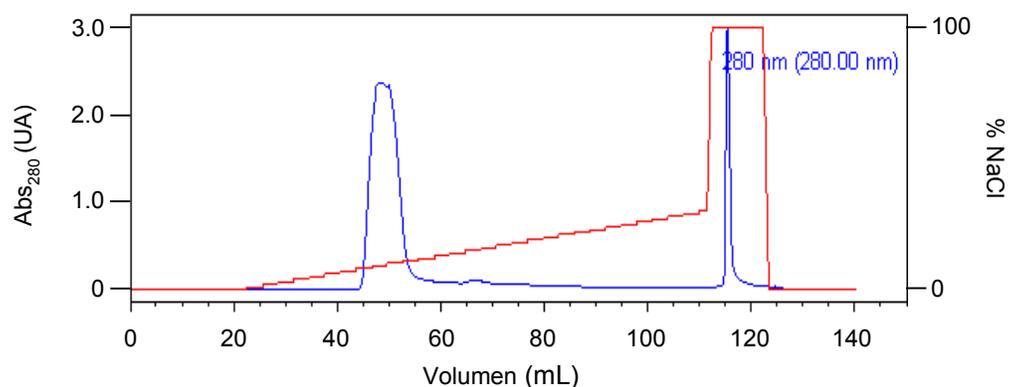


Figura 12. Cromatograma de la purificación de HisJ usando una columna SourceQ acoplada a un equipo HPLC Waters 600, en condiciones descritas en métodos. La línea azul representa la absorbancia a 280 nm; la línea roja representa el gradiente de NaCl usado para eluir a la proteína.

En el caso de ArtJ, también se sometió a una cromatografía de intercambio aniónico. En el cromatograma no se observa un pico en el gradiente (figura 12). Sin embargo, existe un pico extendido anterior al gradiente, lo que sugiere que la proteína no fue retenida por la columna. El pico que eluye a altas concentraciones de sal corresponde igualmente a ADN (datos no mostrados). Para asegurar que ArtJ se encontrara pura, el frente se concentró en 10 mM MES pH 6.0 y se inyectó a una columna de intercambio catiónico (resina con carga negativa carboximetil-Sefarosa) acoplada a un sistema de FPLC ÄKTA (General Electric©). Ya que el valor de pH

ahora se encuentra abajo del pI de ArtJ, la carga de esta proteína es positiva, y debería ser retenida por la columna. En el perfil de elución (figura 13) podemos observar que, en efecto, solo se observa un pico a 115 mL, 600 mM NaCl.

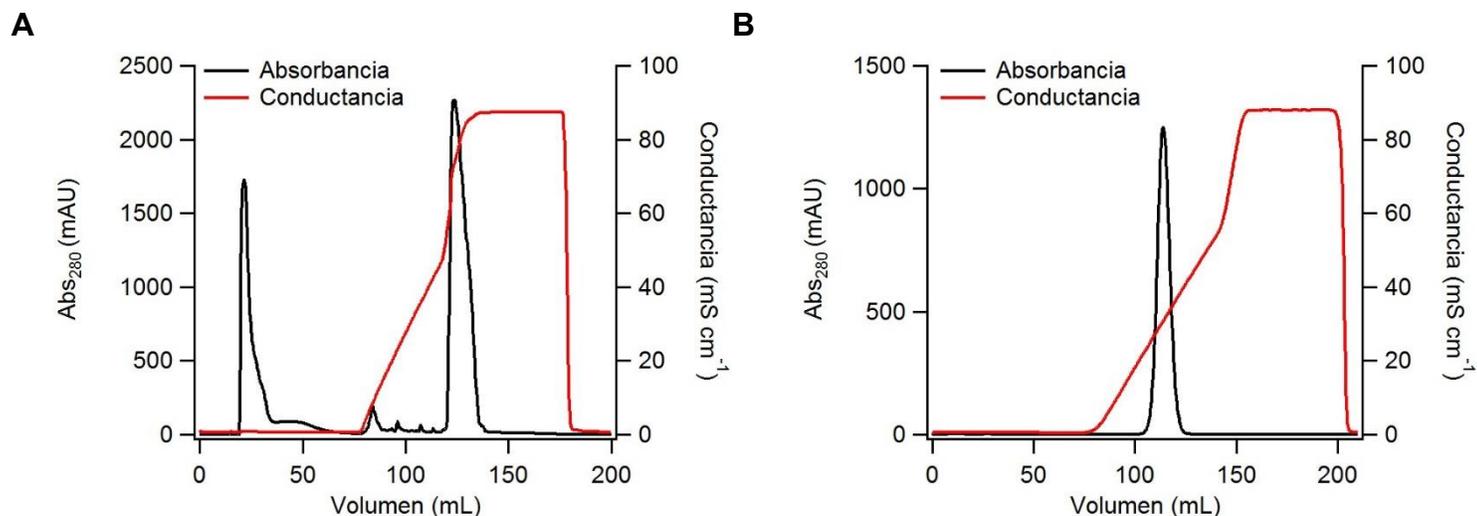


Figura 13. Cromatogramas de la purificación de ArtJ usando primero una columna MonoQ (A) y después una columna CM-S (B) acopladas a un equipo FPLC ÄKTA, en condiciones descritas en métodos. La línea negra representa a la absorbancia a 280 nm; la línea roja representa el gradiente de NaCl usado para eluir a la proteína.

Para comprobar la pureza de ArtJ e HisJ después de la purificación se utilizaron la electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (figura 14) y la cromatografía de exclusión molecular (figura 15), que separa a las proteínas por su tamaño. En los cromatogramas de ArtJ e HisJ se puede observar únicamente un solo pico, a un volumen de elución similar para ambas (110 mL para ArtJ y 100 mL para HisJ). En el gel de acrilamida sólo se observa una banda para cada muestra, con un peso cercano al de LAO (26 kDa). El rendimiento de sobreexpresión por litro de cultivo fue de 120 mg para HisJ y 54 mg para ArtJ. Por lo tanto, el método de purificación da como resultado una gran cantidad de proteína con un alto grado de pureza.

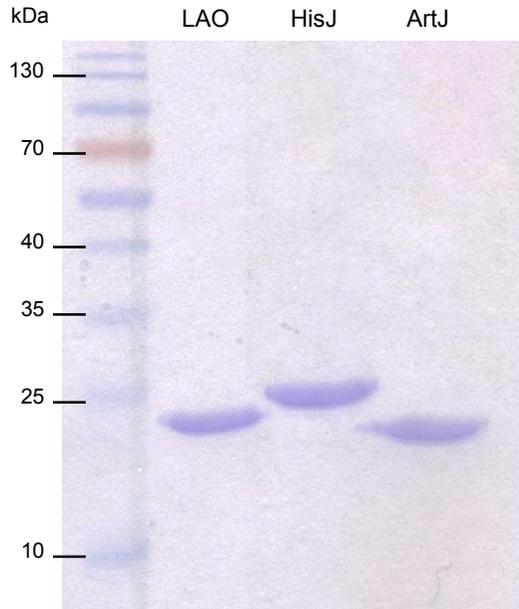


Figura 14. Gel desnaturalizante de poliacrilamida donde se cargó una muestra de HisJ (26.3 kDa) y ArtJ (26 kDa) después de todos los pasos de purificación descritos para cada una. Se incluye un carril con la proteína LAO (26 kDa) para fines comparativos y un marcador de peso molecular.

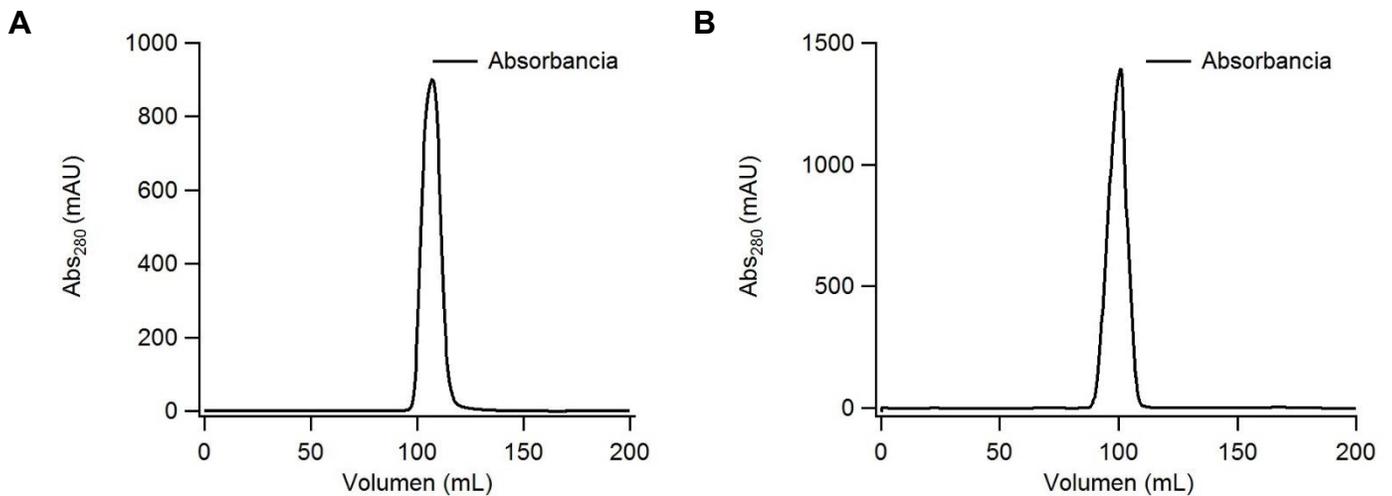


Figura 15. Cromatograma de ArtJ (**A**) e HisJ (**B**) usando una columna de exclusión molecular, Superdex 75, acoplada a un equipo FPLC ÄKTA, en condiciones descritas en métodos.

Ambas proteínas se almacenaron en 10 mM BTP pH 9.0 para su uso a mediano plazo. Únicamente en el caso de ArtJ se notó que sufría una ligera agregación con el paso de tiempo, por lo cual antes de cada experimento se centrifugó la solución y se le midió la concentración. Para su almacenamiento a largo plazo se mantuvieron en suspensión a 80% de saturación de sulfato de amonio.

Caracterización espectroscópica de ArtJ e HisJ.

Ya que se obtuvieron las proteínas puras, lo siguiente fue determinar sus espectros de dicroísmo de circular (UV lejano y cercano) y de emisión de fluorescencia. Estos espectros en condiciones nativas serán el punto de partida para caracterizar los cambios en estructura debido a la unión de ligandos, presencia de caotrópicos o aumento de la temperatura.

En los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano, de 200 a 260 nm se pueden observar diferencias entre ambas proteínas. Primeramente, HisJ tiene una mayor elipticidad negativa que ArtJ, aunque ambas comparten un mínimo cerca de los 222 nm (figura 16A). Sin embargo, HisJ presenta un mínimo a 210 nm que está ausente en ArtJ. Este mínimo desaparece si al amortiguador se le agrega 100 mM NaCl o se reemplaza el BTP por 10 mM HEPES (datos no mostrados). Debido a que se desea comparar estos datos con el trabajo anterior con la proteína LAO, se mantuvo la condición de 10 mM BTP pH 9.0. El cambio de pH de 9.0 a 8.0 no afecta los espectros de dicroísmo circular (datos no mostrados). En la región de UV cercano, ArtJ tiene una absorción mayor que HisJ, ambas con un máximo a 276 nm, correspondiente al máximo de absorción del triptófano (figura 16B; Greenfield, 2007).

En la figura 17 se presentan los espectros de fluorescencia a dos longitudes de onda de excitación: 280 y 295 nm. Se puede observar que las dos proteínas presentan espectros muy diferentes entre ellas. HisJ presenta un máximo de emisión a 325 nm, mientras que ArtJ lo presenta a 336 nm. Además, ArtJ emite mayor fluorescencia que HisJ. El número de triptófanos que tiene HisJ en su secuencia es uno, ArtJ tiene dos (figura 9). La gran similitud entre los espectros de 280 y 295 nm,

para cada proteína, revela que el triptófano es el principal responsable del espectro de emisión.

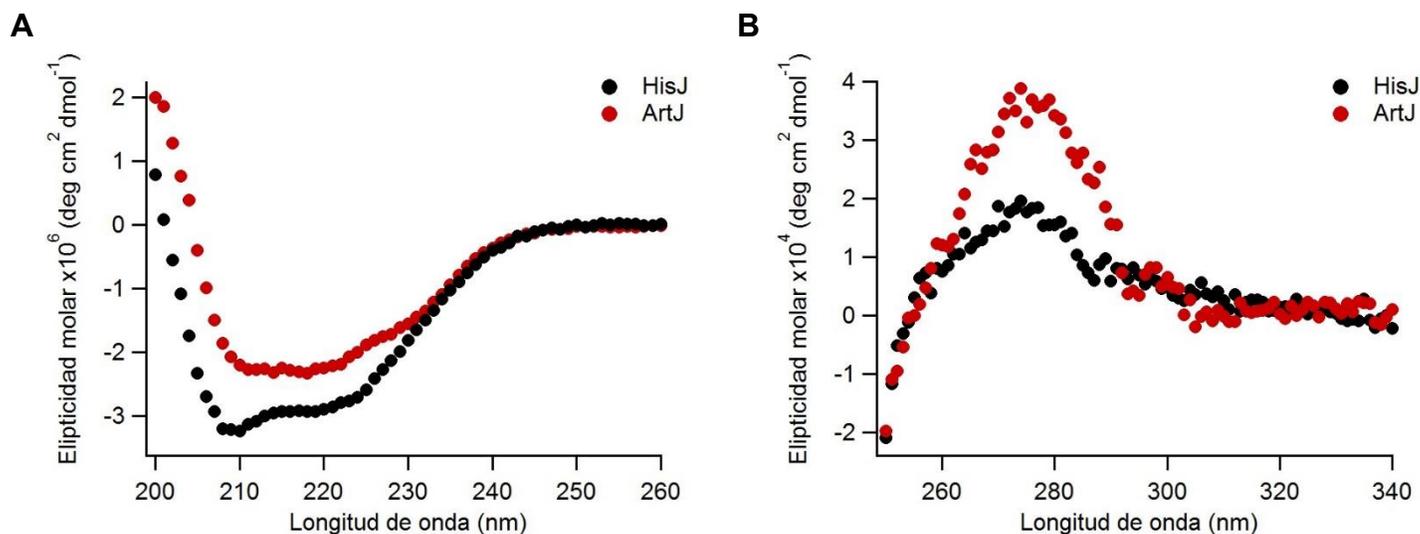


Figura 16. Espectros de de dicroísmo circular en el UV lejano (A) y cercano (B) de ArtJ e HisJ a 20°C en 10 mM BTP pH 9.0.

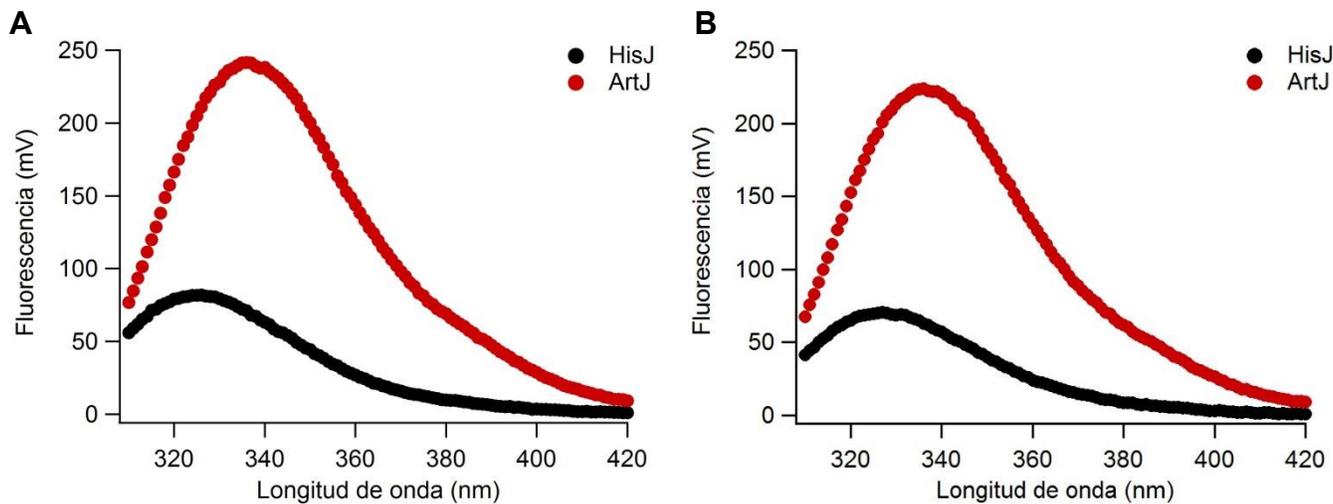


Figura 17. Espectros de fluorescencia de ArtJ e HisJ a una λ_{ex} de 280 (A) y 295 (B) nm a 25°C con una concentración de proteína de 25 μ M en 10 mM BTP pH 9.0 en un celda con un paso de luz de 10 mm.

Para estimar el porcentaje de estructura secundaria se utilizó el programa CDNN, que se basa en un sistema de redes neurales usando espectros de referencia de proteínas conocidas. De acuerdo a la deconvolución, ArtJ contiene más estructura en conformación β , mientras que HisJ presenta más estructura en α . Además, el porcentaje de secuencia sin estructura es menor en HisJ (tabla 2). Si comparamos los porcentajes de estructura secundaria provenientes de la deconvolución con la estructura en estado cerrado, ArtJ no presenta diferencias significativas, pero el porcentaje de hebra β en HisJ es mayor en la estructura que en el espectro de DC, indicando que existe una estructuración de HisJ, además del característico cambio conformacional de abierto a cerrado, cuando se forma el complejo HisJ-histidina.

Tabla 2. Contenido de estructura secundaria de ArtJ e HisJ de acuerdo a la deconvolución de sus espectros de DC usando el programa CDNN.

	HisJ		ArtJ		LAO
	DC	Estructura ^a	DC	Estructura ^a	Estructura ^{a, b}
Hélice α	39.80 \pm 1.0%	35.5%	29.83 \pm 0.8% ^c	32.8%	37.0%
Hebra β	14.03 \pm 0.5%	21.0%	19.03 \pm 0.3%	20.3%	19.3%
Giro β	15.77 \pm 0.2%	--- ^d	17.30 \pm 0.3%	--- ^d	--- ^d
Sin Estructura	28.50 \pm 0.7%	43.5%	36.50 \pm 0.9%	46.9%	43.7%
Suma Total	98.10 \pm 1.3%	100.00%	102.67 \pm 1.3%	100.00%	100.00%

^a Se emplearon las estructuras 1HSL, 2Q2C y 1LAG respectivamente, todas corresponden al complejo proteína-histidina.

^b Se incluye como comparación el contenido de estructura secundaria de LAO.

^c Se reporta el promedio \pm desviación estándar de los tres intervalos de longitud de onda que el programa CDNN utiliza para realizar la deconvolución.

^d El programa utilizado para calcular el contenido de estructura secundaria a partir de datos cristalográficos (DSSP) no calcula el porcentaje de giro β , por lo cual es omitido.

Experimentos de unión.

Una manera efectiva de verificar que ArtJ e HisJ se encuentran en su estado nativo *in vitro* es evaluar si cumplen su función, en este caso si son capaces de unir sus ligandos, específicamente histidina y arginina (cabe resaltar que esta es la mitad de su función, la otra es la asociación con su transportador). Adicionalmente, realizar estos ensayos nos permite discernir si el método de purificación da como resultado una proteína libre de ligando, o si es necesario agregar un paso en este para removerlo. Como si se observó un cambio en la fluorescencia al agregar ambos ligandos a ambas proteínas (figuras 17 a 19) y además la estequiometría es cercana a uno en todos los experimentos (tabla 3), es factible concluir que el protocolo de purificación es capaz de producir proteína sin ligando.

En la figura 18 se muestra el aumento en la intensidad en los espectros de fluorescencia ($\lambda_{ex} = 280$ y 295 nm) de HisJ, a 25°C en 10 mM BTP pH 9.0 , al incrementar progresivamente la concentración de ligando en la celda. Para determinar la constante de disociación (K_D) y la estequiometría de unión (n) se utilizó el valor de la intensidad de fluorescencia a 325 nm en función de la concentración de ligando total en la celda ($[L]_T$), se normalizó y se ajustaron los datos de acuerdo a las ecuaciones 6, 7 y 8. Las K_D obtenidas, promedio de ambas λ_{ex} , son 273 ± 71 nM para histidina, 451 ± 133 nM para arginina (tabla 3).

ArtJ presenta un comportamiento contrario a HisJ en las mismas condiciones. La intensidad de fluorescencia disminuye y el máximo se recorre hacia longitudes de onda menores (de 336 a 334 nm, figura 19). Para realizar los cálculos se usó el valor de intensidad a 336 nm. Al final de cada experimento se observaron precipitados en la celda, lo que explica la baja estequiometría. Por lo tanto sólo puede calcularse una constante de disociación aparente (K_D^{app}), que es de 740 ± 140 nM para histidina, 22.71 ± 31 nM para arginina (tabla 3). Como ArtJ es una proteína de un organismo termófilo se realizaron ensayos de unión a 60°C (figura 20). Se observó una mayor agregación, pero la K_D^{app} por arginina (a $\lambda_{ex} 280$ nm) disminuyó y la K_D^{app} por histidina aumentó (tabla 3).

HisJ 25°C

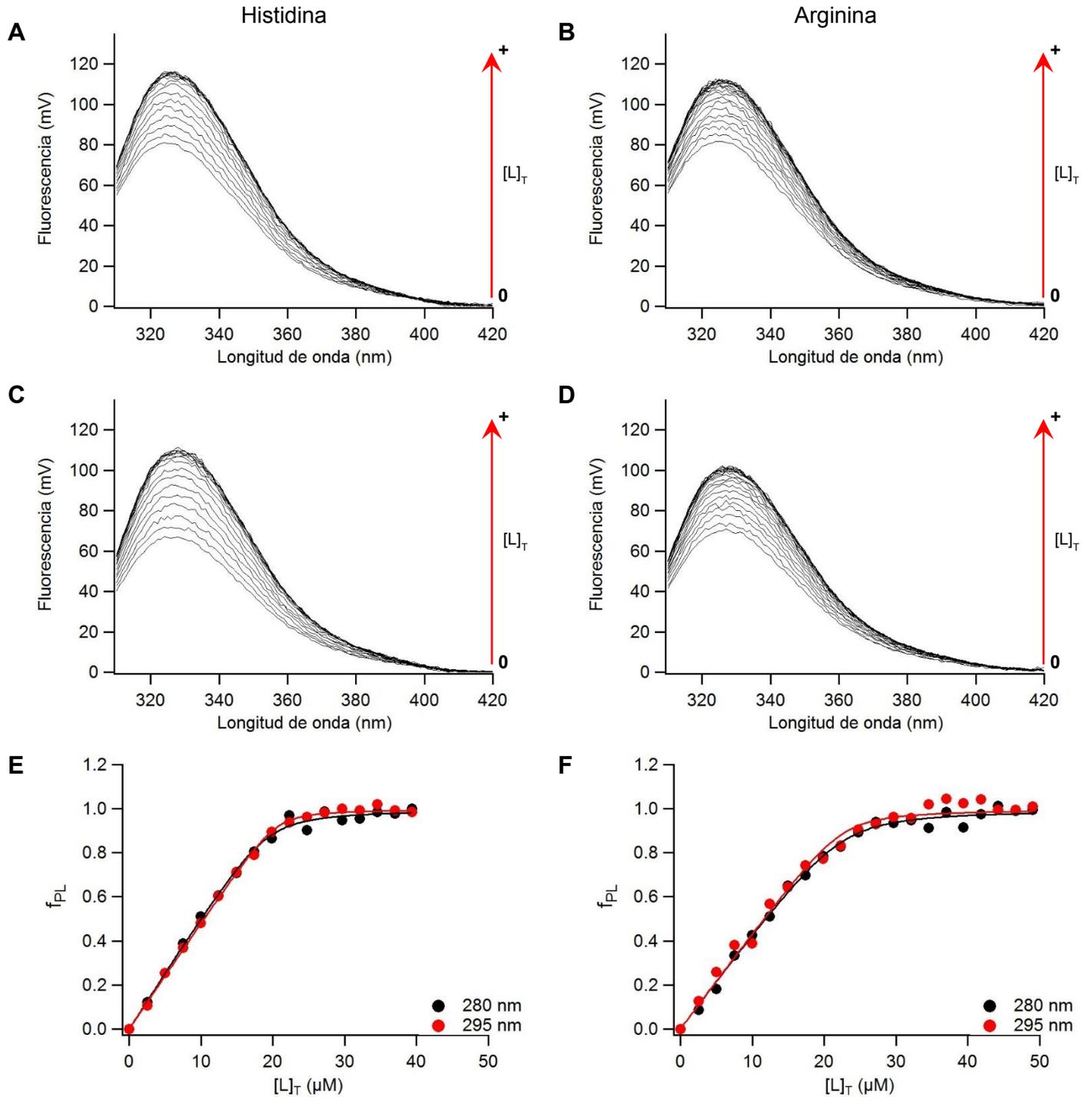


Figura 18. Titulación de HisJ con histidina y arginina seguida por fluorescencia con una λ_{ex} de 280 (A, B) y 295 (C, D) nm a 25°C en 10 mM BTP pH 9.0. Se muestran también los datos de intensidad a 325 nm, a ambas λ_{ex} , normalizados en función de la concentración de ligando total $[L]_T$: histidina (E) y arginina (F). Las líneas representan el ajuste a un modelo de un sitio de unión (ecuación 7).

ArtJ 25°C

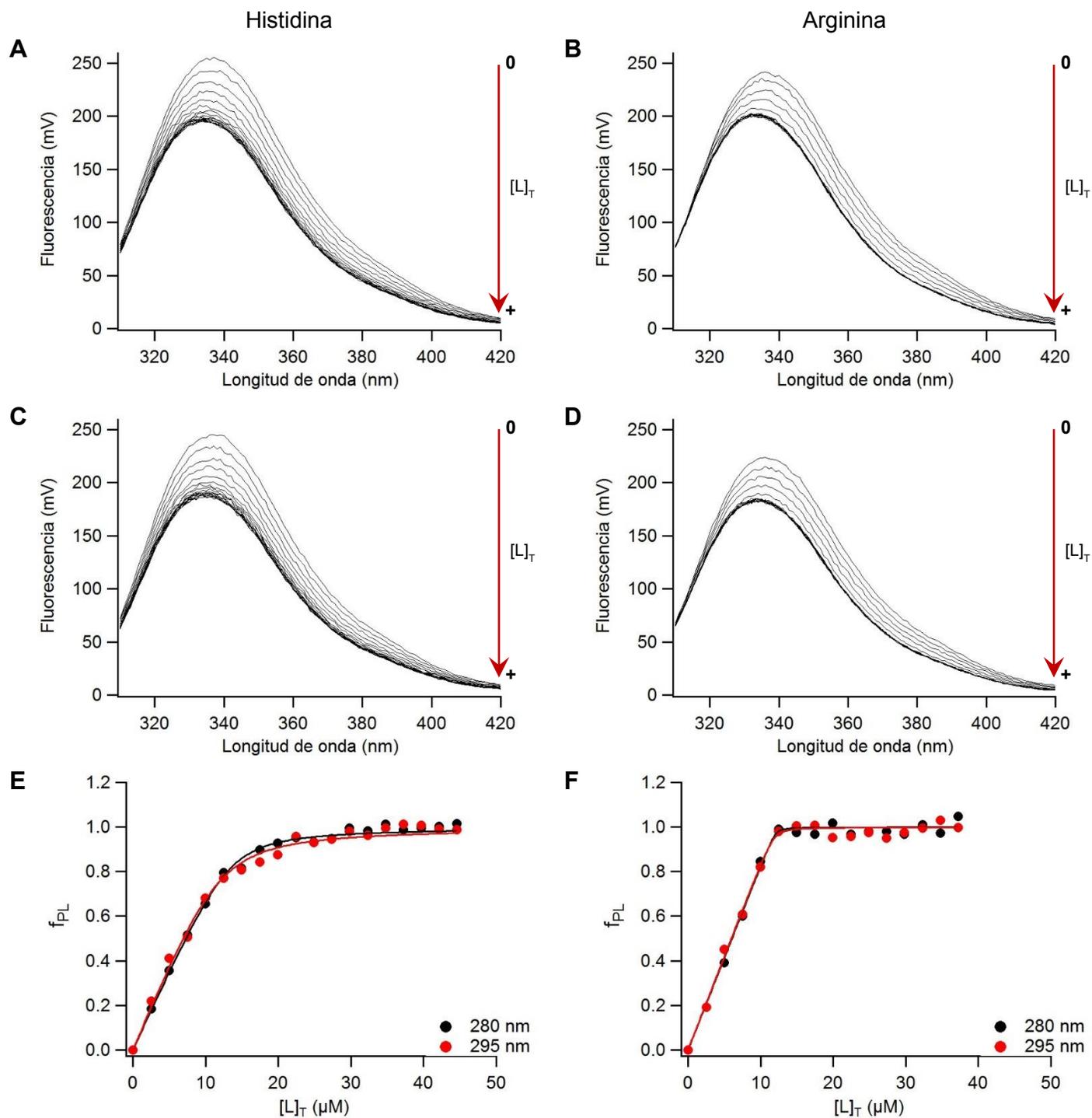


Figura 19. Titulación de ArtJ con histidina y arginina seguida por fluorescencia con una λ_{ex} de 280 (A, B) y 295 (C, D) nm a 25°C en 10 mM BTP pH 9.0. Se muestran también los datos de intensidad a 336 nm, a ambas λ_{ex} , normalizados en función de la concentración de ligando total $[L]_T$: histidina (E) y arginina (F). Las líneas representan el ajuste a un modelo de un sitio de unión (ecuación 7).

ArtJ 60°C

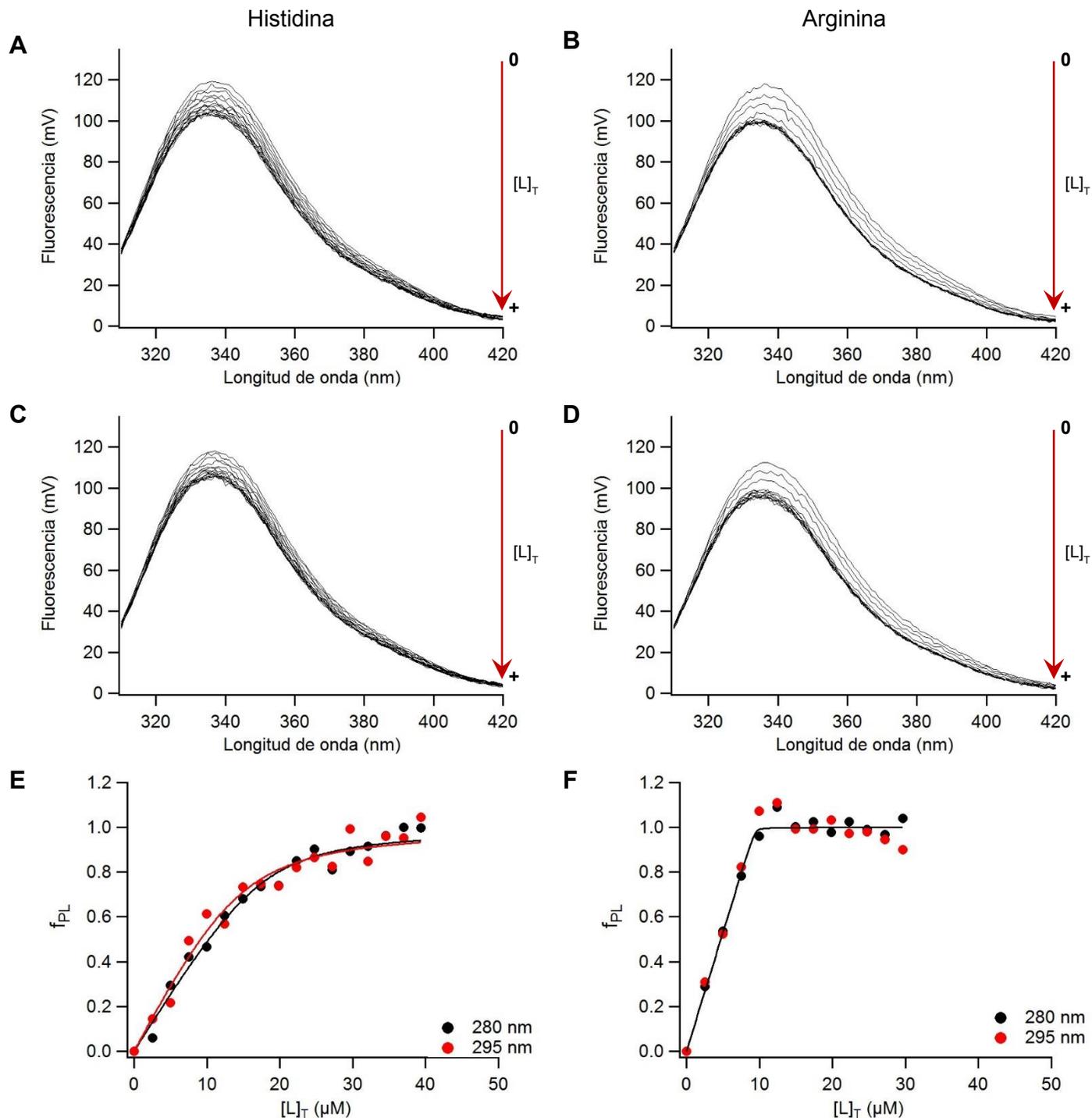


Figura 20. Titulación de ArtJ con histidina y arginina seguida por fluorescencia con una λ_{ex} de 280 (A, B) y 295 (C, D) nm a 60°C en 10 mM BTP pH 9.0. Se muestran también los datos de intensidad a 336 nm, a ambas λ_{ex} , normalizados en función de la concentración de ligando total $[L]_T$: histidina (E) y arginina (F). Las líneas representan el ajuste a un modelo de un sitio de unión (ecuación 7, no se logró ajustar la arginina).

Tabla 3. Constante de afinidad y estequiometría de unión de HisJ y ArtJ.

HisJ a 25°C						
	Histidina			Arginina		
	280 nm	295 nm	Promedio	280 nm	295 nm	Promedio
K_D (nM)	385 ± 92^a	161 ± 39	273 ± 71	579 ± 122	323 ± 144	451 ± 133
n	0.77 ± 0.1	0.82 ± 0.1	0.80 ± 0.1	0.90 ± 0.1	0.91 ± 0.2	0.90 ± 0.1

ArtJ a 25°C						
	Histidina			Arginina		
	280 nm	295 nm	Promedio	280 nm	295 nm	Promedio
K_D^{app} (nM)	557 ± 96	923 ± 173	740 ± 140	12.71 ± 23	32.71 ± 37	22.71 ± 31
n	0.54 ± 0.1	0.48 ± 0.1	0.51 ± 0.1	0.48 ± 0.1	0.48 ± 0.1	0.48 ± 0.1

ArtJ a 60°C						
	Histidina			Arginina		
	280 nm	295 nm	Promedio	280 nm	295 nm	Promedio
K_D^{app} (nM)	1393 ± 380	1870 ± 612	1631 ± 509	6.71 ± 27	--- ^b	--- ^b
n	0.71 ± 0.3	0.58 ± 0.5	0.65 ± 0.4	0.38 ± 0.1	--- ^b	--- ^b

^a Se reporta el promedio \pm promedio de la desviación estándar del ajuste de dos experimentos de titulación, con excepción de la titulación de ArtJ a 60°C, donde sólo se realizó un ensayo debido a su dificultad.

^b Los datos de unión seguidos a una λ_{ex} 295 nm no se pudieron determinar debido a la dispersión de los datos de unión. Por lo tanto no se reporta un promedio de ambas λ_{ex} .

Desplegamiento por temperatura.

Para evaluar la estabilidad y el plegamiento de ArtJ e HisJ se siguió por dicroísmo circular y fluorescencia su desnaturalización al aumentar la temperatura. Los resultados de ambas proteínas se expondrán por separado:

HisJ.

En la figura 21 se muestran los termogramas de desnaturalización y renaturalización seguidos por dicroísmo circular y fluorescencia. Las transiciones de ambos procesos se empalman (figura 21D), lo que es indicador de que el proceso está al equilibrio. Por lo tanto un análisis termodinámico es válido. Además se muestran todas las curvas normalizadas a fracción de proteína en el estado nativo (f_N ; ecuaciones 11 y 12), cuya superposición es consistente con un proceso de dos estados reversible. A pH 9.0 el valor de T_m es 53.24 ± 0.4 °C y el de ΔH_{vh} es 110.8 ± 7.4 kcal mol⁻¹. Los resultados de cada termograma, obtenidos usando las ecuaciones 13 a 16, se resumen en la tabla 4.

También se realizaron los mismos ensayos a pH 8.0 (datos no mostrados). En los espectros no se ve efecto del pH, pero la T_m cambia a 57.67 ± 0.94 °C y el ΔH_{vh} a 115.9 ± 2.5 kcal mol⁻¹.

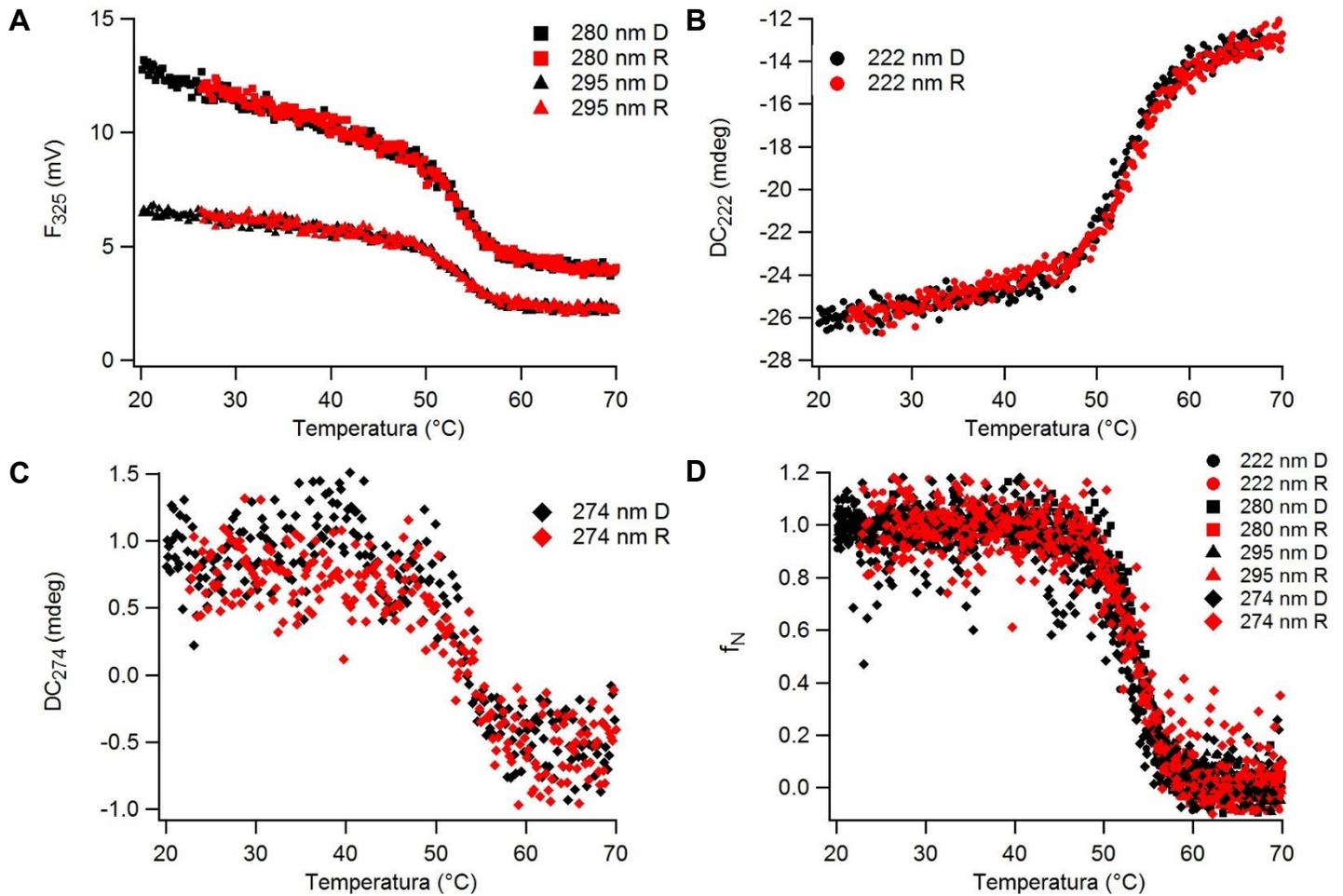


Figura 21. Termogramas de HisJ seguidos por fluorescencia con una λ_{ex} de 280 y 295 nm (A), y dicroísmo circular en UV lejano (B) y UV cercano (C). Se muestra también los datos normalizados a fracción nativa de todos los termogramas (D). Las condiciones fueron 10 mM BTP pH 9.0 a una velocidad de barrido de 60 K hr⁻¹. D es abreviatura de desnaturalización; R, de renaturalización.

Tabla 4. Datos termodinámicos del desplegamiento térmico de HisJ obtenidos por DC y fluorescencia.

	DC ₂₂₂	DC ₂₇₄	F λ_{ex} 280	F λ_{ex} 295	Promedio
ΔH_{vh} (kcal mol ⁻¹)	110.5 ± 4 ^a	101.1 ± 12	127.6 ± 6	103.9 ± 4	110.8 ± 7
ΔS_{vh} (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)	339.2 ± 12	310.0 ± 38	390.1 ± 18	318.0 ± 12	339.3 ± 23
T _m (°C)	52.5 ^b	53.1	53.9	53.5	53.2 ± 0.4

^a Se reporta el promedio ± desviación estándar de la desnaturalización y renaturalización.

^b La T_m se calculó mediante la ecuación 16.

Posteriormente se utilizó DSC para seguir también el desplegamiento por temperatura. El primer experimento fue comprobar la reversibilidad del proceso, por lo que se realizaron experimentos a dos valores de pH: 8.0 y 9.0 (se realizaron ensayos con esos dos valores de pH para comparar la reversibilidad de HisJ con la de LAO, que a pH 8.0 es menos reversible que a pH 9.0; Vergara, 2011). Después del primer barrido de temperatura se enfrió la muestra y se repitió nuevamente el ensayo (figura 22). En ambas condiciones el proceso fue reversible, sin embargo lo es más a pH 9.0 que a pH 8.0 (tabla 5).

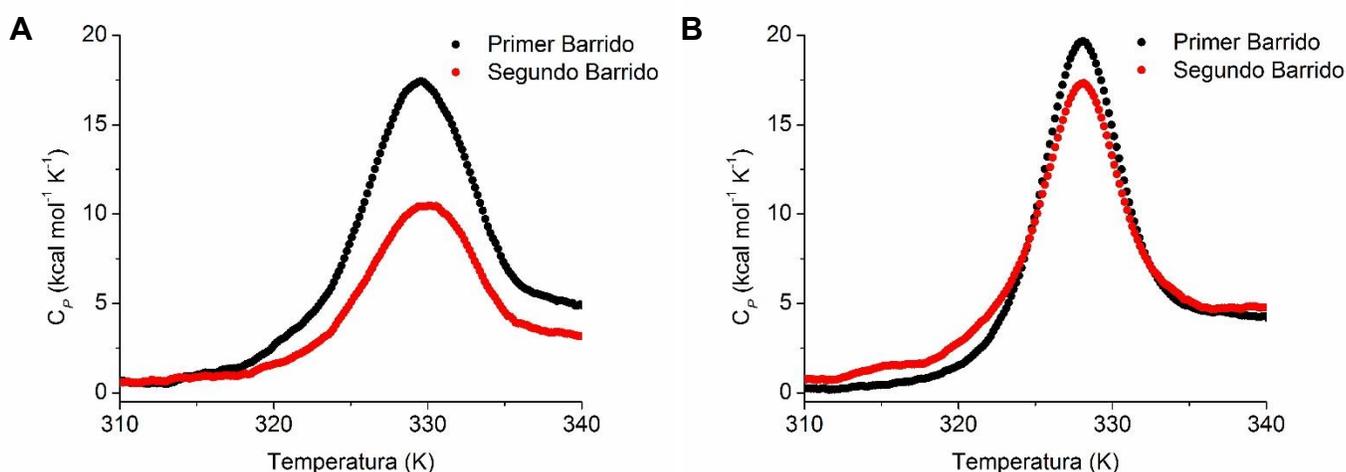


Figura 22. Reversibilidad de la desnaturalización de HisJ medida por DSC a dos valores de pH: 8.0 (A) y 9.0 (B) en 10 mM BTP a una concentración de 0.5 mg mL⁻¹ y una velocidad de barrido de 30 K hr⁻¹.

Tabla 5. Datos termodinámicos del desplegamiento térmico de HisJ obtenidos por DSC.

pH	T _m (°C)	ΔH _{cal} (kcal mol ⁻¹)	Reversibilidad ^a
8.0	56.4 ± 0.10 ^b	112.0 ± 0.5	76%
9.0	54.3 ± 0.03	119.6 ± 0.3	90%

^a La reversibilidad se calculó mediante la ecuación 17.

^b Se reporta el valor ± desviación estándar del ajuste a un modelo de dos estados.

Para continuar describiendo el desplegamiento térmico de HisJ, se procedió a evaluar si la velocidad de afecta al comportamiento de la endoterma. Se probaron tres velocidades de barrido: 30, 90 y 150 K hr⁻¹. Como se puede observar en la figura 23, solamente la velocidad de 150 K hr⁻¹ afecta ligeramente la endoterma. La diferencia de las T_m entre la velocidad más alta (54.91 ± 0.05°C) y la más baja (54.34 ± 0.03°C) es 0.57°C. Por lo tanto se concluye que el desplegamiento se encuentra bajo control termodinámico hasta 90 K hr⁻¹, es decir, al equilibrio.

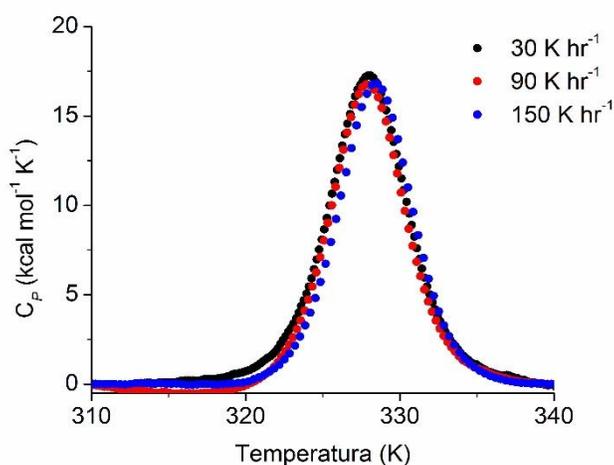


Figura 23. Efecto de la velocidad de barrido (30, 60 y 150 K hr⁻¹) en la desnaturalización térmica de HisJ en 10 mM BTP pH 9.0.

Se realizaron barridos de temperatura variando la concentración de proteína, esto con el fin de definir ambos extremos de la transición y así calcular el cambio en la capacidad calorífica en el desplegamiento (ΔC_{PD}). Todas las curvas pueden ser ajustadas satisfactoriamente a un modelo de dos estados que incluye el ΔC_{PD} (figura 24A) incluido en la paquetería de DSC de Microcal® en el programa Origin 7.0 (OriginLab®). La concentración de proteína no afecta la T_m de las endotermas (figura 23B) Del promedio de los ajustes (tabla 6) se obtuvo un ΔC_{PD} de 2.22 ± 0.03 kcal mol⁻¹ K⁻¹.

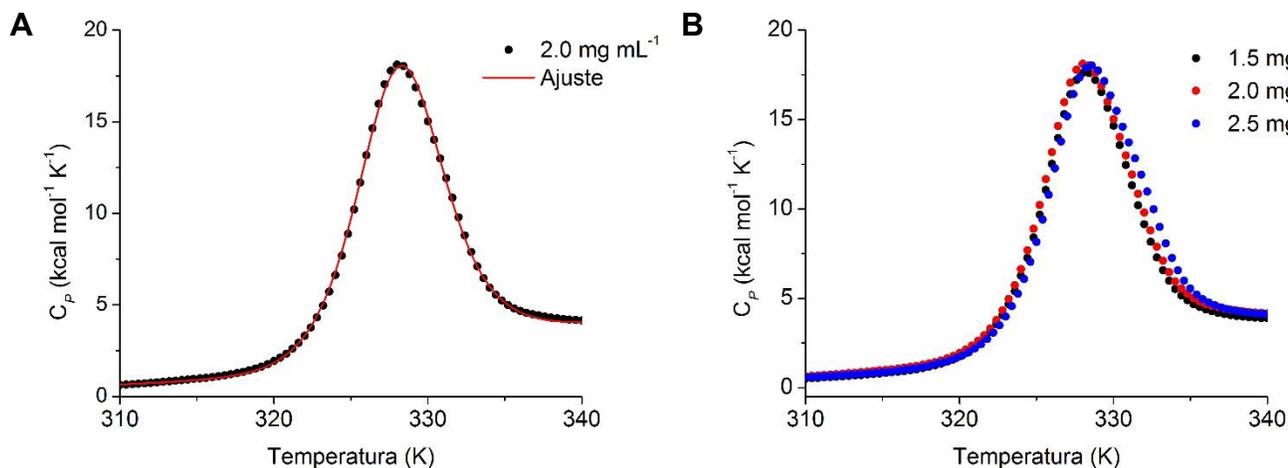


Figura 24. (A) Ajuste representativo a un modelo de dos estados reversible de la endoterma de HisJ. La concentración de proteína fue 2.0 mg mL⁻¹ a una velocidad de barrido de 90 K hr⁻¹ en 10 mM BTP pH 9.0. (B) Determinación del ΔC_P de desplegamiento de HisJ variando la concentración de proteína: 1.5, 2.0, 2.5 mg mL⁻¹ a una velocidad de barrido de 90 K hr⁻¹ en 10 mM BTP pH 9.0. El resultado de los ajustes se encuentra en la tabla 6.

Tabla 6. Datos termodinámicos del desplegamiento térmico de HisJ obtenidos por DSC a diferentes concentraciones de proteína.

	1.5 mg mL ⁻¹	2.0 mg mL ⁻¹	2.5 mg mL ⁻¹	Promedio
ΔH_{cal} (kcal mol ⁻¹)	113 ± 0.2 ^a	115 ± 0.2	115 ± 0.3	114 ± 1.2
ΔC_{PD} (kcal mol ⁻¹ K ⁻¹)	2.23 ± 0.1	2.24 ± 0.1	2.19 ± 0.3	2.22 ± 0.03
T_m (°C)	54.8 ± 0.02	54.8 ± 0.02	55.3 ± 0.03	55.0 ± 0.3

^a Se reporta el valor ± desviación estándar del ajuste a un modelo de dos estados.

El criterio calorimétrico dicta que el cociente entre el ΔH_{vh} , proveniente de los experimentos espectroscópicos, y el ΔH_{cal} debe ser igual a 1 como evidencia de que el mecanismo de plegamiento al equilibrio de una proteína sigue un proceso de dos estados, sin presencia de intermediarios. Este cociente para HisJ es de 0.97, por lo que se puede concluir que su desplegamiento sigue un mecanismo de dos estados.

ArtJ.

Para los experimentos con ArtJ se encontró que la desnaturalización térmica, a las mismas condiciones que HisJ, es un proceso irreversible: las señales espectroscópicas no se recuperan y se observó que la proteína se agrega en la celda. El primer objetivo entonces fue buscar condiciones en donde la proteína tuviera un desplegamiento reversible, consecuentemente se emplearon condiciones en las cuales se varió el pH en un rango de 3.0 a 9.0. Sorprendentemente se encontraron cuatro diferentes comportamientos al variar el pH (cabe resaltar que todos los experimentos se realizaron con el mismo lote de proteína):

- Primer comportamiento (pH 3.0): ArtJ se desnaturaliza irreversiblemente, sin embargo la proteína no se agrega visiblemente en la celda (no se determinó la presencia de agregados no visibles). Los espectros finales (a 20°C después de calentar la muestra) son consistentes con una proteína en solución pero sin estructura (figura 25). La T_m^{app} es de $62.4 \pm 0.3^\circ\text{C}$.

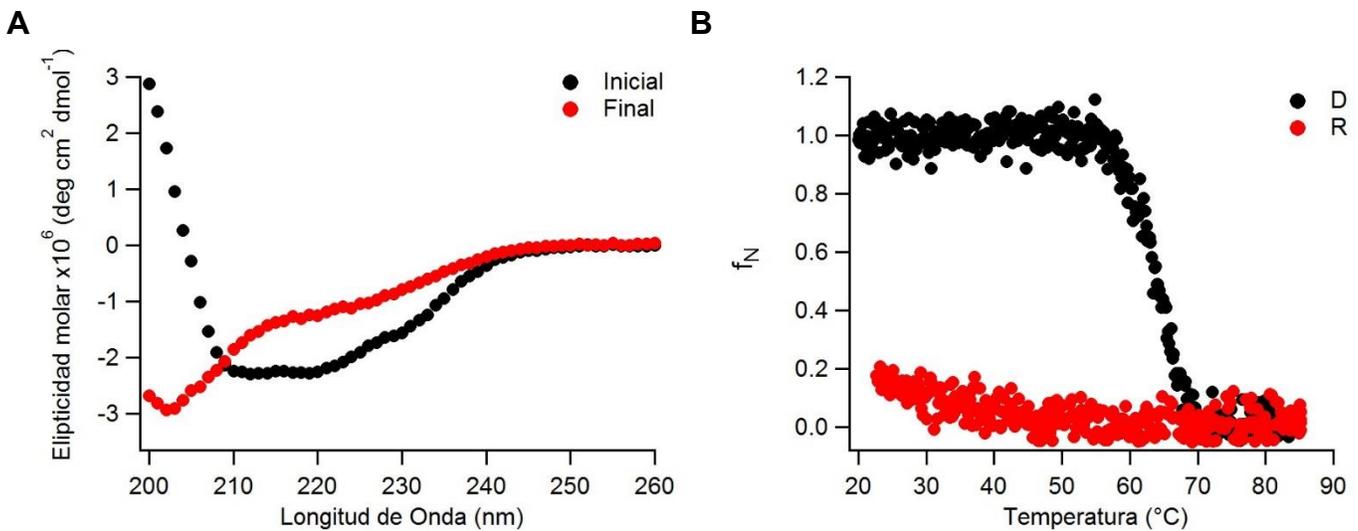


Figura 25. Espectros inicial, final (a 20°C después de calentar la muestra, **A**) y termograma normalizado (**B**) de ArtJ en 10 mM citrato pH 3.0 a una velocidad de barrido de 60 K hr⁻¹. **D** es abreviatura de desnaturalización; **R**, de renaturalización.

b) Segundo comportamiento (pH 4.0): La proteína no regresa al estado nativo y su termograma está muy poco definido, sin embargo tampoco se agrega en la celda y el espectro final aparenta presencia de estructura secundaria, pero esta transición no es cooperativa (figura 26). La T_m^{app} es de $79.5 \pm 2.1^\circ\text{C}$, con poca definición debido a la dispersión de

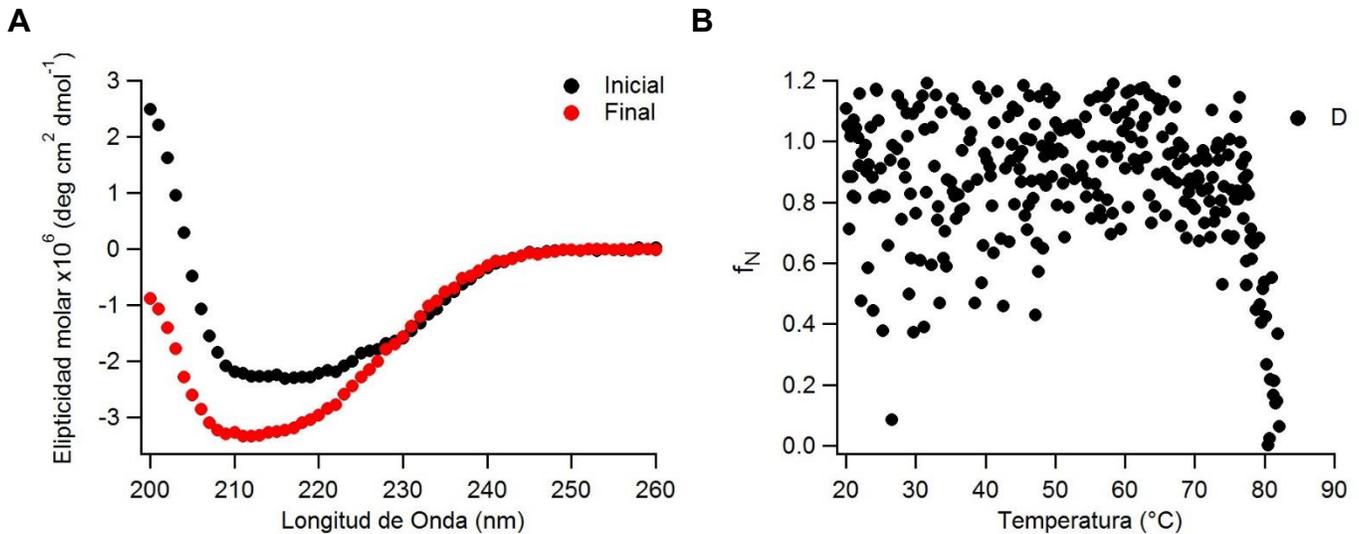


Figura 26. Espectros inicial, final (a 20°C después de calentar la muestra, **A**) y termograma normalizado (**B**) de ArtJ en 10 mM citrato pH 4.0 a una velocidad de barrido de 60 K hr^{-1} . **D** es abreviatura de desnaturalización. Nótese la alta dispersión de la señal de DC antes de la transición. No se muestra el termograma de renaturalización debido a que su normalización se sale de la escala, ya que la señal final es más negativa que la inicial.

c) Tercer comportamiento (pH 5.0 a 9.0, omitiendo el valor de 8.0): En todo este intervalo el desplegamiento es irreversible y se observa agregación en la celda (figura 27). La T_m^{app} promedio, del intervalo, es de $80.3 \pm 1.8^\circ\text{C}$.

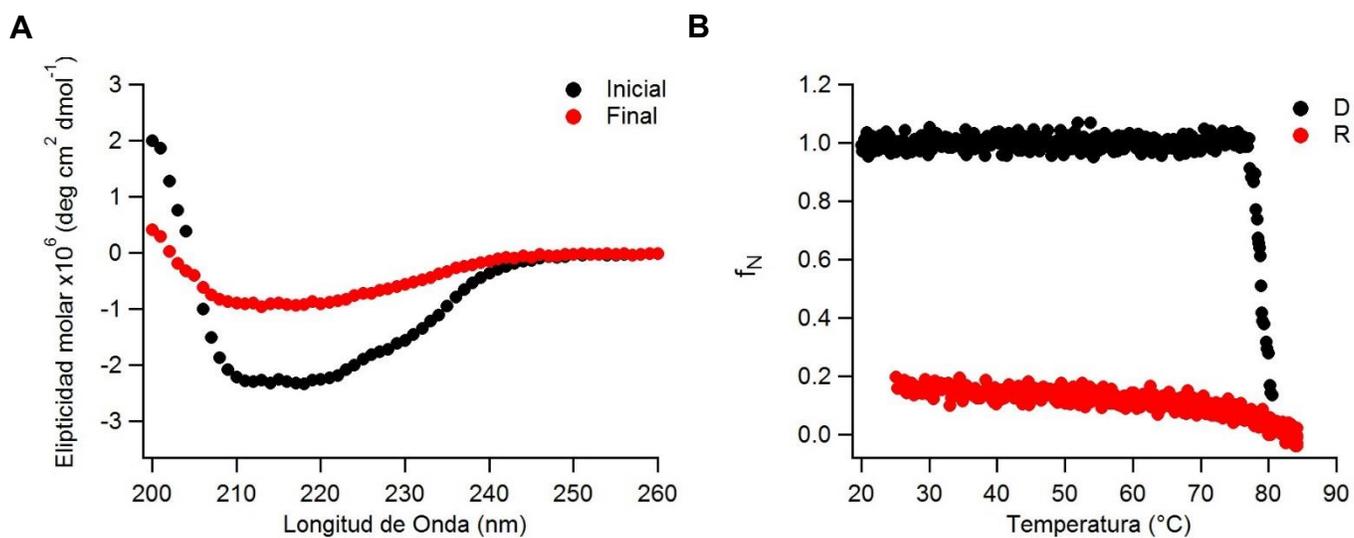


Figura 27. Espectros inicial, final (a 20°C después de calentar la muestra, **A**) y termograma normalizado (**B**) de ArtJ en 10 mM BTP pH 9.0 a una velocidad de barrido de 60 K hr⁻¹. **D** es abreviatura de desnaturalización; **R**, de renaturalización.

d) Cuarto comportamiento (pH 10.0): En esta condición sí se obtiene una transición reversible, que vuelve al estado inicial nativo, sin embargo, los termogramas obtenidos al calentar y al enfriar la muestra no se empalman (a una velocidad de calentamiento de 60 K hr⁻¹, no se realizaron experimentos variando esta velocidad). A este fenómeno se le conoce como histéresis (Lai *et al.*, 1997) y consecuencia de que el desplegamiento no es un proceso en equilibrio (figura 28). La T_m^{app} de desnaturalización es de $71.8 \pm 0.1^\circ\text{C}$ y de renaturalización es de $63.32 \pm 0.3^\circ\text{C}$.

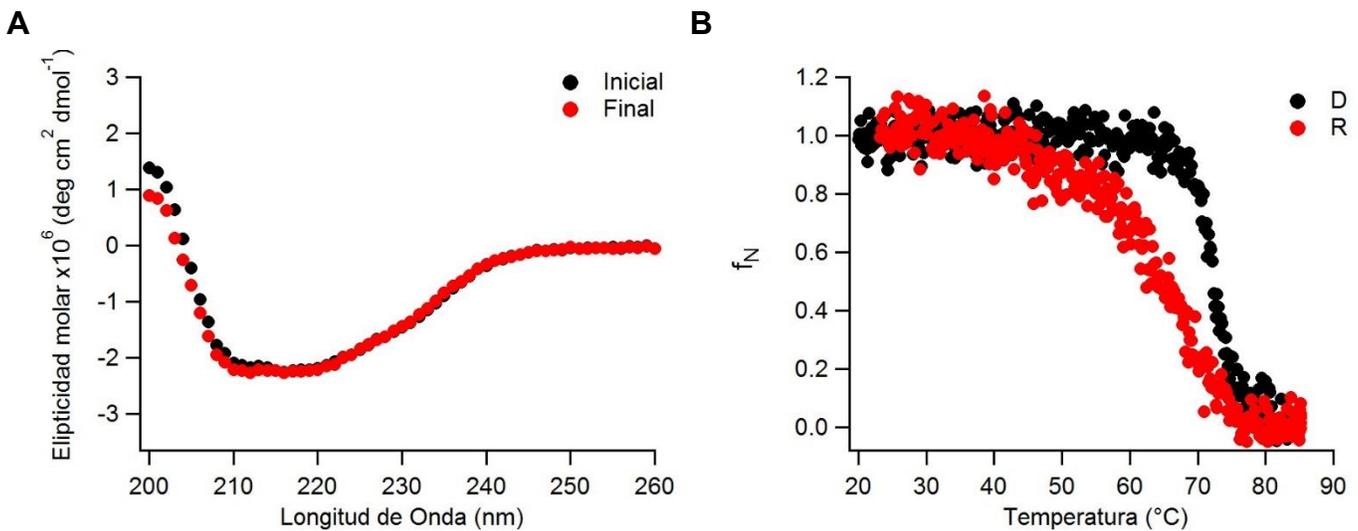


Figura 28. Espectros inicial, final (a 20°C después de calentar la muestra, **A**) y termograma normalizado (**B**) de ArtJ en 10 mM borato pH 10.0 a una velocidad de barrido de 60 K hr⁻¹. **D** significa desnaturalización; **R**, renaturalización.

Para finalizar, también se utilizó el DSC para evaluar la desnaturalización por temperatura de ArtJ. Se probaron dos valores de pH: 4.5 y 9.0, a 150 K hr⁻¹. Adicionalmente se ensayaron dos velocidades de barrido: 60 y 150 K hr⁻¹, a pH 4.5. Se puede observar en la figura 29 que ninguna de las condiciones afectó notablemente la endoterma. En todos los casos el desplegamiento fue irreversible. La T_m^{app} promedio de todas las condiciones es $81.4 \pm 0.20^\circ\text{C}$.

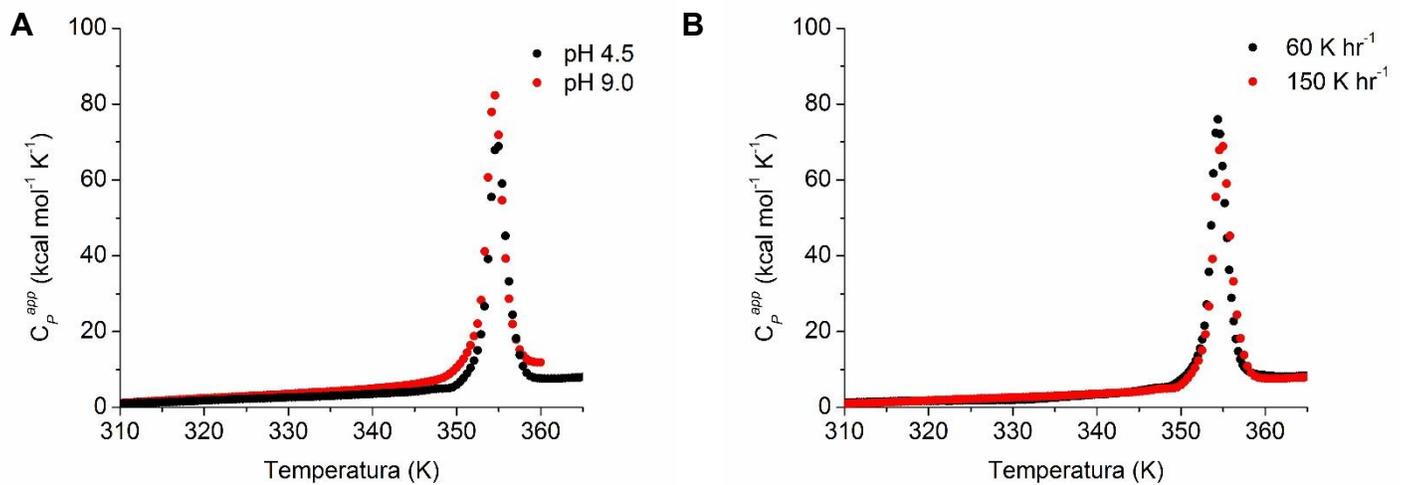


Figura 29. Desnaturalización térmica de ArtJ seguida por DSC en función del pH (**A**), a una velocidad de barrido de 150 K hr⁻¹ en 10 mM BTP pH 9.0 y 20 mM acetato de potasio pH 4.5; y como función de la velocidad de barrido (**B**) en 20 mM acetato de potasio pH 4.5 (todo a una concentración de 0.5 mg mL⁻¹ de proteína). En todos los experimentos se observó irreversibilidad.

Desplegamiento por agentes químicos.

Otro medio por el cual se evalúa el mecanismo de plegamiento y la estabilidad de la proteína es al someterla a agentes caotrópicos que a altas concentraciones abaten su estructura (Scholtz *et al.*, 2009). En este estudio se utilizaron urea y hidrocloreuro de guanidinio. Como la mejor reversibilidad térmica para HisJ es a pH 9.0, los experimentos se realizaron a este valor de pH. La misma condición se empleó para los ensayos de ArtJ, con el fin de comparar a ambas proteínas.

Tiempos de equilibrio y reversibilidad.

Primero se determinó el tiempo que tardan ambas proteínas en llegar al equilibrio, al mismo tiempo se evaluó su reversibilidad al realizar simultáneamente su desplegamiento y replegamiento, como se describe en métodos. Estos experimentos se realizaron en placas de 96 pozos, medidas en un lector de placas, ya que facilita su medición continua a diferentes tiempos de incubación.

En la figura 30 se observa la intensidad de fluorescencia total en función de la concentración de urea. Se puede observar que HisJ llega al equilibrio a las dos horas de incubación a 25°C y su desplegamiento es reversible. No se encontró un cambio a tiempos mayores de incubación, por lo tanto no se muestran.

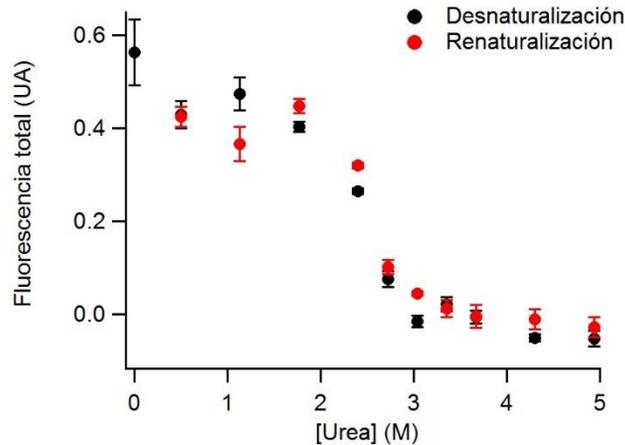


Figura 30. Fluorescencia total de HisJ en función de la concentración de urea después de una incubación de 2 horas a 25°C en 10 mM BTP pH 9.0.

Por otro lado, no se alcanzó a observar una postransición en la curva de ArtJ, a pesar de usar una concentración de 9 M de urea y aumentar el tiempo de incubación (figura 31). La reversibilidad no se determinó debido a la dificultad experimental de usar concentraciones mayores a 9 M de urea.

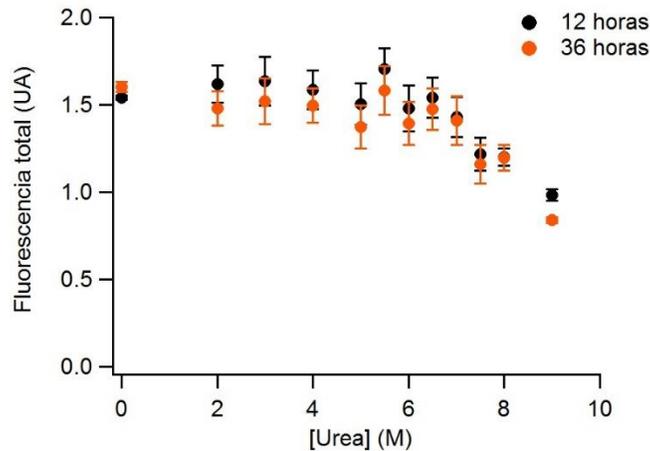


Figura 31. Fluorescencia total de ArtJ en función de la concentración de urea después de 12 y 36 horas de incubación a 25°C en 10 mM BTP pH 9.0.

Ya que la urea no logra desnaturalizar totalmente a ArtJ se realizaron los mismos experimentos con cloruro de guanidinio (GdnHCl). Se realizó también el ensayo con HisJ para poder comparar a ambas proteínas. Al igual que la urea, las curvas de desplegamiento y replegamiento se empalman desde las dos horas (figura 32). Sorprendentemente, el desplegamiento de ArtJ es reversible, se encuentra al equilibrio y no sufre histéresis, como en el desplegamiento térmico (figura 33).

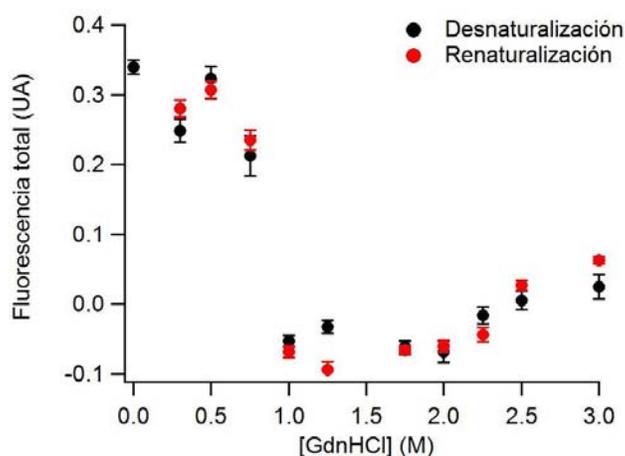


Figura 32. Fluorescencia total de HisJ en función de la concentración de GdnHCl después de una incubación de 2 horas a 25°C en 10 mM BTP pH 9.0.

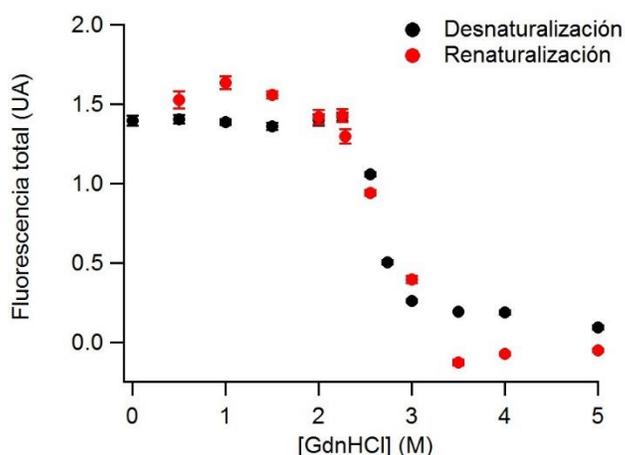


Figura 33. Fluorescencia total de ArtJ en función de la concentración de GdnHCl después de una incubación de 2 horas a 25°C en 10 mM BTP pH 9.0. No se notaron cambios a tiempos de incubación más largos.

Curvas de desplegamiento químico.

Ya que el tiempo de equilibrio y la reversibilidad del proceso fueron determinados en los experimentos previos, se procedió a medir las curvas de desplegamiento por urea para HisJ y por GdnHCl para HisJ y ArtJ, usando técnicas más precisas y aumentando el número de puntos en ella.

En la figura 34 se muestran los espectros de dicroísmo circular en el UV-lejano y fluorescencia, excitando a 280 y 295 nm en función de la concentración de urea para HisJ. De estos espectros se obtuvieron los valores de elipticidad a 222 nm y de fluorescencia a 325 nm, a ambas longitudes de onda de excitación. Al aumentar la concentración de urea la elipticidad y la intensidad de fluorescencia se acercan a cero gradualmente, lo que indica una pérdida de estructura secundaria y la exposición de los fluoróforos al agua. Estas curvas se pueden ajustar a la ecuación de Santoro-Bolen (ecuación 18), que asume un modelo de dos estados, sin necesidad de normalizar los datos. La proteína se comporta de manera similar al usar GdnHCl (figura 35). Los resultados de los ajustes en ambas condiciones se muestran en la tabla 7.

Como no se logró desplegar completamente a ArtJ en urea al no alcanzarse una postransición observable a muy altas concentraciones (9 M), sólo se pudo evaluar su curva de desnaturalización usando GdnHCl. De los espectros medidos se obtuvieron los valores de elipticidad a 222 nm y de fluorescencia a 336 nm, a 280 y 295 nm de excitación (figura 36). Como no se detectaron intermediarios, se ajustaron los datos de la misma manera que HisJ. Los datos de todas las curvas se exponen en la tabla 7.

HisJ Urea

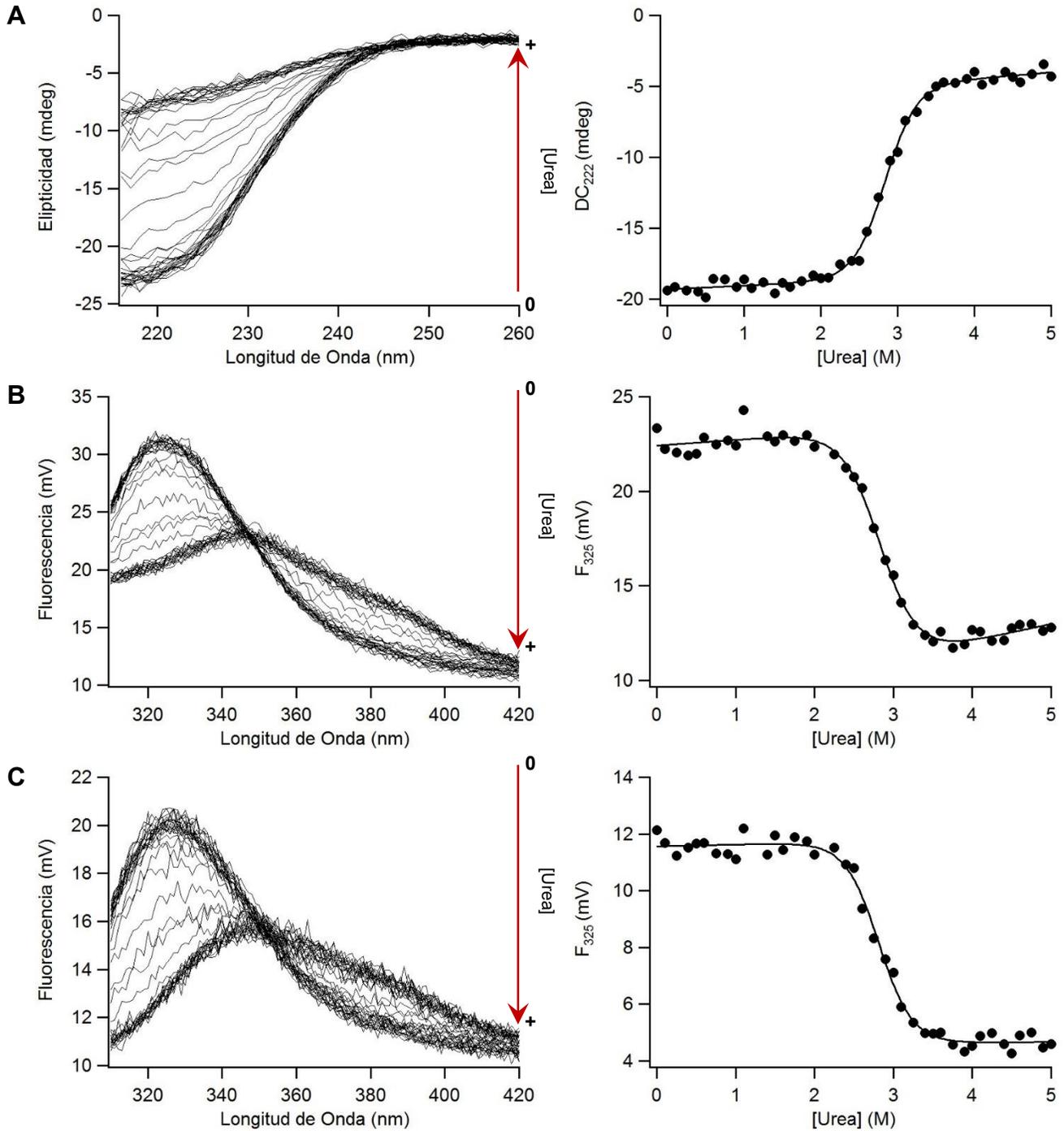


Figura 34. Espectros y curvas de desplegamiento de DC (**A**), y fluorescencia con una λ_{ex} de 280 (**B**) y 295 (**C**) nm de HisJ usando urea como desnaturizante. Los ensayos se realizaron a 25°C en 10 mM BTP pH 9.0. La flecha roja muestra la dirección del cambio en señal de 222 nm de DC o del máximo de intensidad de fluorescencia.

HisJ GdnHCl

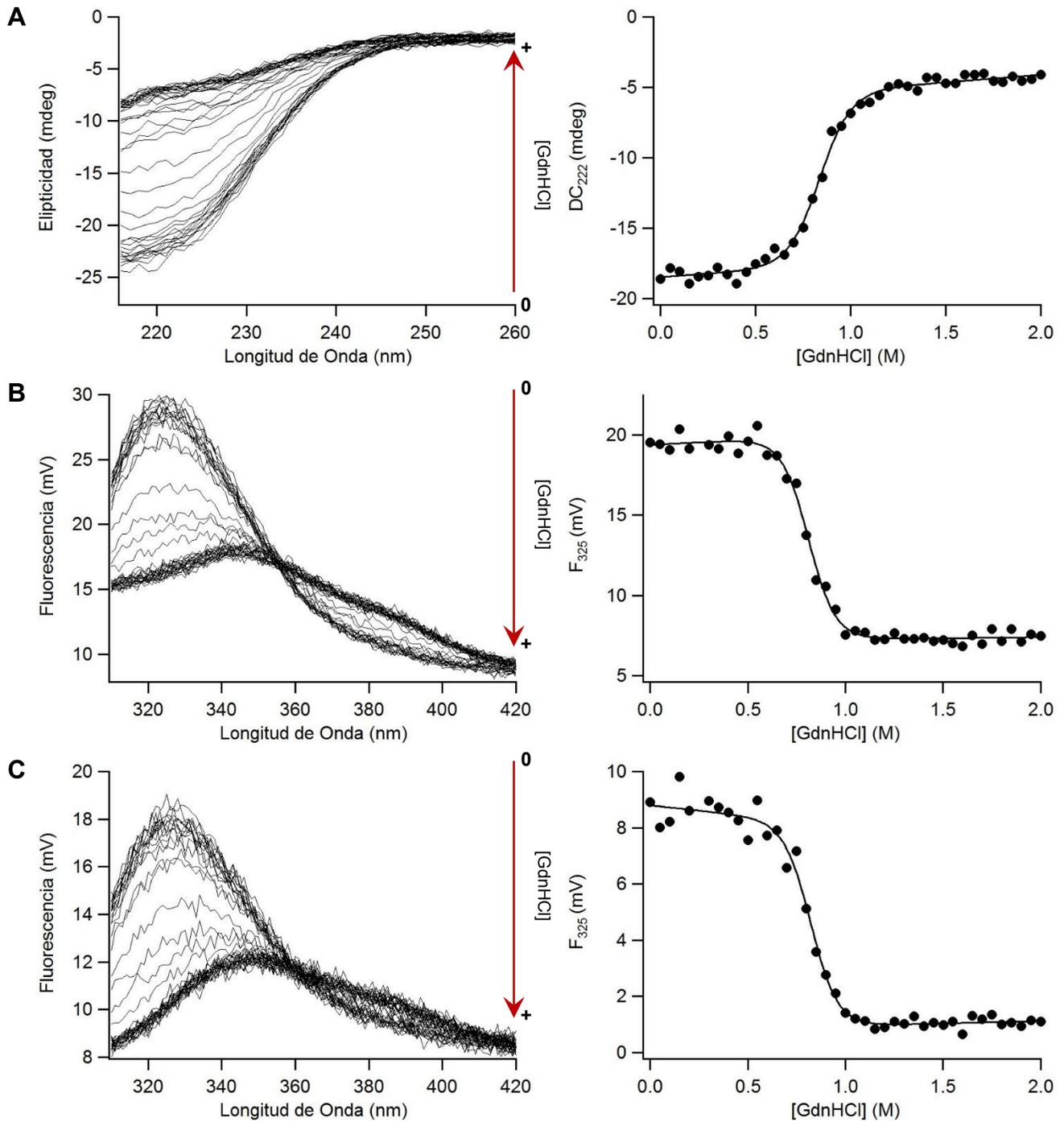


Figura 35. Espectros y curvas de desplegamiento de DC (**A**), y fluorescencia con una λ_{ex} de 280 (**B**) y 295 (**C**) nm de HisJ usando GdnHCl como desnaturalizante. Los ensayos se realizaron a 25°C en 10 mM BTP pH 9.0. La flecha roja muestra la dirección del cambio en señal de 222 nm de DC o del máximo de intensidad de fluorescencia.

ArtJ GdnHCl

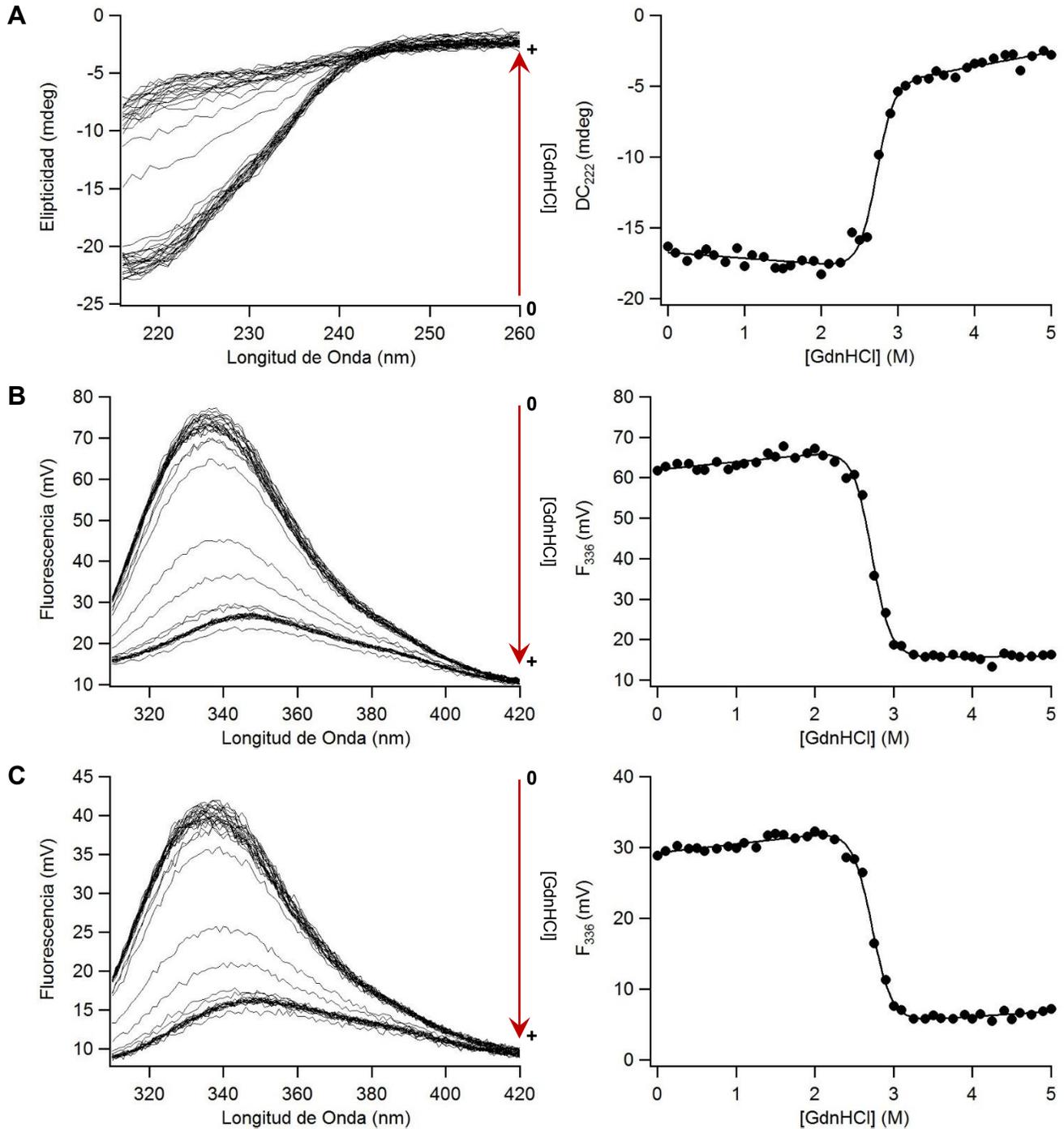


Figura 36. Espectros y curvas de desplegamiento de DC (**A**), y fluorescencia con una λ_{ex} de 280 (**B**) y 295 (**C**) nm de ArtJ usando GdnHCl como desnaturalizante. Los ensayos se realizaron a 25°C en 10 mM BTP pH 9.0. La flecha roja muestra la dirección del cambio en señal de 222 nm de DC o del máximo de intensidad de fluorescencia.

Tabla 7. Estabilidad química de HisJ y ArtJ.

HisJ - Urea				
	DC ₂₂₂	F λ_{ex} 280	F λ_{ex} 295	Promedio
ΔG_D (kcal mol ⁻¹)	8.28 ± 0.6	7.10 ± 0.7	7.85 ± 0.9	7.74 ± 0.8
m (kcal mol ⁻¹ M ⁻¹)	2.92 ± 0.2	2.50 ± 0.3	2.80 ± 0.3	2.74 ± 0.3
Cm (M) ^b	2.83	2.84	2.81	2.83 ± 0.01

HisJ - GdnHCl				
	DC ₂₂₂	F λ_{ex} 280	F λ_{ex} 295	Promedio
ΔG_D (kcal mol ⁻¹)	6.03 ± 0.6	7.01 ± 0.7	7.12 ± 1.1	6.72 ± 0.8
m (kcal mol ⁻¹ M ⁻¹)	7.20 ± 0.7	8.65 ± 0.9	8.64 ± 1.3	8.17 ± 1.0
Cm (M) ^b	0.84	0.81	0.83	0.82 ± 0.01

ArtJ - GdnHCl				
	DC ₂₂₂	F λ_{ex} 280	F λ_{ex} 295	Promedio
ΔG_D (kcal mol ⁻¹)	14.2 ± 1.6	13.5 ± 1.0	12.8 ± 0.8	13.5 ± 1.1
m (kcal mol ⁻¹ M ⁻¹)	5.25 ± 0.6	4.98 ± 0.4	4.70 ± 0.3	4.98 ± 0.4
Cm (M) ^b	2.72	2.72	2.72	2.72 ± 0.004

^a Valor ± desviación estándar obtenidos del ajuste a la ecuación de Santoro-Bolen (ecuación 18) de las curvas de desplegamiento químico (en 10 mM BTP pH 9.0).

^b La Cm se calculó de acuerdo a lo descrito en métodos.

Curva de estabilidad.

Con todos los resultados de la caracterización fisicoquímica del plegamiento de ArtJ e HisJ se construyeron sus curvas de estabilidad: el cambio en la energía libre de Gibbs de desplegamiento (ΔG_D) en función de la temperatura (figura 37). Ya que se requiere que el desplegamiento este en el equilibrio, solo es posible realizar esto con HisJ. Para la construcción de la curva de estabilidad se utilizó la ecuación de Gibbs-Helmholtz (ecuación 20). Los parámetros termodinámicos usados para su cálculo fueron el promedio de las endotermas a diferentes concentraciones de proteína. Para su comparación, se anexan en la gráfica los datos de ΔG_D de la transición seguidos por dicroísmo circular y los valores de ΔG_D obtenidos por la desnaturalización química (figura 37). La temperatura de máxima estabilidad es de 7.21 °C, con un ΔG_D de 8.51 kcal mol⁻¹ y la T_m de baja temperatura es -38 °C. La concordancia entre los valores de estabilidad provenientes de la desnaturalización térmica y los obtenidos por medio de agentes caotrópicos demuestra que la desplegamiento de HisJ sigue un modelo de dos estados.

En el caso de ArtJ no es posible construir una curva de estabilidad, ya que sufre una desnaturalización irreversible a pH 9.0. Sin embargo, se anexan los datos de estabilidad provenientes de la desnaturalización química y se señala la T_m^{app} (en rojo). La curva de estabilidad de LAO (Vergara, 2011) se añadió con fines comparativos. Todos los datos se obtuvieron en condiciones de 10 mM BTP pH 9.0.

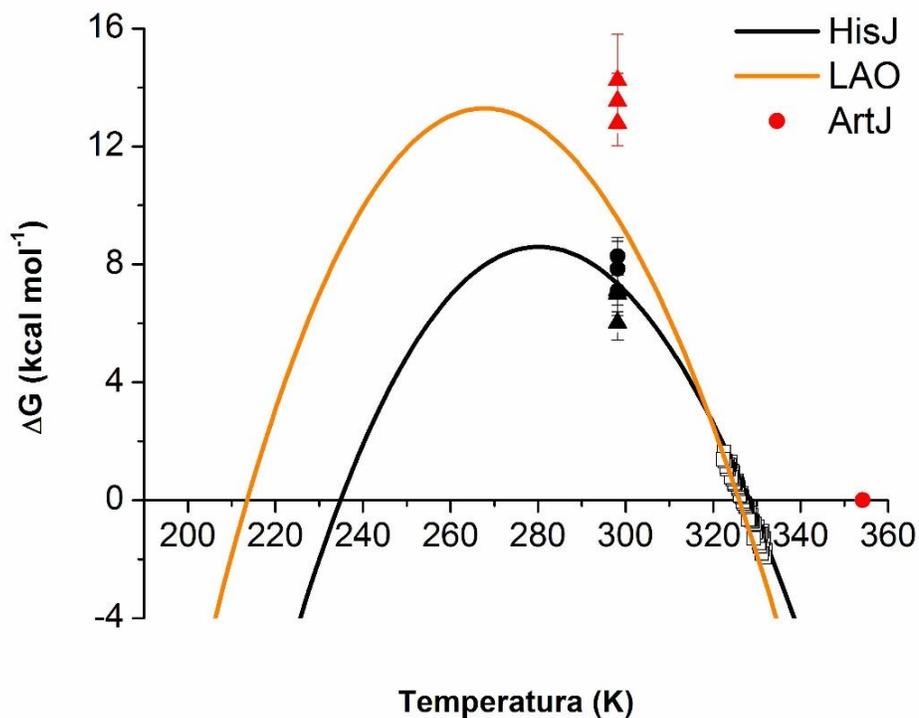
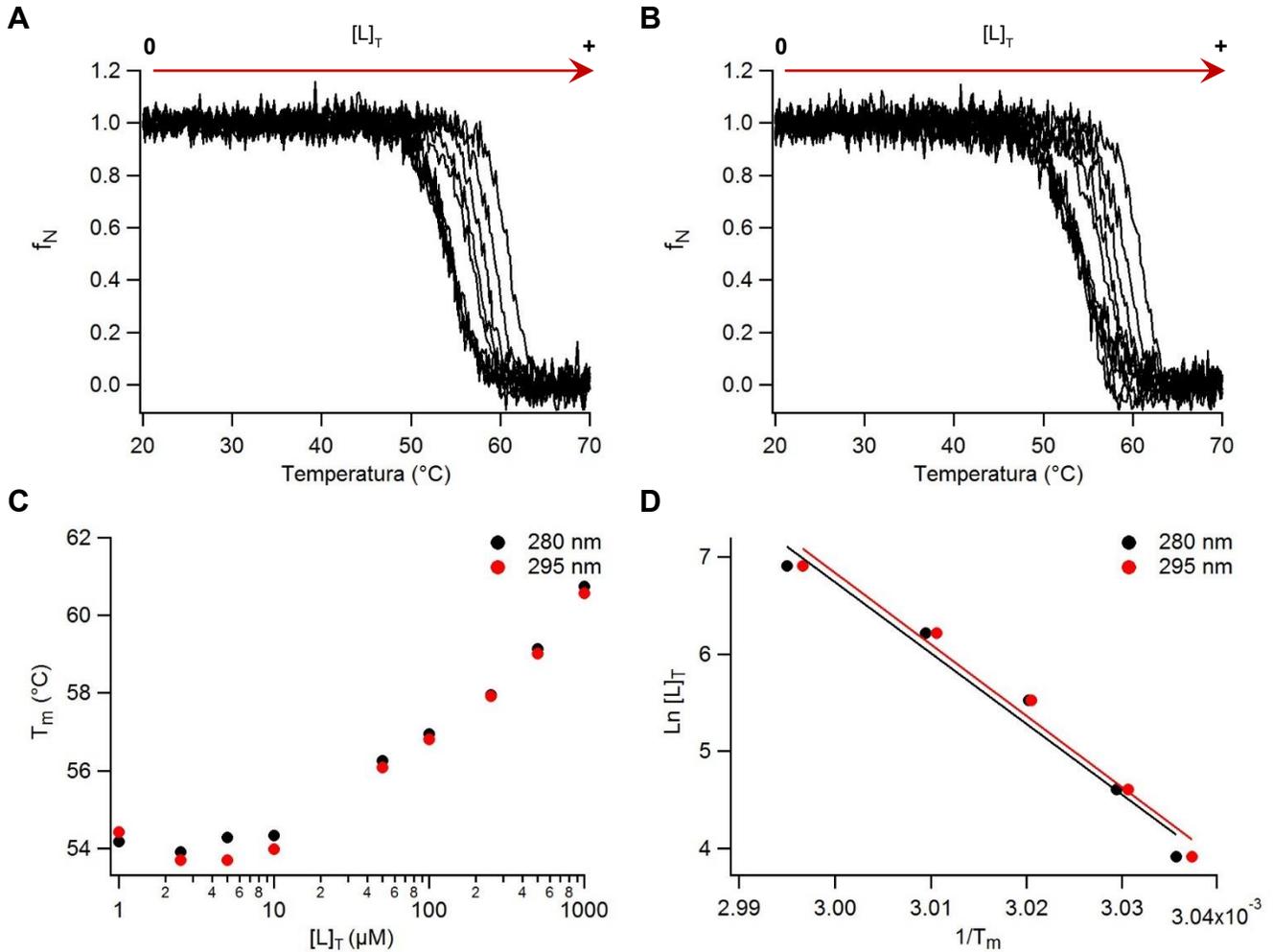


Figura 37. La curva de estabilidad fue construida usando los siguientes datos derivados de las endotermas en 10 mM BTP pH 9.0: ΔH_D (kcal mol^{-1}) = 114, T_m (K) = 328.1 (54.95°C), ΔC_{PD} ($\text{kcal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$) = 2.22. En cuadros vacíos se muestra la transición de las curvas de desnaturalización seguidas por dicroísmo circular. En símbolos se muestran los datos de ΔG_D derivados del desplegamiento químico (círculos para urea, triángulos para GdnHCl). En negro son los datos correspondientes a HisJ; en rojo, para ArtJ; y en naranja para LAO. La curva de estabilidad de LAO se calculó usando los datos reportados anteriormente en el laboratorio.

Acoplamiento unión-estabilidad.

En este punto la estabilidad, el plegamiento y la función de ArtJ e HisJ ya están caracterizadas, cada una por separado. Sin embargo, una pregunta interesante que surgió en el transcurso de este trabajo fue: ¿Cuáles son las repercusiones en la estabilidad de una proteína cuando une su ligando? Para responder esto, se realizaron experimentos de desnaturalización térmica seguida por fluorescencia en presencia de concentraciones crecientes de ligando y se analizaron de acuerdo a lo reportado por Sánchez Ruiz en 2007. Lamentablemente, en este tipo de análisis sólo es válida su aplicación para HisJ, ya que ArtJ no vuelve al estado nativo al desplegarla por temperatura a pH 9.0. Los termogramas en presencia de concentraciones crecientes (0 a 1000 μM) de ligando, así como también los gráficos de T_m contra $[L]_T$ y el gráfico de Sturtevant se presentan en la figura 38 y 39, para histidina y arginina respectivamente. Los resultados del ajuste a la ecuación 21 se recopilan en cada una de las figuras.

Antes de la sección de discusión se encuentra la tabla 8 que recopila los resultados más relevantes de este trabajo, con el fin de facilitar la búsqueda de éstos durante su interpretación.

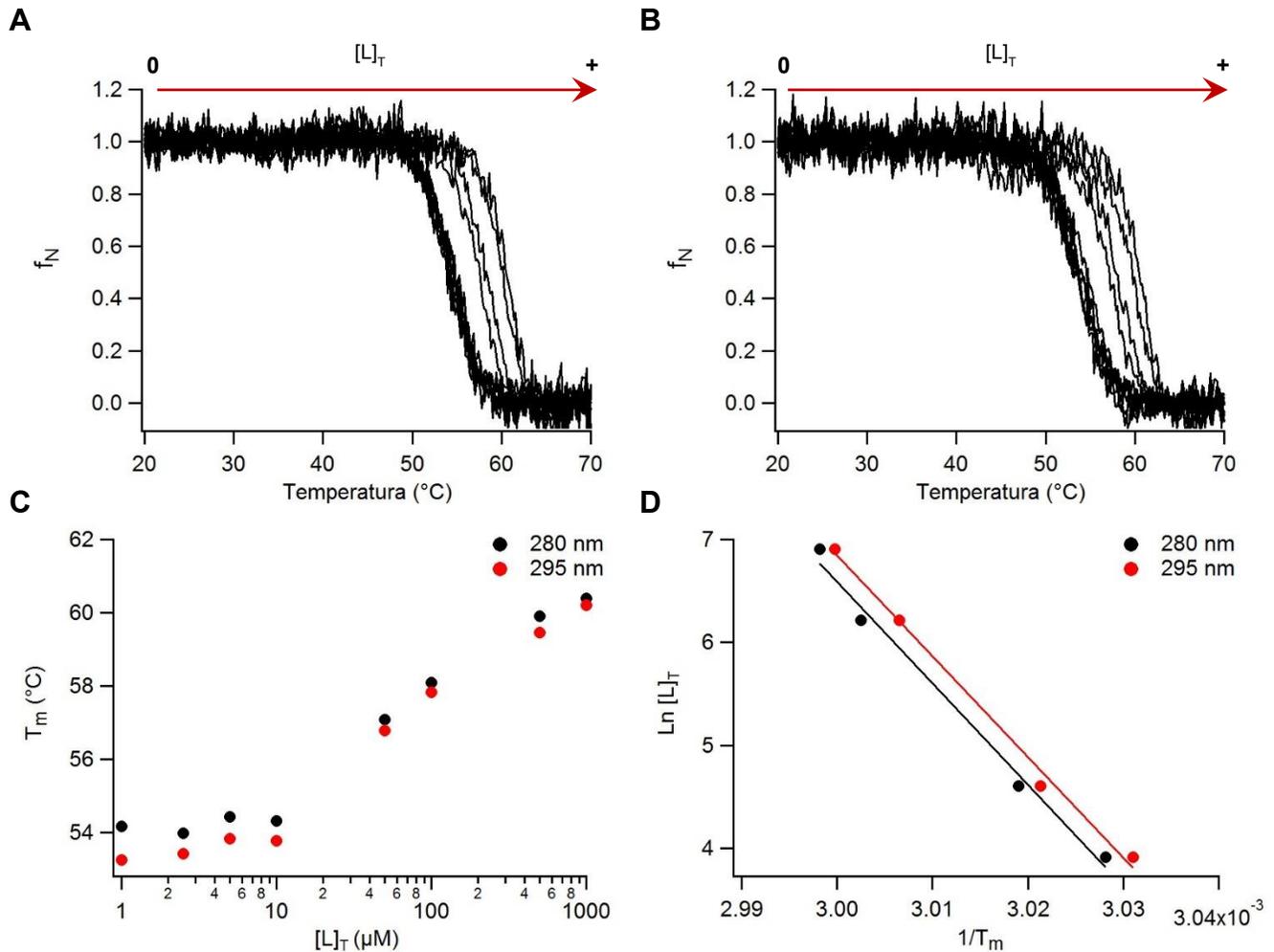


E

Tabla E. Efecto de la histidina en la estabilidad térmica de HisJ.

	F λ_{ex} 280	F λ_{ex} 295	Promedio	Sin ligando
ΔH_{NL} Histidina (kcal mol ⁻¹)	145 ± 15	146 ± 12	146 ± 14	110.8 ± 7

Figuras 38. Termogramas de HisJ en presencia de diferentes concentraciones de histidina seguidas por fluorescencia con una λ_{ex} de 280 (A) y 295 (B) nm a 25°C en 10 mM BTP pH 9.0. Se muestra también la T_m en función de la concentración de ligando total (C) y el gráfico de Sturtevant (D). Los resultados del análisis se muestran en la tabla E. Los datos de desplegamiento sin ligando se tomaron de los experimentos espectroscópicos (tabla 4).



E

Tabla E. Efecto de la arginina en la estabilidad térmica de HisJ.

	F λ_{ex} 280	F λ_{ex} 295	Promedio	Sin ligando
ΔH_{NL} Arginina (kcal mol ⁻¹)	195 ± 14	194 ± 11	195 ± 12	110.8 ± 7

Figuras 39. Termogramas de HisJ en presencia de diferentes concentraciones de arginina seguidas por fluorescencia con una λ_{ex} de 280 (A) y 295 (B) nm a 25°C en 10 mM BTP pH 9.0. Se muestra también la T_m en función de la concentración de ligando total (C) y el regráfico de Sturtevant (D). Los resultados del análisis se muestran en la tabla E. Los datos de desplegamiento sin ligando se tomaron de los experimentos espectroscópicos (tabla 4).

Tabla 8. Resumen de los datos más relevantes en este trabajo.

		HisJ ^a	ArtJ ^s	LAO ^a	Pág.
Expresión y purificación	Rendimiento (mg de proteína por litro de cultivo)	120	54	20	46
Contenido de estructura secundaria (DC/Estructura ^b)	Hélice α	39.8 \pm 1.0%/35.5%	29.8 \pm 0.8%/32.8%	-- ^d /37%	50
	Hebra β	14.0 \pm 0.5%/21%	19.0 \pm 0.3%/20.3%	-- ^d /19.3%	
	Otros ^c	44.3 \pm 0.7%/43.5%	53.8 \pm 0.9%/46.9%	-- ^d /43.7%	
Unión	Histidina (K _D , nM)	273 \pm 71	740 \pm 140/1631 \pm 509 ^e	2700 \pm 190	55
	Arginina (K _D , nM)	451 \pm 133	22.7 \pm 31/6.7 \pm 27 ^e	0.96 \pm 0.01	
Desplegamiento térmico pH 9.0 (DC y fluorescencia/DSC)	ΔH_D (kcal mol ⁻¹)	111 \pm 7/114 \pm 1	-- ^f	141.3 \pm 3.2/145.8 \pm 1	HisJ: 57/60 ArtJ: 63/64
	T _m (°C)	53.2 \pm 0.4 /55.0 \pm 0.3	80.3 \pm 1.8/81.4 \pm 0.2	53.75 \pm 0.2/52.8	
	ΔC_{PD} (kcal mol ⁻¹ K ⁻¹)	--/2.22 \pm 0.03	-- ^f	--/2.25 \pm 0.5	
Desplegamiento químico pH 9.0 (Urea/GdnHCl)	ΔG_D (kcal mol ⁻¹)	7.7 \pm 0.8/6.7 \pm 0.8	-- ^g /13.5 \pm 1.1	9.8 \pm 0.8/-- ^h	72
	m (kcal mol ⁻¹ M ⁻¹)	2.7 \pm 0.3/8.2 \pm 1.0	-- ^g /5.0 \pm 0.4	3.5 \pm 0.3/-- ^h	
	C _m (M)	2.8 \pm 0.01/0.8 \pm 0.01	-- ^g /2.7 \pm 0.004	2.8/-- ^h	
Acoplamiento unión-estabilidad	ΔH_{NL} His (kcal mol ⁻¹)	146 \pm 14	-- ⁱ	-- ^j	76-77
	ΔH_{NL} Arg (kcal mol ⁻¹)	195 \pm 12	-- ⁱ	-- ^j	

^a Los datos de unión y plegamiento se obtuvieron de Pulido *et al.*, 2014 y Vergara, 2011, respectivamente.

^b Las estructuras analizadas fueron 1HSL, 2Q2C y 1LAG, respectivamente. Todas corresponden al complejo proteína-histidina.

^c Otros corresponde a la suma de los porcentaje de giro β y sin estructura en el caso de la deconvolución de los espectros de DC.

^d No se reportan datos de deconvolución de los espectros de DC de LAO en la referencia anteriormente mencionada.

^e Los primeros datos corresponden a 25°C, los segundos a 60°C.

^f No fue posible obtener datos termodinámicos de desplegamiento térmico de ArtJ debido a su irreversibilidad a pH 9.0.

^g No se obtuvieron datos de desnaturalización química de ArtJ con urea debido a que no fue posible determinar una postransición.

^h No se realizaron ensayos de desplegamiento con GdnHCl en LAO en la referencia anteriormente mencionada.

ⁱ Debido a la irreversibilidad de la desnaturalización térmica de ArtJ a pH 9.0, no se obtuvieron datos de acoplamiento.

^j No se realizaron ensayos de acoplamiento en LAO en la referencia anteriormente mencionada.

Discusión.

En la actualidad, el entendimiento de la estructura, función, plegamiento y dinámica de las proteínas ha ganado un papel central en diversas líneas de investigación, desde cómo las proteínas permiten a los seres vivos llevar a cabo sus funciones fisiológicas, hasta su papel en enfermedades derivadas por la formación de cadenas fibrilares o mutaciones que inhabilitan su actividad o merman su estabilidad. Inclusive existen grupos de trabajo que tienen por objetivo diseñar nuevas topologías y nuevas actividades no observadas en la naturaleza, con fines biotecnológicos o médicos, ya que consideran que la información existente es suficiente para emprender esta tarea. Sin embargo, a pesar de todo este esfuerzo, siguen apareciendo casos que no han podido ser explicados bajo el paradigma actual: proteínas intrínsecamente desordenadas, priones y nuevos mecanismos de alosterismo y cooperatividad, etc (Dill *et al.*, 2012). Por lo tanto, sigue estando vigente la investigación básica de las proteínas, desde un enfoque bioquímico y fisicoquímico. Las dos más grandes preguntas que han y siguen siendo afrontadas son: ¿cómo una proteína obtiene su estructura terciaria a partir de la secuencia lineal? y ¿cómo esta estructura permite a la proteína tener y ejercer una función? Ambas preguntas han sido afrontadas tanto individual como conjuntamente.

Un elemento crucial y determinante en cualquier trabajo de investigación es el modelo de estudio, ya que los resultados, conclusiones y perspectivas que uno puede obtener de su proyecto dependen fuertemente de las características del modelo elegido. En el caso específico de este trabajo, los modelos de estudio fueron ArtJ e HisJ, dos proteínas monoméricas, compuestas por dos dominios, y relativamente pequeñas, en relación al universo proteico total, pertenecientes a la superfamilia de proteínas de unión a ligandos. Estas proteínas sufren un significativo y característico cambio conformacional al asociarse con aminoácidos básicos, sus ligandos naturales. Al elegirlos como modelos de estudio, nos permiten obtener conclusiones acerca de cómo puede variar la estabilidad, el plegamiento y la afinidad manteniendo una misma topología y una misma selectividad. Entonces las diferencias entre ambas proteínas se originan a partir de su secuencia, específica

para cada una, ya que refleja el ambiente y la historia evolutiva de sus organismos de origen. Conocer el alcance de la diversidad de las propiedades fisicoquímicas de una misma estructura que viene fuertemente ligada con una función nos permitirá entender más acerca del acoplamiento estructura-función, las implicaciones en su dinámica y sus mecanismos de acción, importantes para conocer su papel fisiológico. Además, este conocimiento podría utilizarse en un futuro en el diseño de nuevas selectividades y aumento de afinidades, con aplicaciones médicas o industriales.

Protocolo de expresión y purificación.

Con respecto a la estandarización de un nuevo protocolo de sobreexpresión y purificación de estas proteínas, a pesar de que ya existía un método previo en el laboratorio utilizado para la purificación de LAO, éste probó ser ineficiente e inadecuado para aislar las proteínas estudiadas en este trabajo. En el caso de ArtJ, aunque en el primer diseño del gen estaba incluido la presecuencia señal de LAO, que le permite a la maquinaria de translocación llevar a la proteína al periplasma, en ninguna condición probada se le localizó en este espacio celular. Mediante una búsqueda bibliográfica se encontró que además de una secuencia señal, otra condición necesaria para el transporte hacia el periplasma es la presencia de residuos con carga negativa o neutra en la región N-terminal de la proteína periplásmica madura (Auclair *et al.*, 2011). Lamentablemente, ArtJ posee tres lisinas (con carga positiva) en esta región, por lo que su translocación está impedida. Por lo tanto, se tuvo que modificar el método de sobreexpresión a uno citoplásmico, y en consecuencia, el protocolo de extracción y purificación. HisJ sí fue encontrada en el periplasma, y los primeros ensayos de purificación fueron exitosos; sin embargo, el rendimiento de purificación no era el ideal (aprox. 10 mg por litro de cultivo), y continuar el proyecto empleando este protocolo solo implicaría realizar varias purificaciones durante todo el proyecto. Lo más conveniente fue entonces replantearse toda la estrategia de purificación.

En la nueva metodología, ambos genes solo codifican a la proteína madura con su estructura funcional final, es decir, sin su presecuencia señal, en HisJ, o su largo N-

terminal de anclaje, en ArtJ. Con esto, ambas se quedarían en el citoplasma, y se tendrían que encontrar otros métodos para su extracción y aislamiento. Ésto no fue un paso limitante, ya que la lisis mecánica por medio de una prensa de French resultó efectiva para extraer a ambas proteínas. En su aislamiento, la precipitación selectiva por sulfato de amonio fue altamente efectiva. ArtJ e HisJ son altamente solubles, ya que se mantuvieron en suspensión aunque la solución estuviera al 80% de saturación. El resultado fue una solución clarificada y sin la mayoría de los contaminantes, en donde una cromatografía de intercambio aniónico solo terminaría de eliminar el ADN y otras impurezas que hubieran quedado después de la precipitación. En la cromatografía de HisJ se observó solo un pico (figura 12), que correspondía únicamente a ésta, y otro pico al limpiar la columna, que corresponde a ADN. Las pruebas de pureza (figura 14 y 15) demuestran que HisJ se encuentra pura y ningún paso adicional es requerido. ArtJ, en cambio, no interaccionó con la columna de intercambio aniónico (figura 13) a pesar de que la carga de la proteína debería ser negativa (el pI de esta es 7.70, y el amortiguador usado se encontraba a 9.0). Esto sugiere que el cálculo teórico del pI no se acerca al real, y si se quiere usar este tipo de cromatografía debe determinarse éste. Sin embargo, sí logro eliminar el ADN contaminante, y cambiar el amortiguador a 10 mM MES pH 6.0 y usar la cromatografía de intercambio catiónico (figura 13) fue suficiente para purificar la proteína, como lo demuestra la electroforesis y la exclusión molecular. Para su uso a corto y mediano plazo, almacenarlas en amortiguador de trabajo a 4°C probó ser suficiente. ArtJ sufría una ligera agregación con el paso del tiempo, pero la pérdida de proteína era mínima y no fue necesario agregar cosolutos para estabilizarla.

Espectros de DC y fluorescencia.

El siguiente paso para caracterizar a ArtJ e HisJ es medir sus espectros de dicroísmo circular, tanto en UV lejano como cercano, y fluorescencia, excitando a 280 y 295 nm, como una prueba para determinar si las proteínas tienen estructura en condiciones *in vitro*. Ambas proteínas tienen espectros de DC y fluorescencia congruentes con proteínas bien plegadas, pero las diferencias entre ambas

empezaron a aparecer. En DC, HisJ tiene una señal de mayor intensidad (27% a 222 nm y 50% a 210 nm) que a ArtJ, a pesar de que cristalográficamente tengan la misma topología, pero en el UV cercano el comportamiento es el contrario, ArtJ tiene una mayor señal (figura 16). La deconvolución de sus espectros explica el primer caso: HisJ tiene más porcentaje de hélices alfa (que son las que más contribuyen a la señal de dicroísmo), mientras que ArtJ domina en las hebras beta y asas sin estructura. Comparando la deconvolución con el contenido de estructura secundaria de la estructura cristalográfica, ArtJ no muestra diferencias significativas, pero el contenido de hebras β de HisJ difiere significativamente (tabla 2). Si se toma en cuenta que la estructura es del complejo, y el espectro se determinó con la proteína libre, es factible concluir que la unión del ligando provoca que se estructure HisJ, adicionalmente al cambio conformacional de abierto a cerrado. Se han reportado preferencia por cierta estructura secundaria en proteínas termófilas, como una de tantas estrategias para aumentar la estabilidad (Petsko, 2001, Razvi *et al.*, 2006), lo que podría ser el caso con ArtJ. En UV cercano (figura 16), ArtJ tiene dos triptófanos en su secuencia mientras que HisJ sólo tiene uno, lo que explica el doble de señal a 274 nm con respecto a ArtJ.

La fluorescencia también separa a ambas proteínas: ArtJ tiene una mayor intensidad en las dos longitudes de excitación usadas (figura 17). Una vez más, la presencia de dos triptófanos en esta a comparación de uno en HisJ explica este resultado. Lo que no explica es la diferencia en el máximo de intensidad, 325 en HisJ y 336 nm en ArtJ. La fluorescencia de una proteína depende fuertemente de donde se localizan los fluoróforos en su estructura. Generalmente en las proteínas globulares los residuos hidrofóbicos se encuentran en el núcleo hidrofóbico, y por lo tanto su máximo de intensidad está alrededor de 320 nm. En solución, el triptófano, que es el principal responsable de la fluorescencia (en segundo lugar la tirosina), tiene ese máximo a 350 nm (Vivian & Callis, 2001). Puede concluirse con seguridad que HisJ se encuentra plegada, con sus fluoróforos ocultos al solvente. Aunque podría pensarse que ArtJ está parcialmente desplegada, la localización de sus triptófanos explica el máximo de 336 nm. Los dos están en la interfaz de los lóbulos, de hecho, uno de ellos participa activamente en el sitio de unión (figura 10 y 11;

Vahedi-Faridi, 2008). Si uno considera que en la conformación abierta los dominios están alejados uno del otro, entonces ambos estarían parcialmente expuestos al solvente, y su máximo será más cercano al del triptófano en solución. La conclusión de estos resultados es que ambas proteínas están plegadas en las condiciones *in vitro* en las que se encuentran.

Caracterización de la unión.

El experimento definitivo para saber que ambas proteínas adoptan su estado nativo, y por lo tanto funcional, en las condiciones experimentales que requerimos para caracterizarlas es si cumplen su función: unir con alta afinidad aminoácidos básicos, específicamente histidina y arginina. Las titulaciones seguidas por fluorescencia a 25°C realizadas con estos ligandos muestran que, en efecto, HisJ y ArtJ pueden unirlos *in vitro* (figuras 18 a 20). HisJ presenta un aumento en fluorescencia en presencia de ambos, sugiriendo que durante el cambio conformacional al estado cerrado cambia el ambiente local del triptófano 130 (ubicado en el lóbulo discontinuo). Si uno compara la estructura abierta (resuelta por NMR, PDB: 2M8C) con la estructura del complejo HisJ-histidina (resuelta por cristalografía de rayos X, PDB: 1HSL) se puede ver que la histidina 129, un residuo con carga que apaga la fluorescencia, se aleja del triptófano a pasar de una conformación abierta a cerrada. Este aumento gradual de fluorescencia termina cuando todos los sitios de unión han sido ocupados. Después de tomar el valor de intensidad a 325 nm y normalizarlo a fracción de complejo formado, el análisis de las titulaciones de HisJ dio una constante de disociación de 273 ± 71 nM para histidina y 451 ± 144 nM para arginina. La afinidad ya se considera alta al estar estos valores en el rango nanomolar, y concuerdan bien con constantes anteriormente determinadas por diálisis al equilibrio (40 nM para histidina, 700 nM para arginina; Oh *et al*, 1994). Las diferencias pueden deberse al uso de diferentes técnicas o condiciones experimentales. La estequiometría en todos los casos es cercana a 1.0, lo esperado para HisJ.

Las titulaciones de ArtJ no se asemejan a las de HisJ. Primero, la intensidad de fluorescencia disminuye en lugar de aumentar, y el máximo se recorre ligeramente hacia longitudes de onda menores (de 336 a 334 nm). Si tomamos en cuenta la ubicación de sus triptófanos (ambos en la interface del sitio de unión), la disminución de intensidad se explica por el apagamiento del triptófano involucrado en la unión del ligando, y el cambio en el máximo al ocultamiento de ambos residuos del solvente al pasar la proteína a la conformación cerrada. Lo inesperado fue que la proteína se agrega en la celda en presencia de ligando, resultando en una saturación prematura de la señal y en todos los casos una estequiometría de, en promedio 0.50 ± 0.1 . En el estudio donde se reporta la estructura cristalográfica de esta proteína también se menciona que la afinidad no pudo ser medida satisfactoriamente, debido también a una baja estequiometría (Vahedi-Faridi *et al.*, 2008). La proteína LAO cambia su pI en presencia de ligando, observado por un cambio en su perfil de elución en cromatografía de intercambio aniónico (Oh *et al.*, 1993). Posiblemente también ArtJ sufra cambios en su pI u otras de sus propiedades al unir sus ligandos y se favorezca su agregación. Sin embargo, puede calcularse una K_D^{app} de 740 ± 140 nM para histidina, 22.7 ± 31 nM para arginina, lo que concuerda con un reporte previo (420 nM para histidina, 39 nM para arginina; Vahedi-Faridi *et al.*, 2008), y es esperado para esta proteína que está involucrada en el transporte de arginina. Cabe señalar que las limitaciones técnicas del método de análisis no permiten resolver con poca incertidumbre K_D^{app} con valores muy bajos. Como ArtJ proviene de *B. stearothermophilus*, un organismo termófilo, se realizaron las mismas titulaciones a 60°C . La proteína sigue presentando agregación al unir su ligando, sin embargo, su afinidad aparente por histidina disminuye ($K_D^{app} = 1631 \pm 509$ nM) pero por arginina aumenta ($K_D^{app} = 6.7 \pm 27$ nM). El aumento de afinidad por arginina al elevar la temperatura sugiere que la unión es un proceso endotérmico. Aunque son constantes aparentes, es claro que posee una alta afinidad por sus ligandos, comparable con el de LAO (2700 nM para histidina, 0.96 nM para arginina; Pulido *et al.*, 2014) e HisJ. Esto es a pesar de que trabajan en condiciones muy diferentes en la naturaleza, sus secuencias son muy disímiles y se asocian de forma diferente a la membrana de sus organismos de origen.

Desplegamiento térmico.

Ya que se comprobó que ambas proteínas cumplen su función y por lo tanto se encuentran en su estado nativo en condiciones *in vitro*, es posible proseguir con la caracterización termodinámica de su plegamiento y su estabilidad. El primer desnaturalizante probado fue la temperatura. Se tratarán a las proteínas por separado y posteriormente se harán las comparaciones pertinentes. La existencia de un reporte previo sobre la desnaturalización térmica de HisJ, usando DSC (Kreimer *et al.*, 2008), donde una de las conclusiones es que el proceso de desplegamiento se describe por un modelo de tres estados, hizo prever que en este proyecto los resultados serían similares. En el modelo propuesto, cada lóbulo se despliega de forma independiente, con diferentes valores de T_m y ΔH_{cal} . Sin embargo, este modelo es una suposición dada la estructura de HisJ, sin que se descartara experimentalmente un proceso de dos estados, en el que ambos lóbulos pierden su estructura simultáneamente.

En los experimentos de desplegamiento térmico registrado por DC (UV lejano y cercano) y fluorescencia se observó que tanto la desnaturalización como la renaturalización siguen un proceso de dos estados reversible y al equilibrio (figura 21). En ningún termograma se detecta la presencia de algún intermediario, la transición es totalmente cooperativa y lineal, y todas las curvas normalizadas se sobrelapan, lo que no se espera si el desplegamiento de ambos lóbulos fuera independientes. Además, también se realizaron experimentos de DSC, y el ajuste a dos estados puede explicar completamente las endotermas obtenidas (figura 24A). Como última prueba de que HisJ sigue un plegamiento de dos estados, el criterio calorimétrico, el cociente entre el ΔH_{vh} (proveniente de los experimentos de DC) y el ΔH_{cal} (proveniente de los experimentos de DSC), es de 0.97, probando definitivamente que un modelo de dos estados es suficiente para explicar este proceso.

Habiendo comprobado, contrario al estudio previo, que HisJ sufre una desnaturalización ausente de intermediarios, lo siguiente fue determinar los parámetros termodinámicos que describen. La T_m a pH 9.0 que se obtiene por los

experimentos espectroscópicos y DSC concuerdan: 53.24 ± 0.40 y $55.0 \pm 0.3^\circ\text{C}$, respectivamente, y es similar a la T_m de LAO, 53.60°C . La T_m aumenta ($56.40 \pm 0.1^\circ\text{C}$) si se hacen los mismos experimentos a pH 8.0, pero la reversibilidad disminuye (de 90 a 76%), de forma similar a LAO (figura 22; Vergara, 2011). Esto es de esperarse ya que ambas pertenecen a organismos mesófilos y relacionados filogenéticamente. También era de esperarse que la velocidad de barrido (Figura 23) y la concentración de proteína (figura 24B) no sean variables que afecten el proceso, ya que HisJ es monomérica y su desplegamiento es reversible. Lo mismo no se puede decir del ΔH_D . El ΔH_D para HisJ es de 111 ± 7 y $114 \pm 1 \text{ kcal mol}^{-1}$ (ΔH_{vh} y de ΔH_{cal} , respectivamente) mientras que el de LAO es de $141 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Vergara, 2011). Esta gran diferencia implica que al desplegarse HisJ se rompen menos interacciones no covalentes comparado con LAO, sugiriendo que, aunque compartan la misma topología, la forma de mantenerla las distingue y por lo tanto, la estabilidad (reflejada en el ΔG_D) será menor para HisJ, algo que es sugerido por los espectros de DC. Sin embargo, el ΔC_{PD} de ambas es el mismo: $2.21 \pm 0.03 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ para HisJ y $2.23 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ para LAO. Este parámetro depende de la cantidad de superficie que se expone al desplegarse la proteína, así como la presencia o no de estructura secundaria en el estado desplegado. Ya que ambas proteínas comparten la topología, es factible suponer que ambas exponen la misma cantidad de superficie al desplegarse o que el estado final al que llegan es el mismo.

Por segunda ocasión, ArtJ se aleja de sus homólogas, al ser su desnaturalización térmica irreversible (figura 25 a 28) y sufrir agregación en las mismas condiciones que HisJ, pero con una T_m^{app} de $80.29 \pm 1.8^\circ\text{C}$, que es congruente con una proteína termófila, lo que implica que no es un artefacto del entorno *in vitro*. Buscando una condición donde se pudiera realizar una descripción termodinámica, se varió el pH en un rango de 3.0 a 10.0, omitiendo el 8.0 debido a su cercanía con el pl. La primera observación es que ningún valor de pH tiene un efecto en el espectro de DC inicial, pero se encontraron comportamientos inesperados en el desplegamiento. A pH 3.0, la pérdida de estructura sigue siendo irreversible, con una T_m^{app} de $62.37 \pm 0.3^\circ\text{C}$, pero no hay agregados visibles y el espectro de DC final se asemeja al de una proteína sin estructura. A pH 4.0 sigue sin presentarse agregación (T_m^{app} de 79.47

$\pm 2.1^{\circ}\text{C}$), pero ahora el espectro final tiene otra forma, congruente con un estado con estructura secundaria, pero no igual al estado nativo. Estos dos comportamientos parecen indicar la presencia de estados alternativos al nativo que pueden ser poblados significativamente a pH bajo. Existe un reporte de que varias PUL pueden poblar un estado de glóbulo fundido a bajo pH, y aun así mantener un sitio de unión lo suficientemente estructurado como para reconocer sus ligandos y presentan un desplegamiento cooperativo (Prajapati *et al.*, 2007). Estas observaciones pueden explicar el singular comportamiento de ArtJ a pH bajo, permitiéndole adoptar otras conformaciones estables ajenas a la nativa. En el rango de pH 5.0 a 9.0, ArtJ se agrega al aumentar la temperatura, como se observa en el espectro final (donde la intensidad de la señal disminuye con respecto al espectro inicial) y la T_m^{app} anteriormente mencionada.

Donde se encontró la mayor sorpresa fue a pH 10.0 (figura 28). El desplegamiento térmico fue reversible y se recuperó el espectro inicial de DC. Lamentablemente, al observar la renaturalización, se observa que las curvas no se empalman. A este fenómeno se le conoce como histéresis, y se presenta cuando el proceso no se encuentra al equilibrio, ya que la “historia” pasada de la proteína determina su comportamiento futuro. Por lo tanto, no es posible caracterizar termodinámicamente el desplegamiento de esta proteína.

Las condiciones probadas (pH 4.5 y 9.0; 60 y 150 K hr^{-1}) por DSC no muestran efecto en la T_m . Esto sugiere que la proteína se agrega de igual manera en todas las condiciones (figura 29). En conclusión, no es posible caracterizar el desplegamiento termodinámico de ArtJ debido a que no es reversible o no se encuentra al equilibrio. Esto sugiere que el mantenimiento de la estructura de ArtJ proviene de una estabilidad cinética (Sanchez-Ruiz, 2010).

Desnaturalización química.

El uso de diferentes perturbadores de la estructura es una estrategia útil para discernir entre diferentes mecanismos de plegamiento en una proteína, al verificar si los parámetros termodinámicos obtenidos son similares independientemente del

agente usado. La urea y el GdnHCl son caotrópicos químicos que irrumpen la estabilidad del estado nativo modificando su capa de solvatación al interactuar con el agua, haciendo favorable la exposición de residuos hidrofóbicos. Además también forman puentes de hidrógeno con la cadena principal de la proteína (Scholtz *et al.*, 2009).

El primer paso a realizar para caracterizar el desplegamiento químico es determinar la reversibilidad y el tiempo de equilibrio. Este último se refiere al tiempo que le toma al proceso llegar al equilibrio y se evalúa al comparar que los valores de las curvas de desnaturalización y renaturalización tengan los mismos valores. Al usar urea, el desplegamiento de HisJ es un proceso reversible y toma dos horas en llegar al equilibrio, a 25 °C (figura 30). Este comportamiento era esperado dada su semejanza con LAO. Lamentablemente, no fue posible medir completamente la curva de ArtJ, ya que aunque se utilizaron concentraciones de hasta 9 M de urea, no se logró definir una postransición (figura 31), en donde toda la proteína se encuentra en un estado desplegado. El límite de solubilidad de la urea (10.5 M a 25 °C) dificulta la caracterización del desplegamiento químico de ArtJ.

En consecuencia, el siguiente agente caotrópico probado fue el GdnHCl, más efectivo que la urea. Para poder hacer comparaciones entre ArtJ e HisJ, se probó este desnaturalizante en las dos proteínas. HisJ sigue mostrando un proceso reversible y llega al equilibrio en 2 horas (figura 32). Sorprendentemente, ArtJ también se despliega de forma reversible, y se encuentra al equilibrio después de 2 horas de incubación a 25°C (figura 33). No se observa histéresis, algo observado en su desplegamiento térmico y en otras proteínas termófilas (Feller, 2010).

Con esta información, es posible construir curvas de desnaturalización con un número mayor de puntos y midiendo espectros completos de DC y fluorescencia (a ambas λ_{ex}). Con urea, el ajuste de las curvas de todos los espectros a un modelo de dos estados da los siguientes valores promedio: ΔG_D de 7.74 ± 0.8 kcal mol⁻¹, m de 2.7 ± 0.3 kcal mol⁻¹ M⁻¹ y la C_m de 2.83 ± 0.1 M (figura 34; Tabla 6). Estos datos siguen reflejando la menor estabilidad de HisJ comparada con LAO, que tiene un ΔG_D de 9.8 kcal mol⁻¹. El parámetro m de LAO, 3.45 kcal mol⁻¹ M⁻¹ también es mayor

que el de HisJ (la C_m se mantiene igual). Este parámetro m se correlaciona directamente con la superficie (ASA) que se expone al pasar del estado nativo al desnaturalizado. Uno podría entonces pensar que se expone menos área en el estado desplegado de HisJ comparado con LAO, sin embargo, el ΔC_{PD} de ambas es similar, y éste también depende de la naturaleza del estado desnaturalizado (aunque cabe aclarar que se determinan usando diferentes métodos de desplegamiento). La otra posibilidad es que las diferencias se encuentren en el estado nativo, a pesar de que en la estructura cristalográfica reportada no haya diferencias significativas en la cadena principal (RMSD de 1.2 Å). Otras pruebas que soportan esta opción es la diferencia en el ΔH_D y su ΔG_D , ambos parámetros dependiente (aunque no exclusivamente) del estado nativo. En conclusión, los estados nativos, en las condiciones experimentales de este trabajo, son diferentes, aunque mantienen la misma topología y función.

Al usar GdnHCl, todos los parámetros de HisJ cambian con respecto a los calculados con urea (figura 35; tabla 6). La C_m menor a la de urea se debe a que este desnaturalizante es más efectivo. La disminución en el ΔG_D (el $\Delta\Delta G_D$, GdnHCl menos urea, es de $-1.02 \text{ kcal mol}^{-1}$) y el significativo aumento en la m (Δm de $5.43 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$) se explican con el mecanismo de acción de este. Además de su efecto similar a la urea, el GdnHCl tiene una carga neta positiva, permitiéndole llevar a cabo un mayor número de interacciones con el solvente y la proteína. Está reportado que los parámetros obtenidos de su uso no concuerdan perfectamente con los derivados de otros agentes como la urea o la temperatura (Myers *et al.*, 1995), debido a que varios efectos se adicionan y la linealidad del parámetro m no se mantiene. No se han realizado curvas de desplegamiento usando GdnHCl con LAO, pero se espera que el mismo comportamiento se mantenga.

La desnaturalización química de ArtJ solo pudo estudiarse usando GdnHCl (figura 36; Tabla 6). Como era esperado dado su origen, el ΔG_D de este es mayor que el de LAO e HisJ ($13.5 \pm 1 \text{ kcal mol}^{-1}$) a la misma temperatura (25°C). Curiosamente, el parámetro m de ArtJ es considerablemente menor que el de HisJ (5.0 ± 0.4 comparado con $8.17 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$). Manteniendo la misma interpretación de este

parámetro, esta observación sugiere que el estado nativo es diferente entre las dos proteínas. Las diferencias en los espectros de DC también indican que los estados nativos son diferentes. Sin embargo, ya que no fue posible determinar un ΔC_{PD} para ArtJ, no se puede descartar si estas diferencias también se encuentran en el estado desnaturalizado. Además, ArtJ es una proteína básica (pI de 7.70), por lo que la carga positiva del GdnHCl no tiene el mismo efecto en éste comparado con HisJ.

Curvas de estabilidad.

Todos estos datos se recapitulan gráficamente al construir las curvas de estabilidad, es decir, el gráfico del ΔG_D en función de la temperatura, usando los datos de DSC (figura 37). Como se puede deducir de toda la discusión previa, la curva de estabilidad de HisJ es más pequeña que la de LAO, consecuencia directa del ΔH_D menor de HisJ. De igual manera, los datos de ΔG_D producto de la desnaturalización química concuerdan, dentro la desviación estándar, con los valores de la curva. Al sobrelaparse los datos de transición espectroscópicos con la curva, se verifica una vez más que el proceso de deplegamiento sigue un modelo de dos estados. La T_m de LAO e HisJ es la misma, siendo congruente con del ambiente de sus organismos de origen. ArtJ tiene una T_m^{app} y ΔG_D más altas que sus compañeras mesófilas, producto de su carácter termofílico. Si se quisiera construir una curva hipotética de ArtJ que pase por esos valores, se tendría que aumentar el ΔC_{PD} o el ΔH_D . Lamentablemente no se encontraron condiciones para lograr la reversibilidad y el equilibrio del proceso.

Acoplamiento unión-estabilidad.

Esta última etapa del proyecto surgió debido a resultados inesperados provenientes de experimentos de unión, con histidina y arginina, de HisJ realizados por ITC en colaboración con la Dra. Nancy Pulido Mayoral (Pulido *et al.*, en preparación). Un resumen de estos resultados, juntos con los datos reportados para LAO (Pulido *et al.*, 2014) se presenta en la tabla 9.

Si nos enfocamos en los resultados de LAO, podemos observar que la unión, para ambos ligandos, esta favorecida entálpicamente. El ΔC_{PL} , al igual que el ΔC_{PD} ,

también es proporcional al cambio del ASA, en este contexto al unirse el ligando. Este valor para LAO se explica satisfactoriamente como un movimiento rígido de ambos lóbulos al encerrar al aminoácido (más la unión de varias moléculas de agua), sin que exista algún rearrreglo conformacional interno de los lóbulos. Sin embargo, este no es el caso para HisJ, donde los valores de ΔC_{PL} no se pueden explicar de esa manera. Este parámetro para histidina es más de tres veces mayor a comparación de LAO. Este fenómeno sugiere fuertemente que HisJ si sufre un cambio conformacional de mayor magnitud al formarse el complejo proteína-ligando. Además, la unión HisJ-arginina está favorecida entrópicamente, en contraste con LAO. Para entender mejor estas diferencias que sugieren un cambio conformacional de mayor magnitud se realizaron experimentos de desnaturalización térmica en presencia de concentraciones crecientes de ligando, seguidas por fluorescencia. De acuerdo con el método de análisis reportado por Sánchez Ruiz (Sanchez-Ruiz, 2007), es posible determinar el efecto del ligando en la estabilidad de una proteína, específicamente el ΔH_{NL} , al examinar la dependencia de la T_m contra la concentración de ligando.

Tabla 9. Firmas termodinámicos de unión de HisJ y LAO obtenidas por ITC.

	HisJ				
	K_D (nM)	ΔG_L (kcal mol ⁻¹)	ΔH_L (kcal mol ⁻¹)	$-T\Delta S_L$ (kcal mol ⁻¹)	ΔC_{PL} (kcal mol ⁻¹ K ⁻¹)
Histidina	38.5	-10.1	-21.4	11.3	-0.838
Arginina	769	-8.3	2.1	-10.4	-0.328
	LAO ^a				
	K_D (nM)	ΔG_L (kcal mol ⁻¹)	ΔH_L (kcal mol ⁻¹)	$-T\Delta S_L$ (kcal mol ⁻¹)	ΔC_{PL} (kcal mol ⁻¹ K ⁻¹)
Histidina	2700	-7.6	-8.2	0.6	-0.264
Arginina	0.96	-12.3	-11.3	-1.0	-0.299

^a Datos provenientes de Pulido *et al.*, 2014. Todos los experimentos se realizaron en amortiguador 10 mM HEPES pH 8.0 a 25°C.

Primeramente, se observa que la T_m aumenta con respecto a la $[L]_T$ sólo cuando ésta supera a la $[P]_T$ (figura 38 y 39), lo que es esperado dado reportes previos en otras PUL (Fukada *et al.*, 1983) y las bases termodinámicas de estos experimentos. De acuerdo a este análisis aplicado a HisJ (presentado en las figuras 38E y 39E) el

ΔH_{NL} es 146 ± 14 kcal mol⁻¹ para histidina y 195 ± 12 kcal mol⁻¹ para arginina. Por otro lado, uno podría calcular este mismo parámetro con los datos separados de ΔH_D y ΔH_L derivados de los experimentos de estabilidad anteriores y de ITC, de acuerdo a la ecuación 22. Hay que considerar que si existiera algún cambio conformacional considerable al unir estos aminoácidos, la entalpía correspondiente a este cambio está contribuyendo al ΔH_L proveniente de ITC. Con el fin de comparar el valor teórico y el experimental, se realizó el mismo cálculo utilizando los datos de ITC de LAO, ya que su cambio conformacional solo abarca el cierre de los lóbulos sobre el ligando. Por lo tanto ambos valores teóricos deberían diferir, y el valor experimental debería ser igual al calculado usando los datos de unión de HisJ (los datos de ΔH_L considerados están a 58 °C, calculados con el ΔC_{PL} para cada ligando, ya que esta temperatura corresponde a la mitad de las rectas de los gráficos de Sturtevant). Estos cálculos se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. Entalpía de desplegamiento experimental y teórica del complejo HisJ-ligando.

	Experimental ^a	Calculado ITC HisJ ^b	Calculado ITC LAO ^b
ΔH_{NL} Histidina (kcal mol ⁻¹)	146 ± 14	170 ± 1	139 ± 1
ΔH_{NL} Arginina (kcal mol ⁻¹)	195 ± 12	129 ± 1	143 ± 1

^a Se reporta el valor promedio de las tablas 38E y 39E.

^b Para el cálculo teórico se utilizó la ecuación 22.

La primera observación es el comportamiento contrario del ΔH_{NL} , alto con arginina y relativamente bajo con histidina, con respecto al del ΔC_{PL} (tabla 9 y 10). No existen diferencia significativa entre el valor de ΔH_{NL} experimental de histidina y los valores calculados usando los datos de ITC de HisJ o LAO. El ΔH_{NL} experimental de arginina es significativamente mayor que los dos valores teóricos. Estos resultados se pueden explicar por varios factores. Primero, los datos experimentales parecen describir una relación no lineal entre la T_m y la concentración de histidina (figuras 38). Aunque esto podría deberse al error experimental, también puede corresponder a que el ΔC_{PD} del complejo HisJ-histidina es lo suficientemente alto como para influir la tendencia de la T_m , y en consecuencia el ajuste a una línea no los represente correctamente. Sin embargo, el ajuste es el adecuado para los experimentos

usando arginina (figura 39), sin que se note una curvatura en la tendencia de la T_m . Otro posible escenario es que el efecto en la estabilidad de HisJ al unir su ligando no sea exclusivo del ΔH_D , sino que también cambien en una magnitud considerable el componente entrópico del desplegamiento del complejo. Esta opción no puede descartarse ya que la determinación de este componente entrópico no es directa como la del ΔH_{NL} , que es proporcional a la dependencia del ΔG_D con la temperatura. El último posible, aunque menos probable, es que el complejo HisJ-histidina se disocie antes de que la proteína se despliegue, por lo que entonces el ΔH_{NL} experimental sería igual al ΔH_D , aunque no es factible debido que a 62 °C la unión sigue siendo favorable. Para confirmar estas observaciones, queda como objetivo a futuro realizar estos mismos experimentos usando DSC con más concentraciones de ligando, para confirmar o no la dependencia no lineal de la T_m con respecto a la concentración histidina.

En conclusión, es claro que HisJ y ArtJ poseen propiedades fisicoquímicas, descriptoras de su plegamiento, estabilidad y función, muy diferentes entre sí y con LAO, a pesar de compartir la misma topología y función. ArtJ e HisJ son altamente afines a histidina y arginina, aunque con afinidades contrarias. HisJ es la menos estable, consecuencia de un estado nativo con diferente contenido de estructura secundaria y superficie accesible al solvente con respecto a ArtJ. El desplegamiento de ArtJ es congruente con su origen, pero sufre agregación al aumentar la temperatura. Por último, el acoplamiento unión-estabilidad en HisJ implica que hay un gran cambio conformacional adicional al característico cierre de los lóbulos sobre el ligando. Este último resultado fue una sorpresa, ya que su gran similitud estructural y en secuencia con LAO no predice un comportamiento diferente a éste. Las implicaciones de este fenómeno son importantes, ya que plantea más preguntas acerca de la dinámica conformacional de estas proteínas. Adicionalmente, los intentos de rediseño de afinidades utilizan como base la estructura tridimensional, que en nuestro caso no refleja las diferencias en los parámetros termodinámicos. El diseño de nuevas afinidades debe considerar entonces toda la dinámica conformacional y el origen molecular de la firma termodinámica de unión.

Conclusiones

- La expresión citoplasmática y la precipitación selectiva con sulfato de amonio mejoran y facilitan enormemente el rendimiento y el protocolo de purificación de ArtJ e HisJ.
- Las dos proteínas no tienen el mismo contenido de estructura secundaria en solución, pero son capaces de unirse a sus ligandos con alta afinidad.
- ArtJ se agrega en presencia de ligando y su desnaturalización térmica es irreversible o no se encuentra al equilibrio. Sin embargo, las K_D^{app} y la T_m^{app} obtenidas concuerdan con la función y el origen termófilo de ésta.
- El desplegamiento térmico de HisJ es reversible, está al equilibrio y es descrito perfectamente como un proceso de dos estados.
- La desnaturalización química de HisJ y ArtJ es reversible, se encuentra en equilibrio y sigue un modelo de dos estados. Sin embargo, la urea no puede desplegar completamente a ArtJ y el valor del parámetro m usando GdnHCl es diferente entre ambas.
- El orden de estabilidad a 25°C es: ArtJ > LAO > HisJ.
- La formación del complejo HisJ-ligando tiene grandes repercusiones en su estabilidad, en donde el componente entálpico de la estabilidad juega un papel importante.
- La secuencia tiene un papel fundamental en las propiedades fisicoquímicas de las proteínas, aunque compartan la topología y la función.
- La estructura cristalográfica no es suficiente para explicar completamente las bases moleculares del reconocimiento y afinidad de ligandos, ya que no representa ni provee información de la dinámica conformacional de estas proteínas antes, durante y después de unirse a su ligando.

Perspectivas.

- Establecer condiciones donde la desnaturalización térmica de ArtJ se encuentre al equilibrio.
- Determinar las causas moleculares de la desnaturalización térmica irreversible de ArtJ.
- Construir una curva de estabilidad de ArtJ realizando experimentos de desnaturalización química a diferentes temperaturas.
- Resolver la paradoja del efecto de los ligandos en la estabilidad de la estructura de HisJ, calculando la contribución entrópica por métodos experimentales o computacionales.
- Correlacionar los datos termodinámicos de la estabilidad y su acoplamiento con la unión con datos estructurales o dinámicos.

Bibliografía.

Aggarwal, V., Kulothungan, S. R., Balamurali, M. M., Saranya, S. R., Varadarajan, R., Ainavarapu, S. R. K. (2011). Ligand-modulated parallel mechanical unfolding pathways of maltose-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 286(32): 28056-28065.

Ames, G. F. I., Liu, C. E., Joshi, A. K., Nikaido, K. (1996). Liganded and unliganded receptor interact with equal affinity with the membrane complex of periplasmic permeases, a subfamily of traffic ATPases. *J. Biol. Chem.* 271: 14264-14270.

Anfinsen, C. B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science.* 181(96): 223-230.

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. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 47(2): 1309-1314.

Auclair, S. M., Bhanu, M. K., Kendall D. A. (2011). Signal peptidase I: cleaving the way to mature proteins. *Prot. Sci.* 21: 13-25.

Berntsson R. P. A., Smits S. H. J., Schmitt L., Slotboom D. J., Poolman B. (2010). A structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS Lett.* 584: 2605-2617.

Boehr, D. D., Nussinov, R., & Wright, P. E. (2009). The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition. *Nat. Chem. Biol.*, 5(11): 789-796.

Böhm, G., Muhr, R., Jaenicke, R. (1992). Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng.* 5: 191-195.

Bryngelson, J. D., Onuchic, J. N., Socci, N. D., Wolynes, P. G. (1995). Funnels, pathways and the energy landscape of protein folding: a synthesis. *Proteins.* 21: 167-195.

Chu B. C. H., Chan D. I., DeWolf T., Periole X., Vogel H. J. (2014). Molecular dynamics simulations reveal that apo-HisJ can sample a closed conformation. *Proteins.* 82: 386-398.

Chu B. C. H., DeWolf, T., Vogel, H. J. (2013). Role of the two structural domains from the periplasmic *Escherichia coli* histidine-binding protein HisJ. *J. Biol. Chem.* 288(44): 31409-31422.

Creamer, T. P., Rose, G. D. (1994). α -helix-forming propensities in peptides and proteins. *Proteins.* 19: 85-97.

Creighton, T. E. (1996). *Proteins: Structure and molecular properties.* 2^o Ed. New York, USA: W. H. Freeman and Company.

Cooper, A. (1999). Thermodynamic analysis of biomolecular interactions. *Curr. Op. Chem. Biol.* 3: 557-563.

- Cooper, A. (2000). Heat capacity of hydrogen-bonded networks: an alternative view of protein folding thermodynamics. *Biophys. Chem.* 85: 25-39.
- Dill, K. A. (1990). Dominant forces in protein folding. *Biochem.* 29: 7133-55.
- Dill, K. A., Ozkan, S. B., Shell, M. S., Weikl, T. R. (2008). The protein folding problem. *Annu. Rev. Biophys.* 37: 289-316.
- Dill, K. A., MacCallum, J. L. (2012). The protein-folding problem, 50 year on. *Science.* 338: 1042-1046.
- Dobson, C. M., Evans, P. A., Radford, S. E. (1994). Understanding how proteins fold: the lysozyme story so far. *Trends Biochem. Sci.* 19(1): 31-37.
- Dyson, J. H., Wright, P. E. (2002). Coupling of folding and binding for unstructured proteins. *Curr. Op. Struct. Biol.* 12: 54-60.
- Engel, T., Reid, P. (2013). *Thermodynamics, statistical thermodynamics, and kinetics.* 3^o Ed. Boston, USA: Pearson.
- Felder, C. B., Graul, R. C., Lee, A. Y., Merkle, H. -P., & Sadee, W. (1999). The venus flytrap of periplasmic binding proteins: An ancient protein module present in multiple drug receptors. *AAPS PharmSci.* 1(2): 7-26.
- Feller, G. (2010). Protein stability and enzyme activity at extreme biological temperatures. *J. Phys: Condens. Matter.* 22: 323101-323117.
- Ferguson, N., Capaldi, A. P., James, R., Kleantous, C., Radford, S. E. (1999). Rapid folding with and without intermediates in the homologous four-helix proteins Im7 and Im9. *J. Mol. Biol.* 286(6): 1597-1608.
- Fersht, A. R. (2008). From the first protein structures to our current knowledge of protein folding: delights and scepticisms. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 9(8): 650-654.
- Fukada, H., Sturtevant, J. M., Quioco, F. A. (1983). Thermodynamics of the binding of arabinose and of D-galactose to the arabinose-binding protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 258: 13193-13198.
- Fukami-Kobayashi, K., Tateno, Y. Nishikawa, K. (1999). Domain dislocation: a change of core structure in periplasmic binding proteins in their evolutionary history. *J. Mol. Biol.* 286: 279-90.
- 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. *Biochem.* 36: 5020-5028.
- Greenfield, N. J. (2007). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat. Protocol.* 1(2): 2876-2890.

- Hall, J. A., Thorgeirsson, T. E., Liu, J., Shin, Y. -K., Nikaido, H. (1997). Two modes of ligand binding in maltose-binding protein of *Escherichia coli*. Electron paramagnetic resonance study of ligand induced global conformational changes by site-directed spin labeling. *J. Biol. Chem.* 272: 17610-17614.
- Kabsch, W., Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers.* 22: 2577-2637.
- Kasha, M. (1990). Four great personalities of science: G. N. Lewis, J. Franck, R. S. Mulliken and A. Szent-Györgyi. *Pure & Appl. Chem.* 62(8): 1615-1630.
- Katoh K., Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30: 772-780
- 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. *Eur. J. Biochem.* 267: 4242-4252.
- Kurnik, M., Hedberg, L., Danielsson, J., Oliveberg, M. (2012). Folding without charges. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109(15): 5705-5710.
- Lai, Z., McCulloch, J., Lashuel, H. A., Kelly, J. W. (1997). Guanidine hydrochloride-induced denaturation and refolding of transthyretin exhibits a marked hysteresis: equilibria with high kinetic barriers. *Biochem.* 36: 10230-10239.
- Lazaridis, T., Archontis, G., Karplus, M. (1995). Enthalpic contribution to protein stability: Insights from atom-based calculations and statistical mechanics. *Adv. Prot. Chem.* 47: 231-306.
- Levinthal, C. (1968). Are there pathways for protein folding? *J. Chem. Phys.* 65(1): 44.
- Levy, Y., Wolynes, P. G. Onuchic, J. N. (2004). Protein topology determines binding mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101(2):511-516.
- LiCata, V. J., Liu, Chin-Chi. (2011). Analysis of free energy versus temperature curves in protein folding and macromolecular interactions. *Meth. Enzymol.* 488:219-238.
- Miller, D. M. I., Olson, J. S., Pflugrath, J. W., Quioco, F. A. (1983). Rates of ligand binding to periplasmic proteins involved in bacterial transport and chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 258: 13665-13672.
- Myers, J. K., Pace, C. N., Scholtz, J. M. (1995). Denaturant *m* values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Prot. Sci.* 4: 2138-2148.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry.* 5^o Ed. New York, USA: W. H. Freeman and Company.

- Oh B. H., Pandit J., Kang C. H., Nikaido K., Gokcen S., Ames G. F. L., Kim S. H. (1993). Three-dimensional structures of the periplasmic lysine/arginine/ornithine-binding protein with and without ligand. *J. Biol. Chem.* 268: 11348-11355.
- Oh, B. H., Kang, C. H., De bondt, H., Kim, S. H., Nikaido, K., Joshi, A., Ames, G. F. I. (1994). The bacterial periplasmic histidine binding protein: structure/function analysis of the ligand-binding site and comparison with related proteins. *J. Biol. Chem.* 269: 4135-4143.
- Pace, C. N., Grimsley, G. R. (2001). Protein Stability. *Encyclopedia of Life Sciences.*
- Pauling L., Corey, R. B. (1951). Atomic coordinates and structure factors for two helical configurations of polypeptide chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 37: 235-240.
- Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M., Meng E. C., Ferrin T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25(13): 1605-1612.
- Petsko, G. A. (2001). Structural basis of thermostability in hyperthermophilic proteins, or "there's more than one way to skin a cat". *Methods Enzymol.* 334: 469-478.
- Prajapati, R. S., Indu, S., Varadarajan, R. (2007). Identification and thermodynamic characterization of molten-globule states of periplasmic binding proteins. *Biochem.* 46: 10339-10352.
- Privalov, P. L. (2007). Thermodynamic problems in structural molecular biology. *Pure & Appl. Chem.* 79(8): 1445-1462.
- Privalov, P. L. (2009). Microcalorimetry of proteins and their complexes en John W. Shriver (ed.) *Protein Structure, Stability, and Interactions.* vol. 490. Humana Press.
- Pulido, N. O., Silva, D. A., Tellez, L. A., Pérez-Hernández, G. García-Hernández, E., Sosa-Peinado, A., Fernández-Velasco, D. A. (2014). On the molecular basis of the high affinity binding of basic amino acids to LAOBP, a periplasmic binding protein from *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Rec.* 28: 108-116.
- Ramshini H., Parrini C., Relini A., Zampagni M., Mannini B *et al.* (2011). Large proteins have a great tendency to aggregate but a low propensity to form amyloid fibrils. *PLoS ONE* 6(1): e16075.
- Razvi, A., Scholtz, J. M. (2006). Lessons in stability from thermophilic proteins. *Prot. Sci.* 15: 1569-1578.
- Ropson, I. J., Boyer, J. A., Schaeffer, B. A., Dalessio, P. M. (2008). Comparison of the folding mechanism of highly homologous proteins in the lipid-binding protein family. *Proteins.* 75(4): 799-806.
- Sanchez-Ruiz, J. M. (2007). Ligands effects on protein thermodynamic stability. *Biophys. Chem.* 126: 43-49.

- Sanchez-Ruiz, J. M. (2010). Protein kinetic stability, *Biophys. Chem.* 148(1-3): 1-15.
- Sanchez-Ruiz, J. M. (2011). Probing free-energy surfaces with differential scanning calorimetry. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 62(2): 231-255.
- Santoro, M. M., Bolen, D. W. (1988). Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl α -chymotrypsin using different denaturants. *Biochem.* 27: 8063-8068.
- Scheraga, H. A. (1992). Contribution of physical chemistry to an understanding of protein structure and function. *Prot. Sci.* 1: 691-693.
- Scholtz, J. M., Grimsley, G. R., Pace, C. N. (2009). Solvent denaturation of proteins and interpretations of the m value. *Methods Enzymol.* 466: 549-563.
- Shoemaker, B. A., Portman, J. J., Wolynes, P. G. (2000). Speeding molecular recognition by using the folding funnel: the fly-casting mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 8868-8873.
- Tellez, L. A., Blancas-Mejia, L. M., Carrilo-Nava, E., Mendoza-Hernández, G., Cisneros, D. A., Fernández-Velasco, D. A. (2008). Thermal unfolding of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*: dimer dissociation lead to extensive unfolding. *Biochem.* 47: 11665-11673.
- Vahedi-Faridi, A., Eckey, V., Scheffel, F., Alings, C., Landmesser, H., Schneider, E., Saenger, W. (2008). Crystal structures and mutational analysis of the arginine-, lysine-histidine-binding protein ArtJ from *Geobacillus stearothermophilus*. Implications for interactions of ArtJ with its cognate ATP-binding cassette transporter, Art(MP)₂. *J. Mol. Biol.* 375: 448-459.
- Vergara Gutiérrez, J. R. (2011). El desplegamiento de la proteína LAO: estudios cinéticos y termodinámicos. Tesis. Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. UNAM.
- Vivian, J. T., Callis, P. R. (2001). Mechanism of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophys J.* 80(5): 2093-2109.
- Waterhouse A. M., Procter J. B., Martin D. M. A., Clamp M., Barton G. J. (2009). Jalview Version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25: 1189-1191.
- Whiteside G. M., Krishnamurthy V. M. (2005). Designing ligands to bind proteins. *Q. Rev. Biophys.* 38: 385-395.
- Wolf, A., Shaw, E. W., Nikaido, K., Ames, G. F. I. (1994). The histidine-binding protein undergoes conformational changes in the absence of ligand as analysed with conformation-specific monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* 269: 23051-23058.

Wolf, A., Lee, K. C., Kirsch, J. F. & Ames, G. F. I. (1996). Ligand-dependent conformational plasticity of the periplasmic histidine-binding protein. *J. Biol. Chem.* 271: 21243-21250.

Wyman, J., Gill, S. J. (1990). *Binding and linkage. Functional chemistry of biological macromolecules.* California, USA: University Science Books.