



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Caracterización experimental del plegamiento de los dominios A y B de la proteína periplásmica de unión a amino ácidos positivos (LAO)”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
TANIA RAQUEL BERROCAL GAMA

TUTOR PRINCIPAL
Alejandro Sosa Peinado
[Facultad de Medicina](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
León Patricio Martínez Castilla
Rogelio Rodríguez-Sotres
[Facultad de Química](#)

Ciudad de México. Junio, 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Abreviaturas	3
Introducción.	4
▪ Niveles de estructura de proteínas.	4
• Estructura primaria.....	6
• Estructura secundaria.....	6
• Estructura terciaria.....	6
• Estructura cuaternaria.....	7
Funciones de las proteínas.....	7
Plegamiento de proteínas.....	7
Intermediarios de plegamiento.....	9
Proteínas de unión a ligando (PBPs).....	11
La proteína de unión a lisina-arginina-ornitina: Características generales y estudio del plegamiento.	12
Objetivo general.	19
Objetivos particulares.....	19
Materiales y Métodos.....	19
Diseño de los lóbulos A y B de la proteína LAO.....	19
Expresión y purificación de los lóbulos A y B de la proteína LAO.....	20
Experimentos de desnaturalización del Lóbulo A.	21
Ensayos cinéticos de renaturalización y desnaturalización del lóbulo A.	22
Calorimetría de titulación isotérmica (ITC) del lóbulo A.....	22
Análisis de datos.....	23
Resultados.....	25
Expresión y purificación de los lóbulos A y B de la proteína LAO.....	27
Experimentos de desnaturalización térmica del lóbulo A.....	29
Ensayos de desnaturalización con urea.....	35
Experimentos cinéticos de replegamiento y desplegamiento.....	38
Calorimetría de titulación isotérmica.....	49
Discusión.....	52
El desplegamiento del lóbulo A al equilibrio.....	53
Estudios cinéticos del plegamiento y desplegamiento del lóbulo A.	54
Estudios de la unión del lóbulo A.....	56
Conclusiones y Perspectivas.	56
Bibliografía.....	57

Abreviaturas

ASA: Área accesible al solvente

Cm: Concentración media de desnaturalizante

CspB: Cold-Shock Protein de *Bacillus subtilis*

DC: Dicroísmo circular

DSC: Calorimetría diferencial de barrido

ET: Estado de transición

FD: Fracción de proteína desnaturalizada

His J: Proteína de unión a histidina

IF: Intensidad de fluorescencia

Im7: Proteína inmunitaria a Colchicina

Im9: Proteína inmunitaria a Colchicina

ITC: Calorimetría de titulación isotérmica

K_d: Constante de disociación

LAO: Proteína de unión a lisina, arginina y ornitina

MBP: Proteína de unión a maltosa

PBP: Proteína de unión a ligando

SBP: Proteína de unión a substrato

T_m: Temperatura media de desnaturalización

ΔH: Cambio en la entalpia

ΔS: Cambio en la entropía

Introducción.

Las proteínas son macromoléculas versátiles que realizan diversas funciones, desde el reconocimiento molecular hasta la catálisis. Están constituidas por aminoácidos que forman un enlace covalente entre ellos (enlace peptídico) para formar un polipéptido. Su nivel estructural va desde pocos aminoácidos (oligopéptidos), como la insulina, hasta polímeros de gran tamaño, ya sea en forma de una sola subunidad o complejos multiméricos, por ejemplo, en el caso de los virus. La información requerida para que cada proteína adquiera su estructura está contenida en la secuencia de sus aminoácidos. Cada aminoácido contiene una cadena lateral con propiedades químicas específicas, que van desde grupos no polares a polares sin o con carga, que permite que ciertos residuos se encuentren preferencialmente de cara al solvente acuoso o bien a las regiones hidrofóbicas, las cuales corresponden a las zonas internas de las proteínas. De esta manera, la secuencia específica de aminoácidos determina la estructura proteica y su función. Resulta sorprendente cómo estos aminoácidos le dan estructura a las miles de proteínas existentes, desde enzimas, hormonas, anticuerpos, fibras musculares, etc.

Uno de los objetivos del estudio de las proteínas en la actualidad es poder predecir la estructura y actividad de una proteína a partir de su estructura primaria (es decir, su secuencia de aminoácidos); para ello debemos entender su comportamiento cinético y al equilibrio, además, ser capaces de relacionar dichas propiedades con su estructura. Así, el punto de inicio para el estudio de las proteínas es su estructura. (Fersht, 1999).

▪ Niveles de estructura de proteínas.

Dentro del estudio estructural de las proteínas se han distinguido varios niveles de organización (Figura 1).

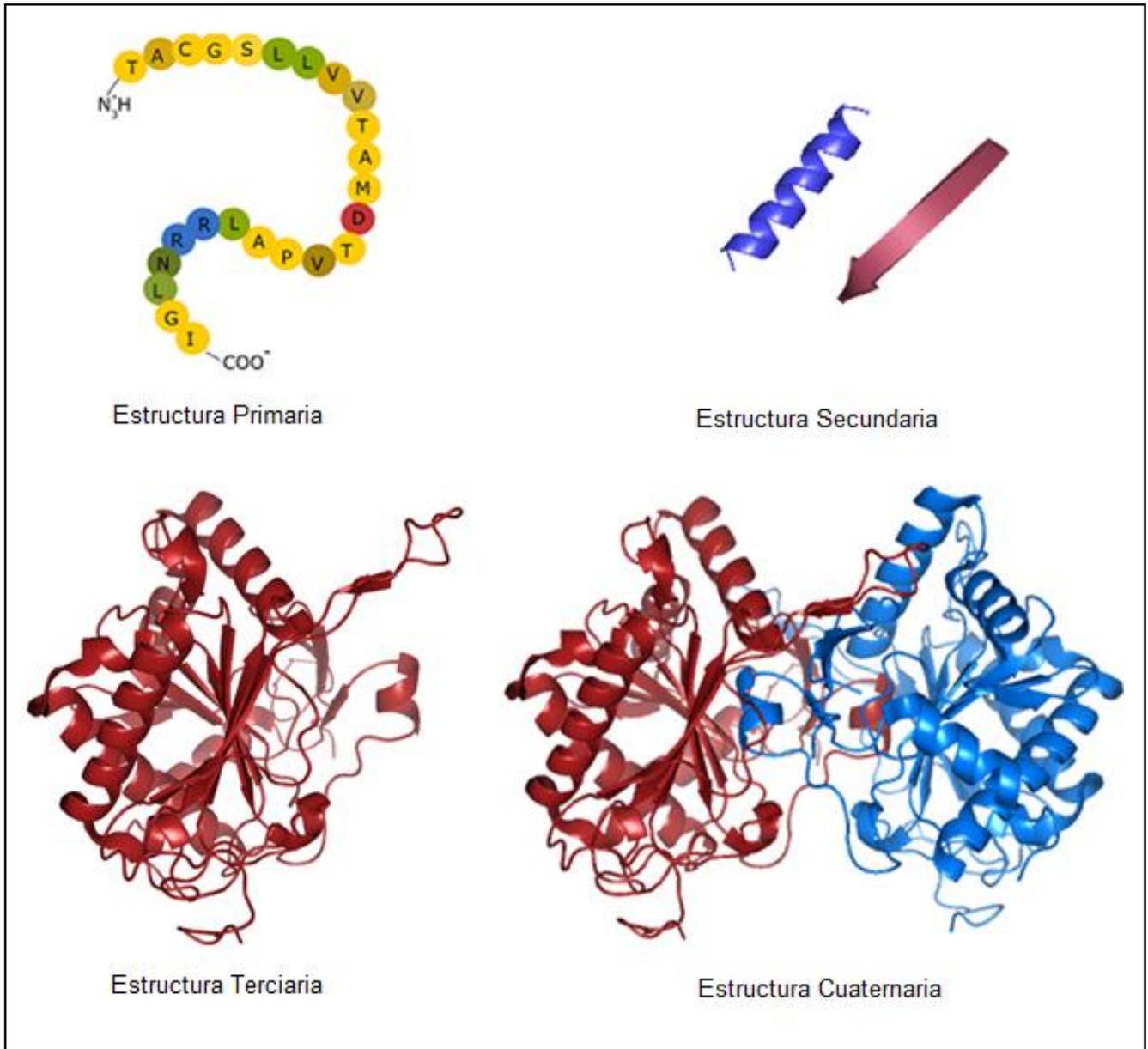


Figura 1. Niveles de estructura de las proteínas. En la estructura terciaria se muestra el monómero de la proteína galactosa-1-fosfato-uridiltransferasa (GALT), mientras que la estructura cuaternaria muestra a la proteína dimérica.

- **Estructura primaria.**

El constituyente primario de las proteínas son los L-aminoácidos, los cuales se encuentran unidos mediante enlaces tipo amida, donde el amino α de un residuo se une con el carboxilo α del siguiente. La estructura primaria está definida por la secuencia en la que los aminoácidos forman el polímero. Generalmente, la estructura primaria de casi todas las proteínas intracelulares consiste en una cadena de polipéptidos lineal; sin embargo, varias proteínas extracelulares tienen enlaces covalentes entre los grupos tiol de los residuos de cisteína (Fersht, 1999).

- **Estructura secundaria.**

Este nivel consta de varios patrones repetitivos de los cuales los más comunes son las hélices α y las hojas β . Las hélices α son estructuras en forma de varilla que se originan cuando la cadena polipeptídica adquiere una conformación helicoidal dextrógira, formándose puentes de hidrógeno entre un grupo N-H y el grupo carboxilo del aminoácido que se encuentra cuatro residuos más adelante. (McKee, 2009). Las hojas β se forman cuando se alinean dos o más segmentos de la cadena polipeptídica, uno al lado del otro, y se estabilizan mediante enlaces de hidrógeno que se forman entre los grupos N-H y carbonilo de cadenas adyacentes en el esqueleto polipeptídico: dichas estructuras pueden ser paralelas o anti paralelas, todo depende del sentido en el que estén dispuestos los puentes de hidrógeno de las cadenas polipeptídicas (McKee, 2009).

- **Estructura terciaria.**

Cuando se habla de estructura terciaria se hace referencia a las conformaciones tridimensionales que adquieren las proteínas globulares cuando se pliegan en sus estructuras nativas. Entre las principales características de la estructura terciaria se encuentra la manera en la que se da el plegamiento, que permite que residuos lejanos en la estructura primaria queden cerca y que la proteína sea compacta; además, aquellas proteínas globulares que son grandes suelen tener varias unidades compactas llamadas dominios, los cuales son segmentos independientes estructuralmente y que poseen funciones específicas. La estructura terciaria se estabiliza mediante interacciones hidrofóbicas,

electrostáticas, puentes de hidrógeno, enlaces covalentes e hidratación (McKee, 2009).

- **Estructura cuaternaria.**

Existen proteínas que pueden estar formadas por una o varias cadenas polipeptídicas; a las primeras se les denominan monómeros, a las segundas oligómeros. Cuando hablamos de la estructura cuaternaria de las proteínas nos referimos a la disposición de las subunidades proteicas que pueden ser idénticas o diferentes y que pueden plegarse antes, durante o después de su asociación para formar un oligómero. Posterior a la asociación de los monómeros se da paso a la estructura cuaternaria de dicha proteína (Vázquez-Contreras, 2003).

Funciones de las proteínas.

La diversidad funcional de las proteínas es tan vasta como su diversidad estructural. Dichas macromoléculas realizan funciones como la catálisis, reconocimiento celular, transporte de moléculas, sirven como materiales estructurales y hormonas, participan en la regulación metabólica, como neurotransmisores, entre otras. La función de una proteína depende de la estructura tridimensional que adquiera. Por lo anterior, es importante conocer cómo es que dichas macromoléculas adquieren su estructura nativa a partir de su estado desnaturalizado.

Plegamiento de proteínas.

A lo largo de la historia se han realizado diversas investigaciones con la finalidad de comprender la naturaleza de las proteínas. Anfinsen, en 1961, realizó uno de los experimentos que le valdría el Premio Nobel. En dicho estudio desplegó a la ribonucleasa pancreática bovina utilizando urea como agente desnaturalizante y mercaptoetanol como agente reductor. Con lo anterior observó la pérdida de actividad; posteriormente la renaturalizó y notó que la proteína recuperaba su actividad y, por lo tanto, su estructura nativa. Esta investigación le permitió sugerir que toda la información requerida (por la proteína) para adoptar su conformación final está codificada en su estructura primaria.

Tiempo después Levinthal, en 1969, propuso que la búsqueda de la estructura nativa de una proteína no puede ser al azar, ya que el número de posibles estados es tan grande que hace prácticamente imposible el plegamiento en un tiempo biológicamente relevante. Por lo anterior, se plantea que una proteína presenta vías de plegamiento codificadas en su estructura primaria. Adicionalmente, se propuso el término de paisaje energético, el cual difiere para cada proteína y tiene forma de embudo, donde el estado desnaturalizado ocupa la parte superior del mismo y se compone de un gran número de conformaciones de alta energía y entropía. Conforme el embudo se va haciendo más angosto se reduce el espacio conformacional hasta llegar a la punta, donde se sitúa el estado nativo (Figura 2).

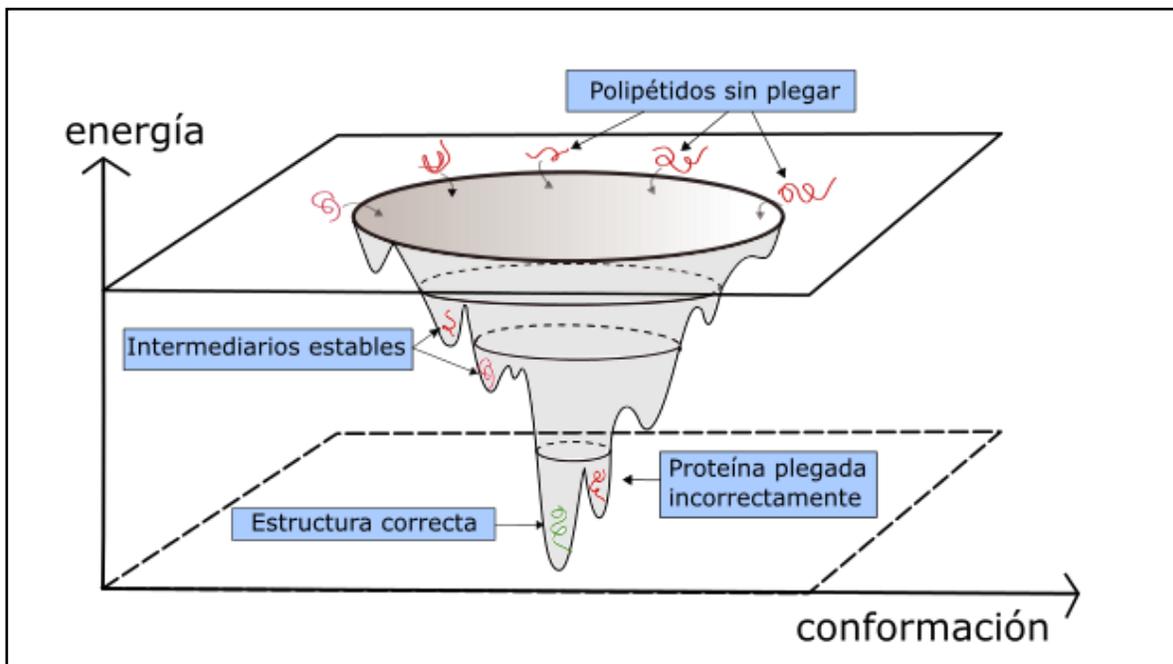


Figura 2. Representación de un "embudo de plegamiento". En la parte superior se muestra al polipéptido sin plegar, el cual puede recorrer diferentes vías hasta llegar a la estructura terciaria correcta, sin embargo, en el camino pueden presentarse intermediarios (Modificado de Müller-Esterl et al., 2008).

Después de la paradoja de Levinthal surgieron tres modelos principales que permitieron explicar el plegamiento de las proteínas, suprimiendo la búsqueda al azar. El **modelo de nucleación** plantea que residuos vecinos en la secuencia forman estructuras secundarias que actúan como núcleos a partir de los cuales se propaga la estructura nativa (Fersht, 1999). El **modelo jerárquico** propone la formación espontánea de estructuras secundarias locales que, si son más

estables que el polipéptido desplegado, sobreviven y permiten la posterior formación de estructuras súper secundarias (Müller-Esterl y col. 2008). El **modelo de colapso hidrofóbico** sugiere el colapso de la proteína alrededor de sus cadenas laterales hidrofóbicas para después re-arreglarse y salir del estado conformacional restringido en que se encuentra el intermediario, para adquirir su estructura nativa. El modelo de **nucleación condensación**, propuesto por Alan Fersht, supone la formación de un núcleo de estructura secundaria que se estabiliza mediante interacciones terciarias alrededor de las cuales la estructura se condensa (Fersht, 1997). A pesar de esto, se ha demostrado que ninguno de los modelos antes mencionados explica de manera general el proceso de plegamiento de las proteínas, sino que cada proteína presenta un comportamiento particular en su proceso de plegamiento.

Intermediarios de plegamiento.

Los modelos de plegamiento antes mencionados tienen en común la presencia de intermediarios. Lo anterior sugirió que dichas especies eran necesarias para que las proteínas adquirieran su estructura nativa debido a que restringían el espacio conformacional. No obstante, estudios posteriores mostraron que proteínas como la CspB se pliegan en ausencia de intermediarios (Schindler, 1995), o tienen mecanismos diferentes a los ya propuestos (como la lisozima), o bien, presentan intermediarios que obstaculizan el plegamiento y representan trampas cinéticas. Sin embargo, existen estudios que sugieren que los intermediarios ayudan a la proteína a encontrar su estructura nativa. Por ejemplo, el aumento de hasta 20 veces en la velocidad del plegamiento para la proteína Im9, al estabilizar su intermediario cinético a través de la incorporación de residuos presentes en el intermediario de su homóloga Im7 (Friel, 2004). Así como este ejemplo, existen otros más que apoyan la idea de que los intermediarios son especies productivas que permiten encontrar la conformación del estado nativo de manera más eficiente. Algunos autores sugieren que especies diferentes al estado nativo y desnaturalizado surgieron como consecuencia de la función, es decir, que las secuencias han evolucionado con propósitos funcionales, lo que compromete la velocidad de plegamiento y estabilidad de las estructuras proteicas (Brockwell,

2007). Además, se han identificado intermediarios en proteínas cuyo mecanismo de plegamiento había sido reportado como de dos estados. Lo anterior indica que dichas especies existen en todas ellas, sin embargo, no siempre es posible identificarlas por su baja estabilidad, así como la sensibilidad de los métodos utilizados. Aunque el debate sobre la importancia de las especies intermediarias sigue en pie, su estudio representa información para entender el camino que la proteína recorre hasta el estado nativo.

Una manera de detectar intermediarios es mediante el análisis de cinéticas de replegamiento. Existen características clave en el gráfico de chevron que permiten confirmar la presencia de un proceso de plegamiento de dos estados y, de esta manera, descartar un proceso más complejo. Una de ellas es la linealidad en ambos brazos del gráfico de chevron. Además, la extrapolación de las constantes k_f° y k_d° deben proporcionar un valor estimado de la estabilidad de la proteína y este debe coincidir con el valor obtenido en los estudios al equilibrio. Por último, la suma de los valores de m obtenidos en los estudios cinéticos debe coincidir con la suma de los valores de m de los estudios al equilibrio.

Por otra parte, es importante verificar la presencia de una fase explosiva. Este tipo de reacciones se observan en diversas proteínas durante el replegamiento a bajas concentraciones de desnaturizante al inicio de la cinética indica que la señal inicial observada es, en realidad, la señal final que pertenece a un proceso rápido que ocurrió durante el tiempo muerto del experimento y que se relaciona con la transición del estado desplegado a un intermediario (Morris, 2011).

El gráfico de chevron ilustra la dependencia del logaritmo natural de la constante de velocidad aparente (λ), obtenida a partir de las cinéticas de desnaturalización y renaturalización, con la concentración de desnaturizante, y proporciona información sobre el mecanismo de plegamiento. Para un proceso de dos estados, el gráfico tiene forma de V, presentando dos segmentos lineales con pendientes de signos opuestos. Las constantes microscópicas de velocidad de plegamiento y desplegamiento en ausencia de desnaturizante, k_f° y k_d° , se obtienen al extrapolar ambos segmentos o ramas a 0 M de desnaturizante, y las pendientes

indican los valores de m_f y m_D . Una vez que se tienen los valores de ΔG_{DN} y m_{DN} de los experimentos cinéticos, se comparan con los obtenidos al equilibrio y de esta manera se verifica si el proceso es de dos estados. Las diferencias entre los valores cinéticos y al equilibrio sugieren un proceso más complejo.

Además de la presencia de una fase explosiva en las cinéticas, la presencia de curvatura en la rama de replegamiento en el gráfico de chevron sugiere la presencia de un intermediario. La rama de desnaturalización también puede tener curvatura por dos razones principales, una es el desplazamiento gradual del estado de transición a lo largo de la coordenada de reacción (efecto Hammond), y la segunda es la modificación de la vía de plegamiento cuando cambia la concentración de desnaturalizante (Buchner & Kiefhaber, 2005).

Proteínas de unión a ligando (PBPs).

Para poder acercarse un poco más al entendimiento de las bases que rigen al plegamiento, se ha buscado conocer cuáles son las características de dicho proceso y relacionar éstas con su estructura. De esta manera, se ha estudiado la o las vías por las cuales una proteína adopta su estructura tridimensional a partir de su estructura desplegada.

Se tiene información de vías de plegamiento de proteínas modelo, en general proteínas pequeñas de menos de 50 residuos, ya que con estos modelos fue posible utilizar técnicas biofísicas, tales como intercambio protón/deuterio (H/D NMR) o técnicas computacionales que permitieron monitorear o sugerir los cambios de conformación durante las posibles rutas de plegamiento. Sin embargo, sistemas un poco más complejos, como aquellas proteínas que son resultado de duplicaciones génicas, es decir, que presentan dos regiones similares en su estructura, son poco estudiados y resulta interesante conocer cómo se modifican las vías de plegamiento por la presencia de unidades repetidas.

En este sentido, las proteínas periplásmicas de unión (PBPs por sus siglas en inglés) son un buen modelo de estudio, ya que se sugiere que estos sistemas son consecuencia de una duplicación génica. Se han realizado estudios cinéticos y termodinámicos utilizando como modelo a las PBP's, las cuales están asociadas a

transportadores tipo ABC en bacterias gram negativas forman parte de complejos de permeasas que están constituidas por una proteína de unión a ligando (PBP) y un complejo de membrana, formado a su vez por dos proteínas integrales y dos proteínas de unión a nucleótido. Sin la presencia de la PBP, el complejo de membrana se encuentra abierto de cara al citoplasma y al mismo tiempo cerrado del lado del periplasma. Una vez que la PBP une a su ligando, interactúa con el complejo y sufre un cambio conformacional que obliga al extremo citoplasmático a cerrarse. Subsecuentemente, la unión del ATP a las proteínas de unión a nucleótido induce la apertura del extremo periplásmico del complejo y de la PBP para que el sustrato pueda unirse al transportador (Oldham, 2011). Asimismo, las PBPs llevan a cabo dos funciones principales: la unión del sustrato y su asociación al complejo de membrana. Por otra parte, todas las PBPs comparten ciertas características: 1) estructura bilobular, 2) el sitio de unión al ligando ubicado entre los dos dominios, 3) cada dominio contiene motivos estructurales tipo hoja β rodeada por hélices α (Ames, 1992).

La proteína de unión a lisina-arginina-ornitina: características generales y estudio del plegamiento.

Se ha estudiado el plegamiento de la proteína periplásmica de unión a aminoácidos básicos, denominada proteína LAO por las siglas de los aminoácidos que une (lisina, arginina, ornitina). La proteína LAO está formada por 238 residuos de aminoácidos y presenta estructura bilobular (dos dominios resultado de la duplicación génica mencionada). El primer lóbulo (A) es discontinuo y está formado por los residuos 1 al 88 y 195 al 238, el segundo (B) es continuo y lo forman los residuos 93 al 185 (Figura 3). Cada dominio está constituido a su vez por 5 hebras β , cuatro paralelas y una anti paralela, rodeadas por 4 hélices α , y están conectados por dos segmentos polipeptídicos (residuos 89 al 92 y 186 al 194). LAO tiene un puente disulfuro entre los residuos 38 y 45, y dos triptofanos en las posiciones 47 y 130 (Doige, 1993). Las constantes de disociación para los ligandos de LAO son 15 nM, 14 nM, 30 nM y 500 nM para lisina, arginina, ornitina e histidina respectivamente, de acuerdo a estudios de diálisis al equilibrio (Ames, 1994). En la estructura cristalográfica de la proteína se puede observar que los ligandos se unen mediante las interacciones de sus grupos amino y carboxilo con

los residuos Arg 77, Asp 161, Ser 70, Ser 72 y Thr 121. Los anillos aromáticos de los residuos Tyr 14 y Phe 52 interactúan con la cadena lateral formando una estructura tipo sándwich, mientras que los residuos Asp 30 y Ser 69 interactúan con el ligando mediante moléculas de agua. Lo anterior lleva a un cambio conformacional de cuerpo rígido donde la cadena principal de los dominios no sufre modificaciones y mantiene al ligando aislado del solvente. La estructura no muestra interacciones directas entre el ligando y la región de bisagra, lo que sugiere que el cambio conformacional no está dado directamente por la unión del ligando (Oh, 1993).

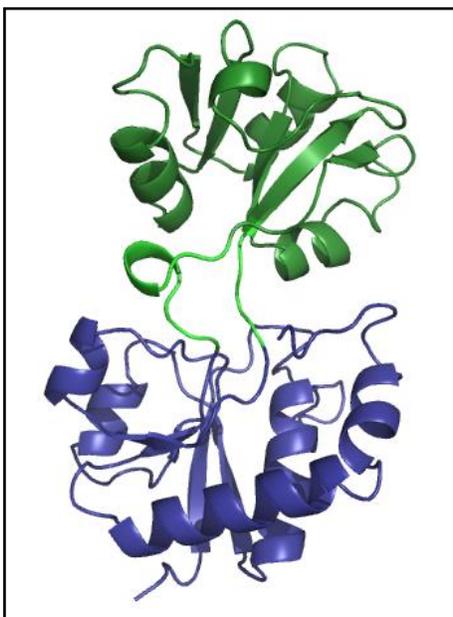


Figura 3. Estructura Cristalográfica de LAO en estado abierto, se muestra en morado la estructura del lóbulo discontinuo (residuos 1-88 y 195-238) y en verde el lóbulo continuo (residuos 93-185).

Estudios de calorimetría de titulación isotérmica para la unión de LAO con histidina y arginina (ligandos de alta y muy alta afinidad, respectivamente), muestran que la unión de ambos aminoácidos está guiada por factores entálpicos. Características termodinámicas en otras proteínas indican que el aumento en la afinidad está relacionado con el aumento en el componente entálpico de manera directa. Se piensa que la diferencia en el $\Delta\Delta H$ entre ambos ligandos (≈ 3 kcal) está dada por dos puentes de hidrógeno en el grupo guanidino de la cadena lateral de la arginina que se forman con el Asp 11 de LAO y que no se encuentran en la unión con la histidina (Pulido *et. al.*, 2015).

Estudios termodinámicos del plegamiento de la proteína LAO indican que dicho proceso no presenta intermediarios estables al equilibrio, es decir, las vías de plegamiento se ajustaron adecuadamente a un modelo de dos estados. Los experimentos de desnaturalización térmica de LAO se siguieron mediante técnicas espectroscópicas (intensidad de fluorescencia y dicroísmo circular), así como calorimetría de barrido diferencial (DSC) (Figura 4A y 4B, respectivamente). En estas condiciones LAO presenta una reversibilidad mayor al 90%. Los valores de ΔH y T_m obtenidos por calorimetría son muy similares a los valores obtenidos a partir de los datos espectroscópicos, lo cual confirma que al equilibrio el plegamiento de LAO es un proceso de dos estados. Asimismo, los experimentos de desnaturalización química inducida por urea se ajustaron a un modelo de dos estados (Figura 5).

En contraste con la información termodinámica, los experimentos cinéticos muestran mayor complejidad. El gráfico del logaritmo natural de la constante de velocidad de renaturalización contra la concentración de urea (gráfico de chevron) presenta dos ramas con curvatura a concentraciones bajas de desnaturalizante, sugiriendo la presencia de al menos un intermediario cinético así como heterogeneidad conformacional durante el proceso (Figura 6B). Las cinéticas de desnaturalización fueron mono exponenciales y la rama en el gráfico de chevron para este proceso no mostró curvatura.

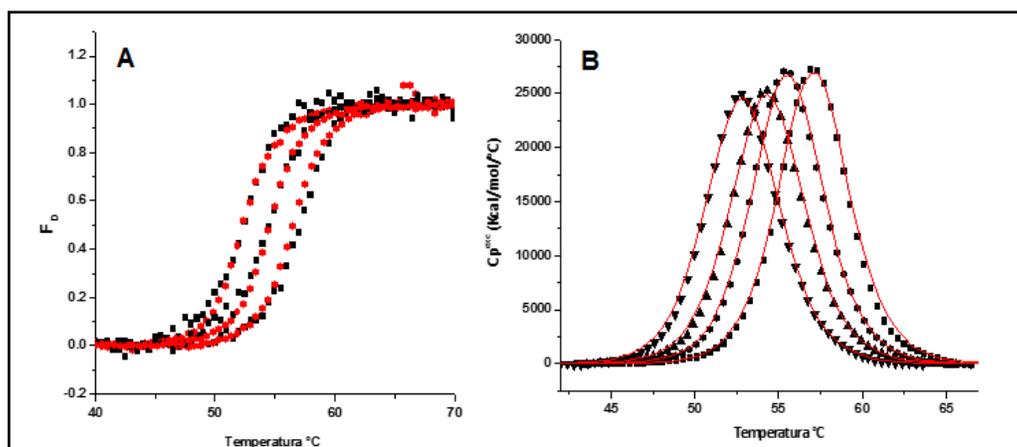


Figura 4. Curvas de fracción desnaturalizada de la proteína LAO en los experimentos de desnaturalización térmica seguidos por intensidad de fluorescencia (■) y DC (●), a pH 8.0, 8.5 y 9.0 (A). Ajuste a un modelo de dos estados (—) de las trazas calorimétricas de desplegamiento de LAO a pH 8.0, 8.5, 9.0 y 9.5 (B) (Vergara, 2011).

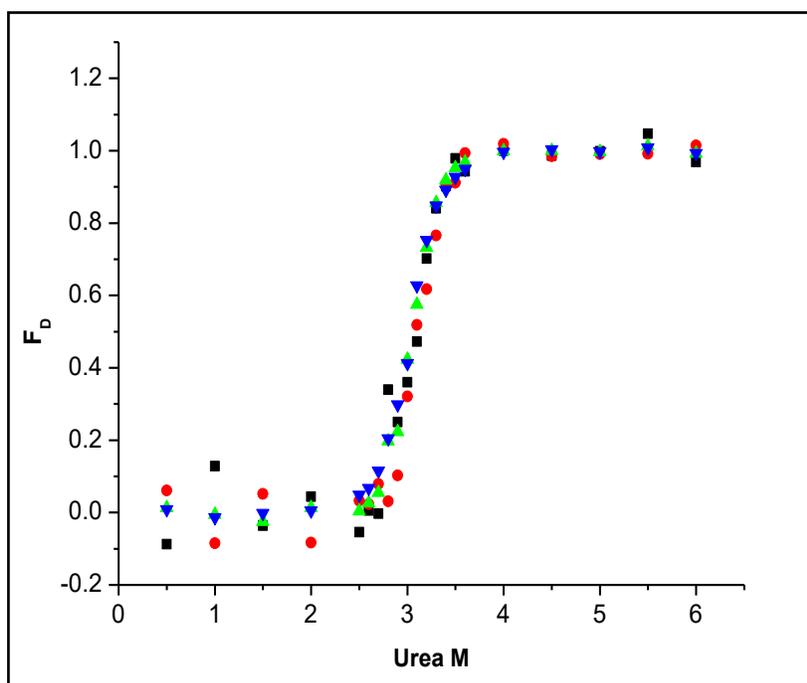


Figura 5. Comparación de las curvas de fracción de proteína desnaturalizada de LAO seguida por IF (\blacktriangledown) y DC a 220 nm (\blacktriangle) 285 nm (\blacksquare) y 295 nm (\bullet). (Vergara, 2011).

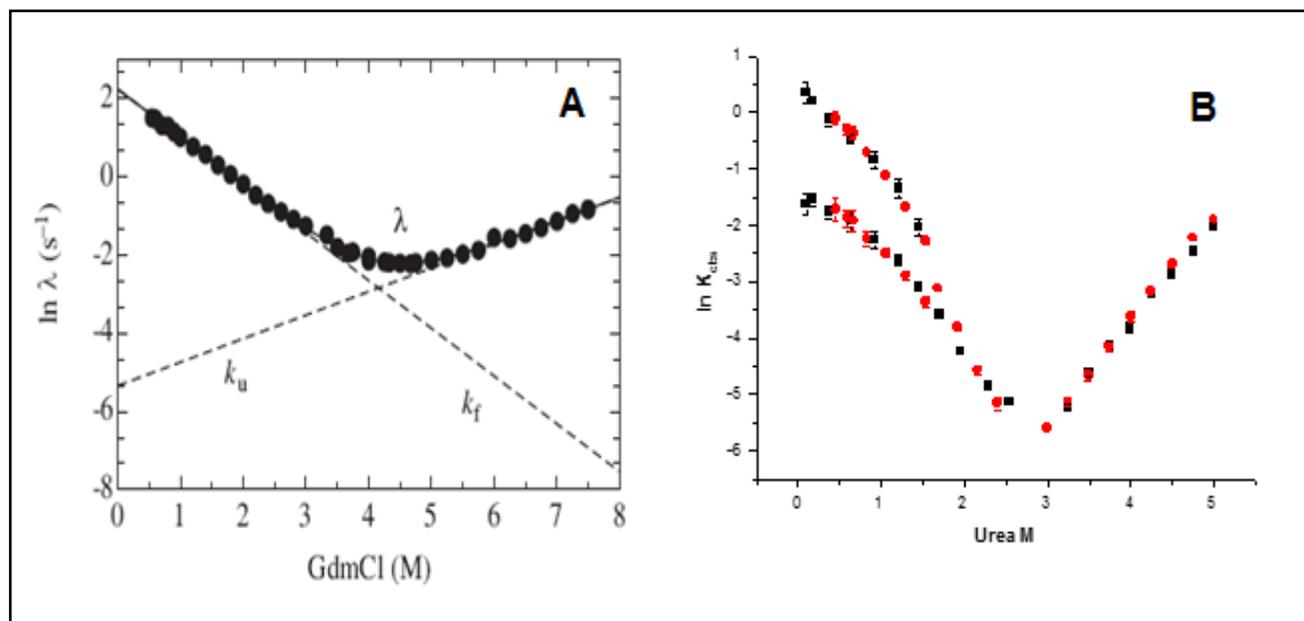


Figura 6. Gráfico de chevron representativo para un plegamiento de dos estados (A) (Kiefhaber, 2005). Gráfico de chevron obtenido de los experimentos de desnaturalización y renaturalización de LAO a distintas concentraciones de urea seguidos por DC (rojo) y fluorescencia (negro) (B) (Vergara, 2011).

Experimentos de doble salto y replegamiento en presencia de ciclofilina mostraron que la rama lenta es consecuencia del proceso de isomerización de prolina; sin embargo, la curvatura de la rama rápida no desapareció, sugiriendo la formación de un intermediario de alta energía en el replegamiento de LAO. Al ajustar los datos obtenidos mediante estudios cinéticos se llegó a la conclusión de que el mecanismo más sencillo y que mejor describe el plegamiento de LAO es de tres estados con un intermediario dentro de la vía (Figura 7). Asimismo, la β de Tanford, calculada para el intermediario y el estado de transición sugieren que el área accesible al solvente para ambas especies es aproximadamente la mitad del área en el estado nativo. Lo anterior permite tener una pista de la estructura del intermediario de LAO donde un lóbulo esté desplegado y el otro plegado o que ambos dominios se encuentren parcialmente plegados. Por otra parte, se realizaron estudios con una mutante de LAO en la que se cambió el residuo P16 por una alanina, y la mutante fue $2.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ menos estable que LAO *wt*. Experimentos cinéticos realizados con P16A mostraron que la constante lenta observada en el replegamiento de LAO *wt* está dada por la isomerización de la prolina 16. Además, experimentos de ITC indicaron que la presencia del isómero *cis* de la prolina 16 es importante para la unión de la histidina, ya que en la mutante el ΔH y ΔS se ven afectados y esto repercute en la afinidad de LAO por su ligando (Vergara, 2015).

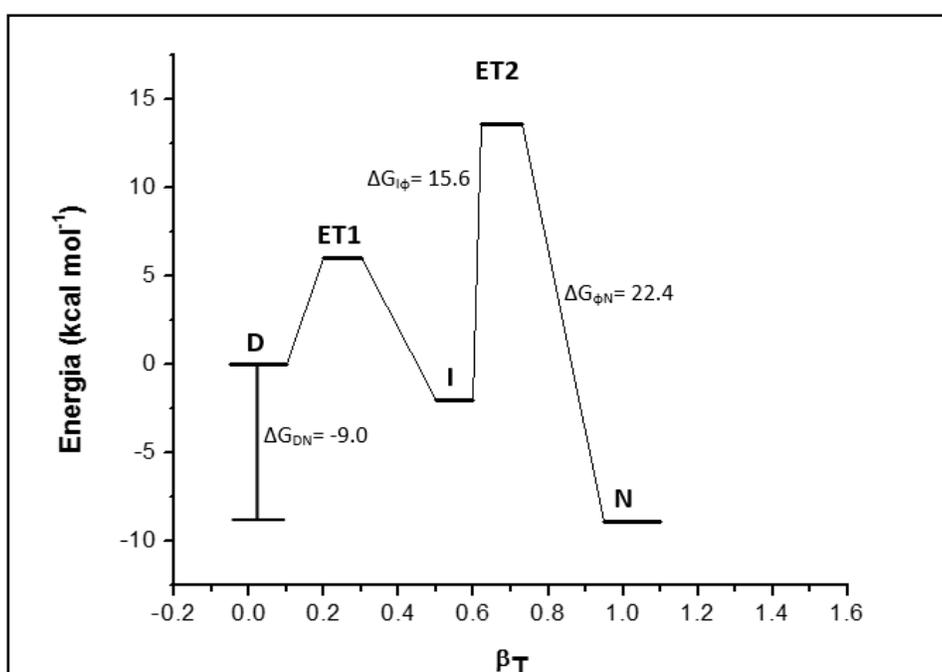


Figura 7. Coordenada de reacción de LAO (Vergara, 2015).

Por otra parte, se realizó una caracterización preliminar *in silico* del proceso de desnaturalización de la proteína LAO con y sin ligando, utilizando el servidor CNA (Constraint Network Analysis). Este enfoque consistió en aumentar la energía cinética en un sistema denominado de grano grueso; dicho experimento *in silico* sería análogo a una desnaturalización térmica. A partir de este proceso se analiza la flexibilidad global y local durante los cambios de energía (temperatura del sistema), así como las características de rigidez de las proteínas. Lo anterior permite sugerir los rearrreglos de rigidez y flexibilidad a lo largo de la estructura de la proteína y las regiones que son más susceptibles a la desnaturalización térmica. El enfoque ha sido utilizado para predecir la termoestabilidad de las proteínas y para identificar puntos débiles estructurales o posibles vías de desplegamiento (Krüger D, 2013).

De lo anterior, se llegó a la conclusión de que, como ya se esperaba, las hélices α son más rígidas que las hojas β . Además, los residuos que pueden iniciar el proceso de desplegamiento de la proteína (núcleo de desplegamiento) son similares pero no idénticos cuando está en presencia o ausencia de sus ligandos. La mayor parte de dichos residuos se encuentran en el lóbulo discontinuo (A) y forman parte de las hojas β . También es interesante que la proteína termófila sea más rígida que su homóloga mesófila LAO en algunas regiones, pero en otras es más flexibles (Berrocal, 2015).

Dado que se considera que las PBPs derivan de una duplicación génica a juzgar por la similitud en su estructura tridimensional, su mecanismo de unión a ligando y la estructura del operón en sus genes (Fukami-Kobayashi, 1999), surgen varias preguntas, entre ellas si los lóbulos se pliegan independientemente o el plegamiento de uno afecta al del otro (cooperatividad). Por ello nos interesa estudiar por separado los lóbulos de la proteína LAO (Figura 8A Y 8B), como ya se ha hecho con la proteína de unión a histidina HisJ (Chu, Byron C.H., 2013), de donde se sabe que uno de los lóbulos puede unir por sí solo a la histidina y que la región de bisagra que une ambos lóbulos es crítica para su función.

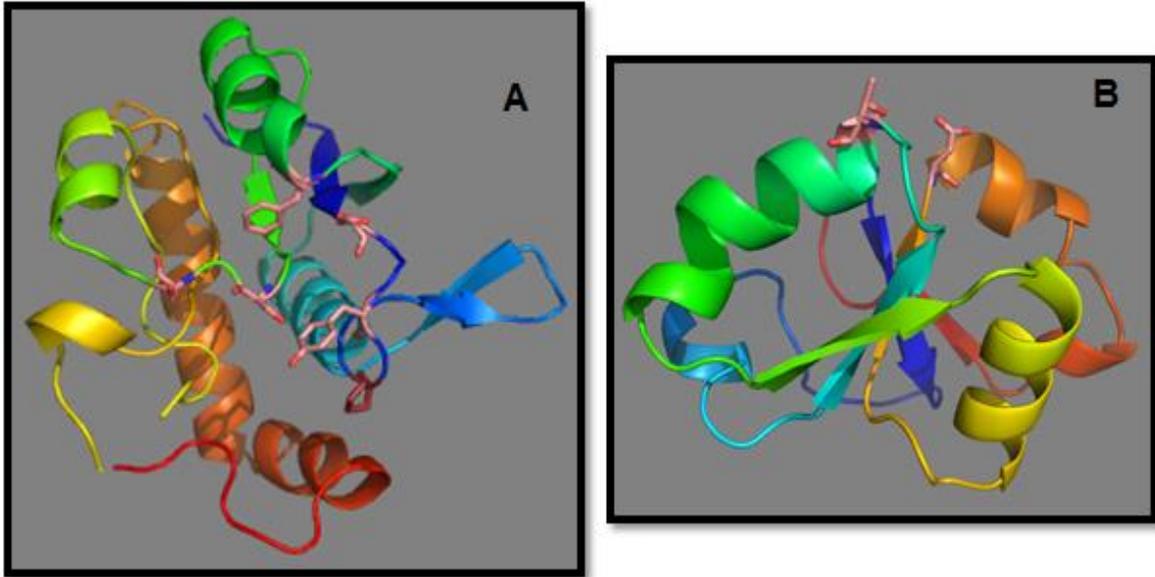


Figura 8. Lóbulos de la proteína LAO. El lóbulo discontinuo (A) abarca los residuos 1-91 y 185-238, mientras que el lóbulo continuo (B) está formado por los residuos 92-184. Así mismo, resaltan los amino ácidos que hacen contacto directo con los ligantes de LAO.

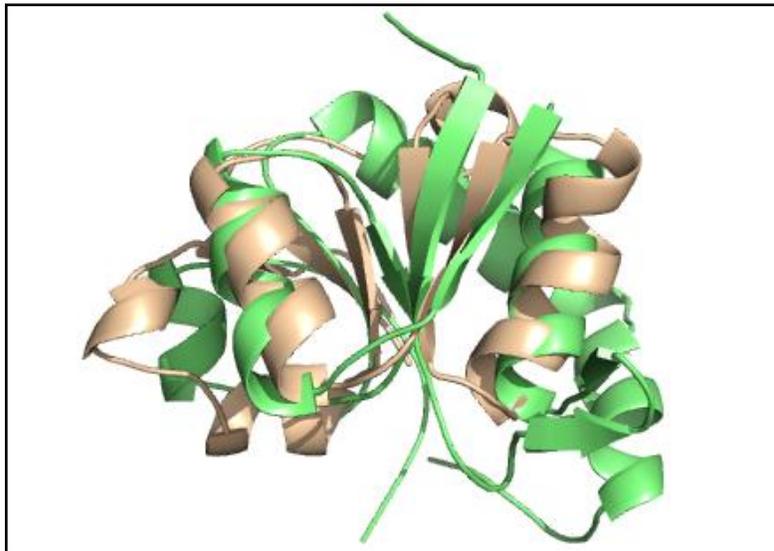


Figura 9. Alineamiento del lóbulo A (verde) y B (beige) de la proteína LAO. El RMSD resultante es de 1.224 Å.

En el laboratorio se cuenta con las construcciones que contienen los genes de cada lóbulo de la proteína LAO para que se expresen de manera independiente.

Objetivo general.

- Caracterizar experimentalmente el plegamiento de los lóbulos de LAO al expresarlos de manera independiente.

Objetivos particulares.

- Realizar la caracterización termodinámica del desplegamiento de los lóbulos de la proteína LAO mediante desnaturalización térmica seguida por fluorescencia y dicroísmo circular, a distintas condiciones de pH.
- Realizar la caracterización termodinámica del desplegamiento de los lóbulos de la proteína LAO mediante desnaturalización por urea, seguida por fluorescencia y dicroísmo circular.
- Realizar la caracterización cinética del plegamiento de los lóbulos de la proteína LAO utilizando la técnica de stopped-flow seguida por fluorescencia y dicroísmo circular.

Materiales y Métodos.

Diseño de los lóbulos A y B de la proteína LAO.

El diseño de los lóbulos A y B se generó en colaboración con los Drs. Daniel A. Silva y Luis A. Téllez. El lóbulo A (discontinuo) incluye el mismo péptido señal que la proteína LAO y la unión de los residuos aspártico 91 y valina 185 (residuos donde se cortó la región de bisagra) para darle continuidad a la proteína. El diseño del lóbulo B presenta un péptido señal diferente al de LAO, uno que se adecua más a la secuencia contigua, además, dado que es continuo, no hubo necesidad de agregar residuos extra. Con la colaboración del estudiante de licenciatura Andrés Escandón Flores se procedió a amplificar y clonar los genes en el vector de expresión pET3-b para después purificar las proteínas.

Expresión y purificación de los lóbulos A y B de la proteína LAO.

Se utilizó la cepa BL21 A1 de *Escherichia coli* para la sobreexpresión de los lóbulos A y B. Dicha cepa presenta dentro de su genoma el gen de la RNA polimerasa T7 que está bajo control del promotor araBAD. Se transformaron 100 μ L de células electro competentes con el plásmido portador del gen de los lóbulos A y B (pEt-3b) y se inocularon dos tubos de 10 mL con medio LB + ampicilina (100 μ g/mL) por cada proteína (50 μ L de células por tubo). Los cultivos se incubaron toda la noche a 37 °C, con agitación orbital a 250 rpm. Se procedió entonces a inocular cuatro matraces (dos para cada proteína) de 1 L con 250 mL de medio LB + ampicilina durante 1 h (37 °C, 250 rpm). Transcurrido el tiempo se transfirió cada cultivo a un matraz de 2 L con 750 mL de medio LB + ampicilina, se dejó crecer hasta alcanzar una DO_{550} entre 0.8 y 1 y se indujo la expresión de ambas proteínas utilizando arabinosa al 0.25 % y se incubó por 4 h. Se colectaron los 4 L de medio (2 L para cada proteína) en tubos y se centrifugaron en la centrífuga Sorvall RC 6+ con el rotor SLA-1500 a 5,000 rpm durante 15 minutos. Se desechó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió utilizando 50 mL de una solución de Tris 50 mM, pH 7.5 para cada tubo con la finalidad de lavar y eliminar el medio remanente. Las células resultantes para cada proteína se juntaron para tener sólo dos tubos por proteína y centrifugar a 5,000 rpm por 15 min. Se desechó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en una solución de sacarosa al 20 % y 1 mM de EDTA, en amortiguador de acetato de potasio (AcK) 10 mM, pH 5.1 (50 mL por tubo). Posteriormente se dejaron reposar en hielo por 10 min y se centrifugaron a 5,000 rpm, 15 min. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular utilizando AcK 10 mM, pH 5.1 (30 mL por tubo) para ocasionar choque osmótico y liberar a las proteínas del periplasma celular. Por último, se centrifugó a 10,000 rpm, 20 min y se colectó el sobrenadante con las proteínas. El sobrenadante se filtró utilizando un filtro WHATMAN® para jeringa de poro 0.2 μ m para después concentrar hasta un volumen de 10 mL con un tubo Amicon® Ultra-15 10 K. Hasta este paso se realizó un gel desnaturizante (SDS-PAGE) para comprobar que los productos obtenidos eran los deseados.

Para eliminar la mayor cantidad de ligando posible, se añadió una solución de bis-tris-propano 5 mM, pH 8.5, con 2 M de cloruro de guanidinio (GdnCl), y se llevó a un volumen de 50 mL para volver a concentrar a 10 mL. Lo anterior se realizó cinco veces. Para renaturalizar al lóbulo A y eliminar el desnaturante se utilizó bis-tris-propano 5 mM, pH 8.5 en un tubo Amicon® con una membrana de corte de 5 kDa y se llevó a un volumen de 50 mL para después concentrarlo a 10 mL, el proceso se repitió cinco veces.

Al purificar las proteínas se utilizó una columna de intercambio aniónico (Source 15Q) equilibrada con bis-tris-propano 5 mM, pH 8.5, conectada a un equipo HPLC Waters 600. Los 10 mL de proteína se colectaron del tubo Amicon® y se filtraron para inyectarse al equipo. Al inicio, se aplicó un gradiente de 0 % a 30 % de una solución de NaCl 250 mM, en 90 min. La proteína eluyó a una concentración de 50 mM (20 %) de sal. Las fracciones obtenidas se colectaron en un tubo Amicon® Ultra-15 10K partiendo de un volumen de 4 mL para concentrar a un volumen de 2 mL centrifugando a 5000 rpm. Se agregó entonces, bis-tris-propano 10 mM hasta un volumen de 4 mL y se concentró hasta 2 mL repitiendo este paso cinco veces para eliminar la sal proveniente del gradiente y dejar a la proteína en las condiciones requeridas para los experimentos posteriores. La muestra se concentró hasta 4 mL y se alicuotó en fracciones de 1 mL para almacenarlas.

Experimentos de desnaturalización del Lóbulo A.

Con la finalidad de conocer si el lóbulo A presenta estructura secundaria se realizaron experimentos de desnaturalización térmica seguida por DC (dicroísmo circular) a 220 nm utilizando el espectropolarímetro JASCO J715 con una celda de cuarzo de 0.1 cm de paso de luz y se aumentó la temperatura de 20 °C a 75 °C con una velocidad de barrido de 0.5 °C por minuto. Lo anterior se repitió utilizando un espectropolarímetro Chirascan™ de AppliedPhotophysics en un intervalo de temperatura de 25 a 80 °C con la misma velocidad de barrido.

Además, se realizaron experimentos de desnaturalización del lóbulo A a distintas concentraciones de urea (0.25 a 5 M) seguidos por DC a 220 nm.

Ensayos cinéticos de renaturalización y desnaturalización del lóbulo A.

Las cinéticas de renaturalización se llevaron a cabo a partir de una muestra de lóbulo A (1.1 mg/mL) desnaturalizada en 5 M de urea, la cual se mezcló en la cámara de observación con las soluciones de urea adecuadas para llegar a concentraciones de 2.75 M a 0.45 M de desnaturalizante. Los experimentos de desnaturalización se realizaron a partir de una muestra de lóbulo A (1.1 mg/mL) en ausencia de urea y se mezcló con las soluciones adecuadas de desnaturalizante para alcanzar concentraciones finales de 0.36 M a 5 M. Todo lo anterior utilizando el módulo de *stopped-flow* de un espectropolarímetro Chirascan™ de AppliedPhotophysics (Figura 10), donde dos soluciones (amortiguador y proteína + urea) se mezclan rápidamente y el flujo se detiene en una cámara de observación. Dicha celda es iluminada y la luz transmitida o emitida se mide con detectores en función del tiempo.

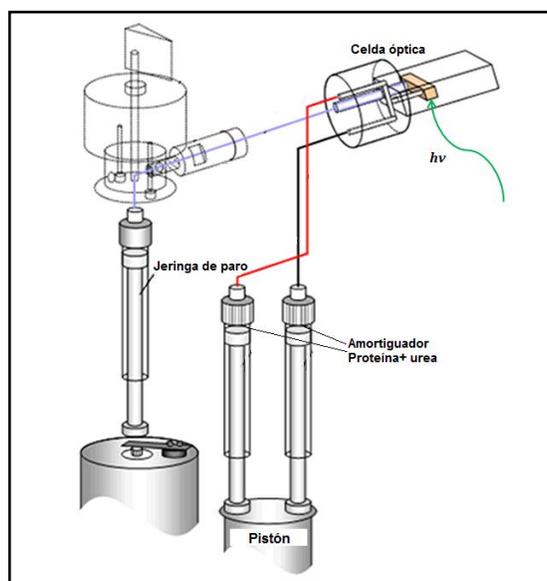


Figura 10. Módulo de stopped flow del espectropolarímetro Chirascan™ de AppliedPhotophysics (Modificado de Photophysics.com, 2016).

Calorimetría de titulación isotérmica (ITC) del lóbulo A.

Para los experimentos de ITC se utilizó un microcalorímetro ITC₂₀₀ de Malvern (GE Healthcare). Se realizaron 17 inyecciones consecutivas de 2 μ L de ligando (arginina, 20 mM) a una muestra con 250 μ L de lóbulo A (0.27 mM) hasta saturación, utilizando HEPES 10 mM, pH 8.0 como amortiguador. El experimento se realizó a temperatura ambiente.

Análisis de datos.

Para los experimentos de desnaturalización térmica al equilibrio se normalizaron los datos convirtiéndolos a fracción de proteína desnaturalizada basado en un modelo de dos estados (Ec. 1 y Ec. 2)



$$f_D = \frac{(y_{obs} - (y_N + m_{NT}))}{((y_D + m_{DT}) - (y_N + m_{NT}))} \quad \text{Ec. 2}$$

Donde f_D es la fracción de proteína desnaturalizada, y_{obs} es la señal seguida por DC, y $y_D + m_{DT}$ y $y_N + m_{NT}$ son las ecuaciones de una línea recta para el ajuste de las zonas de pre y post transición (y = ordenada al origen, m = pendiente y T = temperatura a la que se llevó a cabo el experimento en grados Kelvin o [urea]).

A partir de las transiciones se obtuvieron las constantes de equilibrio (Ec. 3). Los valores de ΔH y T_m se obtuvieron a partir del gráfico construido con el logaritmo natural de la constante de equilibrio (K) y el inverso de la temperatura absoluta (T) (gráfico de van't Hoff, Ec. 4).

$$K_{eq} = \frac{1-f_D}{f_D} \quad \text{Ec. 3}$$

$$\ln K_{eq} = -\frac{\Delta H_{vh}}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{Ec. 4}$$

Dónde:

K_{eq} es la constante de equilibrio

ΔH_{vh} es la variación de la entalpía de van't Hoff

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

ΔS es la variación de la entropía

T es la temperatura absoluta

Para la construcción del gráfico estabilidad se utilizó la ecuación de Gibbs-Helmholtz (Ec. 5).

$$\Delta G = \Delta H \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) - \Delta Cp \left(T_m - T + T \ln \left(\frac{T}{T_m}\right)\right) \quad \text{Ec. 5}$$

Dónde:

ΔG es la variación de la energía libre de Gibbs

ΔH es la variación de la entalpía

T es la temperatura

T_m es la temperatura a la que el 50 % de la proteína está en estado nativo y el otro 50 % está en estado desnaturizado

ΔCp es la variación en el calor específico

Los datos obtenidos para la desnaturización con urea se trataron utilizando la Ec. 1 para transformarlos a fracción de proteína desnaturizada y se ajustaron a un modelo de dos estados con la ecuación de Santoro y Bolen (Ec. 6).

$$y_{obs} = \frac{\left\{ (y_N + m_N[urea]) * e^{-\left(\frac{\Delta G_{H2O} - m_N[urea]}{RT}\right)} \right\}}{\left[1 + e^{-\left(\frac{\Delta G_{H2O} - m_{ND}[urea]}{RT}\right)} \right]} \quad \text{Ec. 6}$$

Dónde:

ΔG_{H_2O} es la energía libre de desnaturalización en ausencia de urea

m es la pendiente de la transición, que se relaciona con el área accesible al solvente.

Los experimento cinéticos se ajustaron a una o dos exponenciales (Ec. 7 y 8, respectivamente) utilizando Origin® 8. Una vez ajustados los datos de repliegamiento y desplegamiento se construyeron los gráficos de chevrón.

$$y = y_0 + A_1 e^{x/t_1} \quad \text{Ec. 7}$$

$$y = y_0 + A_1 e^{x/t_1} + A_2 e^{x/t_2} \quad \text{Ec. 8}$$

Los experimentos de ITC arrojaron una constante de asociación y con ella se calculó la constante de disociación para el ligando utilizando la ecuación 15.

$$K_d = \frac{P+L}{PL} \quad \text{Ec. 9}$$

$$P + L = (K_d)(PL) \quad \text{Ec. 10}$$

$$K_A = \frac{PL}{P+L} \quad \text{Ec. 11}$$

$$P + L = \frac{PL}{K_A} \quad \text{Ec. 12}$$

$$(K_d)(PL) = \frac{PL}{K_A} \quad \text{Ec. 13}$$

$$K_d = \frac{PL}{(K_A)(PL)} \quad \text{Ec. 14}$$

$$K_d = \frac{1}{K_A} \quad \text{Ec. 15}$$

Dónde:

K_A = Constante de asociación

K_d = Constante de disociación

PL = Complejo proteína-ligando

$P + L$ = Disociación del complejo proteína-ligando

Resultados.

Para comprobar si el plegamiento de los dominios de LAO expresados de manera independiente es más complejo que el de la proteína completa, se llevaron a cabo experimentos al equilibrio y cinéticos. Desafortunadamente, para este trabajo no se logró expresar el lóbulo B de la proteína, pero sí se pudo caracterizar al lóbulo A. Para dicho dominio, los ensayos al equilibrio mostraron que su plegamiento es de dos estados; sin embargo, así como con LAO, los estudios cinéticos mostraron mayor complejidad. A concentraciones bajas de urea, las curvas de renaturalización son biexponenciales, lo que se refleja en la presencia de dos ramas en esta área del chevrón, las cuales tienen curvatura. De la misma manera, se observa la presencia de dos ramas a concentraciones altas de urea en el gráfico de chevrón (Figura 18 A).

Expresión y purificación de los lóbulos A y B de la proteína LAO.

El lóbulo A se expresó abundantemente y el peso de la proteína corresponde con el esperado (~14.5 kDa), como se muestra en la figura 11 B. De acuerdo a un gel de electroforesis en presencia de SDS, las bandas contaminantes que se observan alrededor de los 35 kDa desaparecen después de la cromatografía de intercambio aniónico (Figura 11 A) y en purificaciones posteriores se pudo obtener una cantidad abundante de proteína (alrededor de 5 mg por litro de medio, Figura 12). Sin embargo, el lóbulo B presentó un peso molecular mayor a los 35 kD (Figura 11B), lo cual no coincide con el peso esperado (~11.6 kDa), e incluso es superior al peso de LAO (26 kD). A partir de estos resultados decidimos comenzar con la purificación y caracterización termodinámica del lóbulo A, no así con la del lóbulo B, debido a que se obtuvo un producto diferente al esperado.

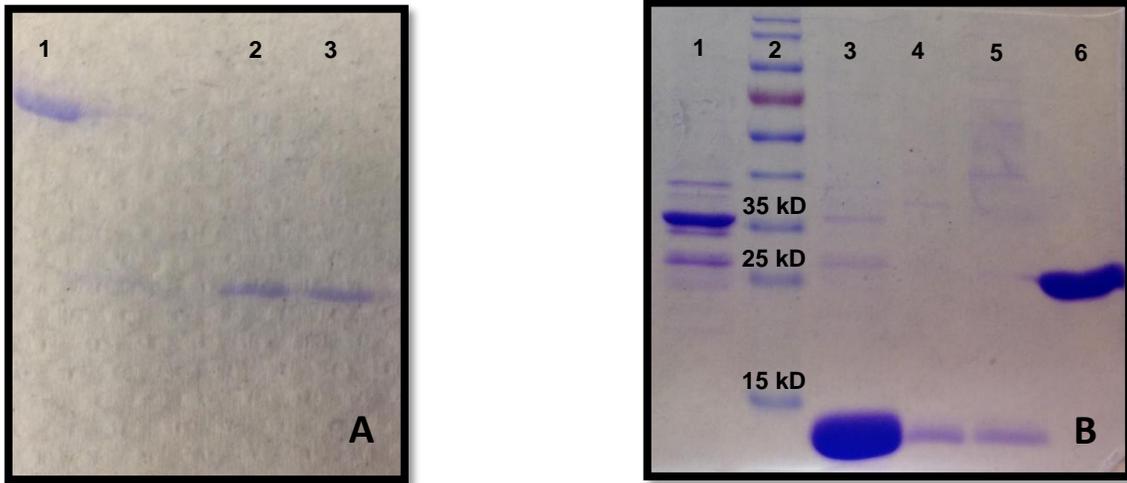


Figura 11. (A) Gel SDS-PAGE de la purificación del lóbulo A después de la cromatografía de intercambio aniónico. En cada uno de los carriles se muestra: 1) LAO pura, 2) y 3) Lóbulo A puro. (B) Gel desnaturalizante (SDS-PAGE) que muestra los pesos de los productos de sub-clonación posterior al choque osmótico. En cada carril se muestra: 1) el producto obtenido de la purificación del lóbulo B, 2) marcador de peso molecular, 3) sobre expresión del lóbulo A, 6) LAO pura.

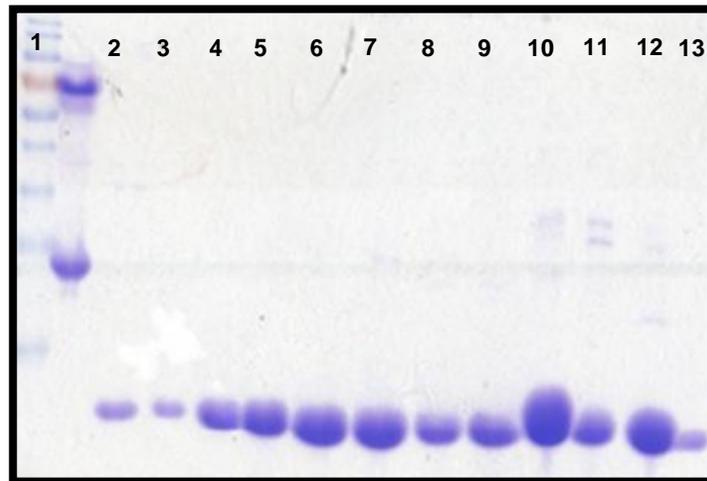


Figura 12. Sobreexpresión del lóbulo A, el gel SDS-PAGE se realizó posterior a la purificación de dicha proteína. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular, mientras que los carriles del 2 a 13 muestran la sobreexpresión del lóbulo A.

|

Experimentos de desnaturalización térmica del lóbulo A.

Una vez que el lóbulo A se purificó, se tomó un espectro de DC a 25 °C para saber si la proteína presenta estructura secundaria, es decir, se encuentra plegada. Para este experimento, la muestra de dicha proteína se preparó a una concentración de 0.2 mg/mL. Como se puede observar en la Figura 13 A, el lóbulo A presenta a 25 °C un espectro característico de una proteína con estructura secundaria con dos mínimos, uno en 210 nm y otro en 220 nm, que corresponden a la presencia de estructuras α -hélice y hebras- β . A 80 °C se observa la pérdida de señal, ya que sólo se conserva un mínimo de la señal a 200 nm, lo que indica que la proteína perdió estructura. Dicha figura también muestra el espectro de renaturalización del lóbulo A (13 B), cuya forma es casi idéntica a la que se observa a 25 °C antes de la desnaturalización térmica, lo que indica que el desplegamiento del lóbulo A es reversible. Dicha característica permite caracterizar a la proteína al equilibrio.

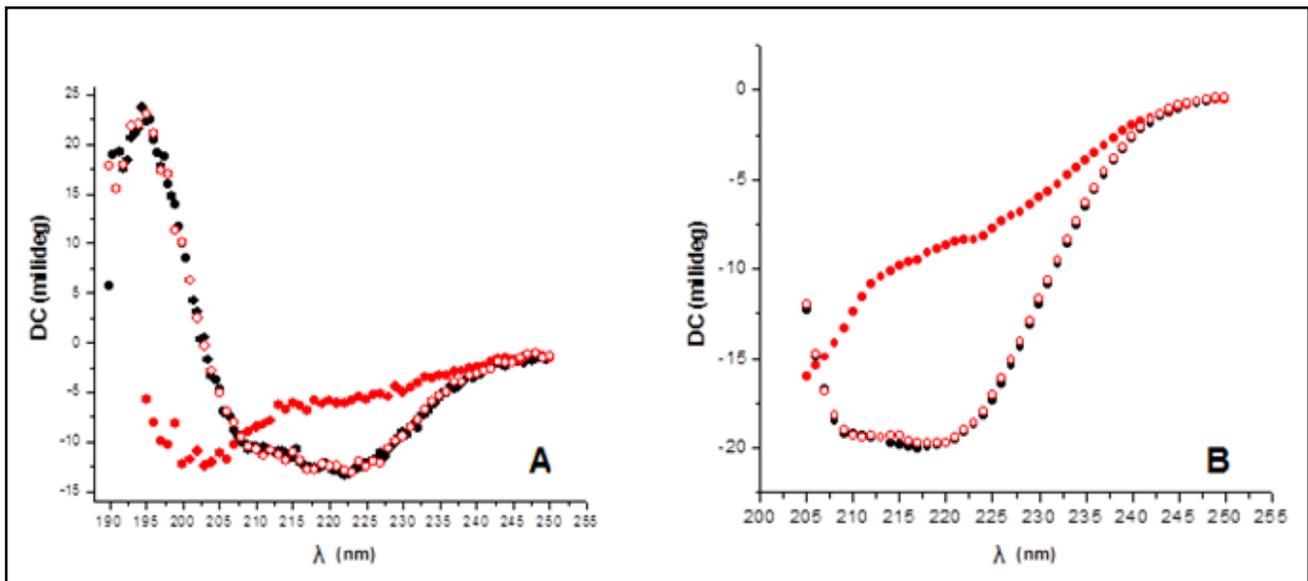


Figura 13. Espectro de DC para el lóbulo A en bis-tris propano 10 mM pH 9 a 25 °C (●), 80 °C (●) y al enfriar nuevamente hasta 25 °C (○) (A). Espectro de DC para LAO en bis-tris propano 10 mM pH 9 a 20 °C (●), 75 °C (●) y al enfriar nuevamente hasta 20 °C (○) (B).

La curva de desnaturalización del lóbulo A seguida por DC resultó ser monofásica, con una transición entre 45 y 65 °C, que es característico de un proceso cooperativo y de proteínas con estructura definida. Los datos de desnaturalización se normalizaron para tener la curva de la fracción desnaturalizada del lóbulo A a cada temperatura, la cual se comparó con la curva para LAO (Figura 14). Como se muestra, la curva para el lóbulo A presenta una sola transición al igual que LAO, lo cual es característico para un proceso de dos estados. Sin embargo, la curva del lóbulo A tiene una pendiente menor en comparación con LAO silvestre, lo que indica que su proceso de desnaturalización es menos cooperativo.

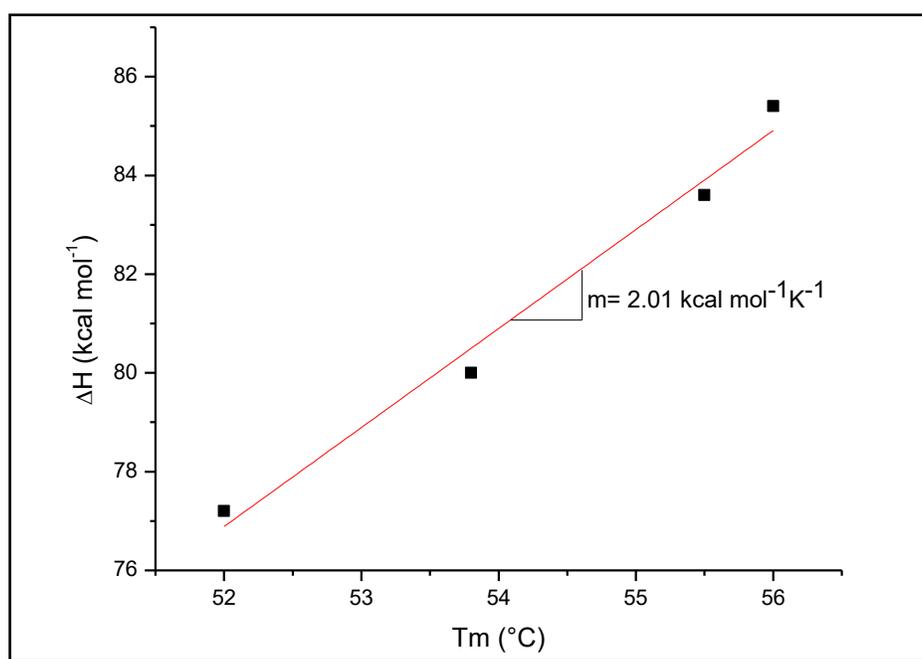


Figura 14. Curvas de fracción desnaturalizada de LAO (●) y lóbulo A (■) para los experimentos de desnaturalización térmica seguidos por DC.

De las curvas anteriores (termogramas) se obtuvieron los valores de ΔH y T_m para el lóbulo A y se compararon con los de LAO (Tabla 1). Se observó una diferencia de ~100 kcal en los valores de ΔH así como una disminución en el valor de la T_m de aproximadamente 2 °C. Estos resultados sugieren que existe una disminución en la estabilidad de la proteína cuando sólo se compone del lóbulo A, que se observa en la disminución del ΔH a más de la mitad del total de la proteína. Esto hace sentido, ya que disminuimos el número de contactos, pues contamos con la mitad de la estructura. Sin embargo, el cambio en la T_m no es tan significativo como se hubiera esperado.

Tabla 1. Valores de ΔH y T_m calculados a partir de las curvas de desnaturalización térmica de los experimentos seguidos por DC.

pH 8.0	LAO	Lóbulo A
ΔH (Kcal mol ⁻¹)	148	48
T_m (°C)	57	55

Una vez que se tuvo conocimiento de la presencia de estructura secundaria en el lóbulo A y que su desnaturalización térmica es reversible y cooperativa, se llevó a cabo la desnaturalización y renaturalización térmica utilizando el espectropolarímetro CHIRASCAN a pH 8 y 9 (Figura 15 A y 15 B, respectivamente).

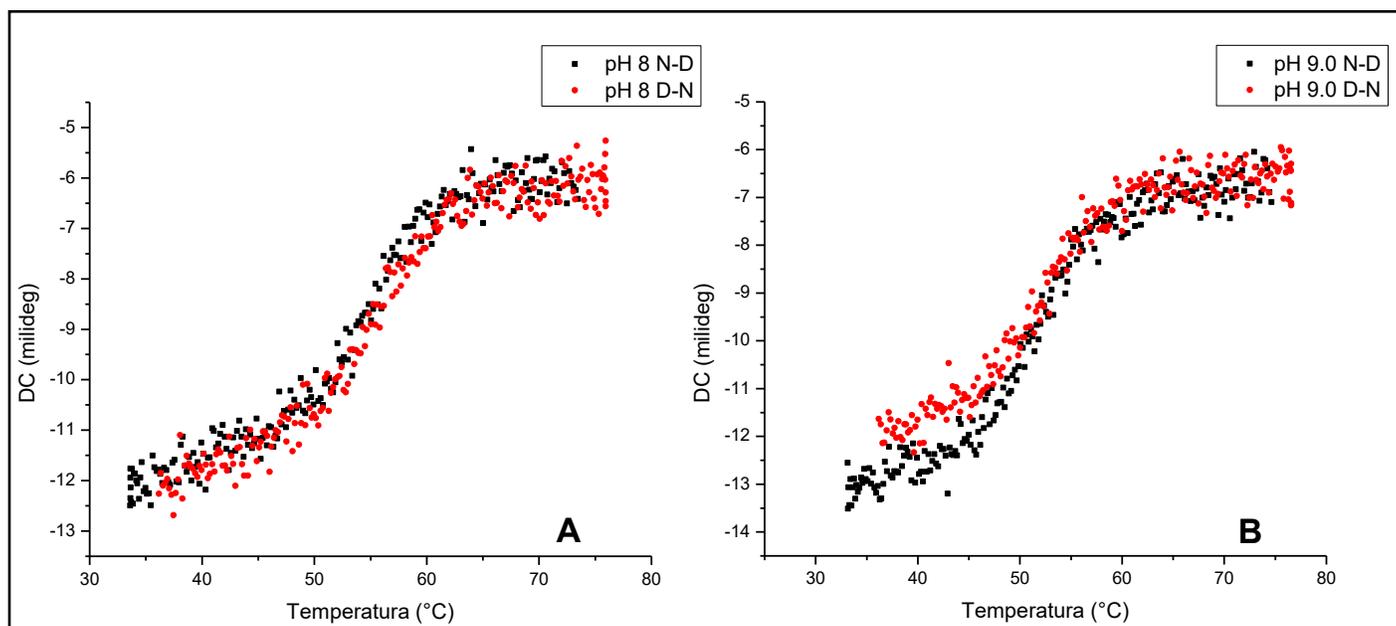


Figura 15. Desnaturalización y renaturalización del lóbulo A por temperatura seguida por DC a 222 nm, pH 8 (A) y 9 (B) (Chirascan). Para cada gráfica se observa la curva del estado nativo al estado desnaturalizado (N-D)(■) y del estado desnaturalizado al estado nativo (D-N)(●).

Como se puede ver en la figura anterior, a pH 8 la proteína tiene un desplegamiento reversible y cooperativo; a pH 9 la proteína presenta un desplegamiento cooperativo pero con una reversibilidad menor a la observada a pH 8.

La Figura 16 muestra los espectros de dicroísmo circular del lóbulo A a pH 8 (A), 8.5 (B), 9 (C) y 9.5 (D). Primero se tomaron los datos a 25 °C (■), posteriormente la muestra se calentó a 80 °C (●), donde se observa la pérdida de estructura secundaria, y se enfrió la muestra a 25 °C (▲), donde se observa que la proteína recuperó su estructura.

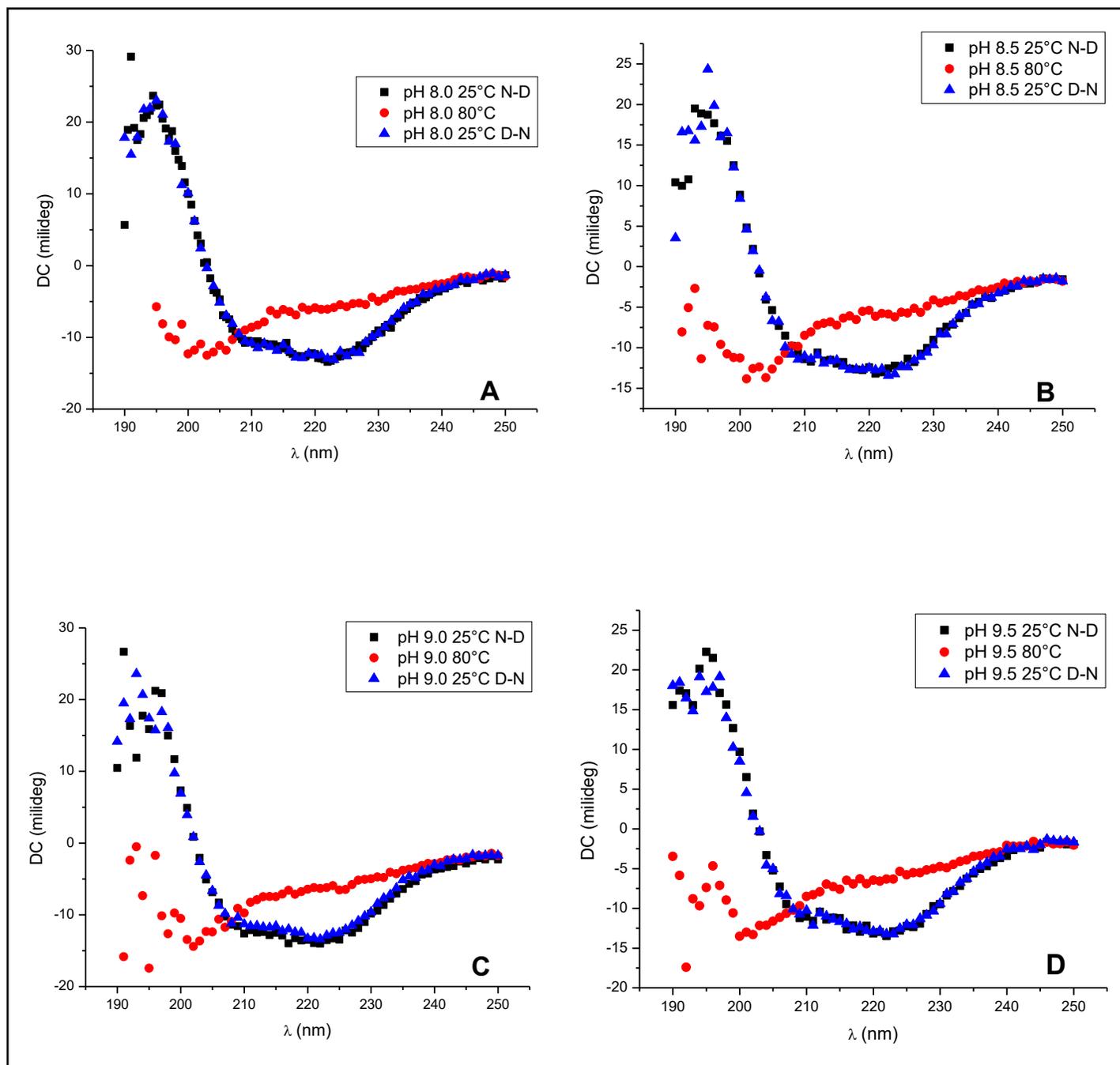


Figura 16. Espectros de DC tomados a 25 °C, 80 °C y 25 °C (renaturalización), para el lóbulo A a pH 8 (A), 8.5 (B), 9 (C) y 9.5 (D) (Chirascan).

Posteriormente, se graficó la fracción de proteína desnaturizada del lóbulo A con respecto a la temperatura a diferentes valores de pH. La Figura 17 y la Tabla 2 muestran la pérdida de estabilidad al aumentar el pH. Un tanto similar al patrón observado por la proteína nativa LAO (Vergara, 2011).

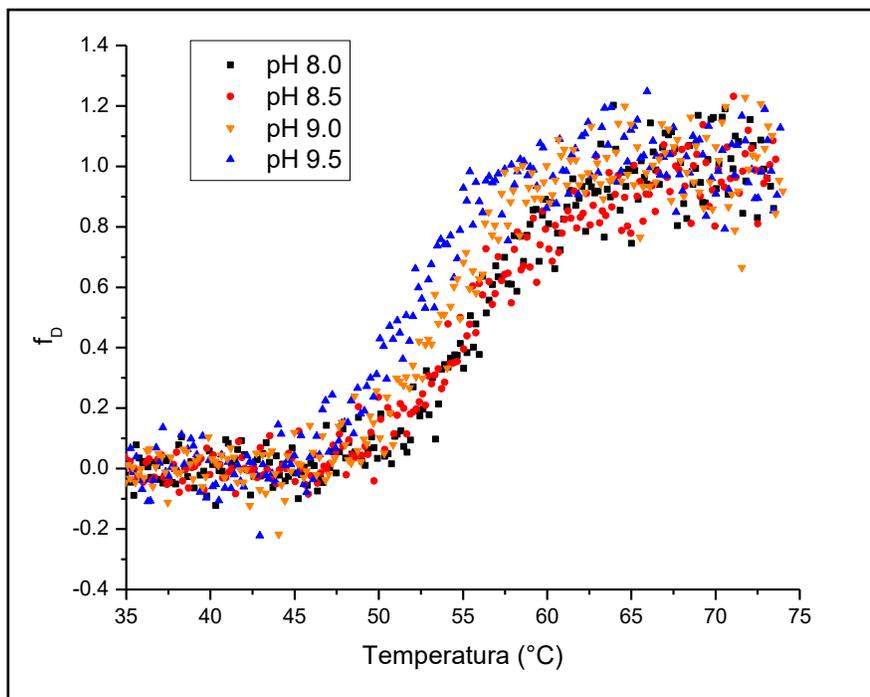


Figura 17. Fracción desnaturizada del lóbulo A a diferentes pH (8, 8.5, 9 y 9.5). Datos obtenidos por dicroísmo circular (Chirascan).

Tabla 2. Valores de ΔH y T_m a diferentes pH (8, 8.5, 9 y 9.5) obtenidos a partir de los datos por DC y calculados mediante la ecuación de van't Hoff (Ec. 4).

pH	ΔH (kcal mol ⁻¹)	T_m (°C)
8	85.4	56
8.5	83.6	55.5
9.0	80.0	53.8
9.5	77.2	52

Los valores de ΔH y T_m (Tabla 2) se obtuvieron a partir del gráfico construido con el logaritmo natural de la constante de equilibrio (K) y el inverso de la temperatura (conocido como gráfico de van't Hoff).

El gráfico se ajustó a una línea recta (Figura 18) cuya pendiente negativa es igual a la variación de la entalpía entre la constante de los gases y la ordenada al origen es igual a la variación de la entropía dividida entre la constante de los gases. (Ecuación de van't Hoff, Ec.4).

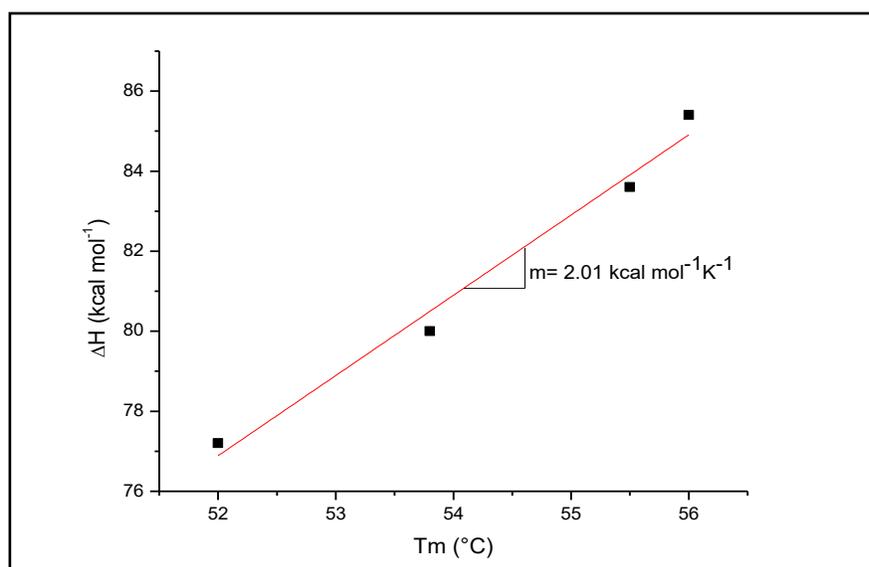


Figura 18. Gráfico de ΔH vs T_m para el lóbulo A. Los valores de ΔH y T_m aquí graficados se muestran en la Tabla 2.

Una vez obtenidos los valores de ΔH y T_m a partir de los datos por dicroísmo circular en el espectropolarímetro CHIRASCAN, se construyó el gráfico ΔH vs T_m (Figura 18), el cual se ajustó a una línea recta y cuyo valor de la pendiente (m) indica el valor de ΔC_p ($2.01 \pm 0.2 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$). Si se compara el valor de ΔC_p obtenido para el lóbulo A con el que ya está reportado para LAO ($\Delta C_p = 2.3 \pm 0.1 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) podemos notar que son muy similares, situación que no se esperaba dado que el dominio discontinuo cuenta con aproximadamente la mitad de residuos de la proteína completa. Lo anterior nos lleva a pensar que la proteína LAO en su estado desnaturalizado presenta estructura residual, no así el dominio A.

El valor de ΔC_p sirvió para construir el gráfico de estabilidad (Figura 19) utilizando la ecuación de Gibbs-Helmholtz (Ec. 5). Dicha figura muestra, además, la curva de estabilidad para la proteína LAO con la finalidad de poder comparar ambas proteínas.

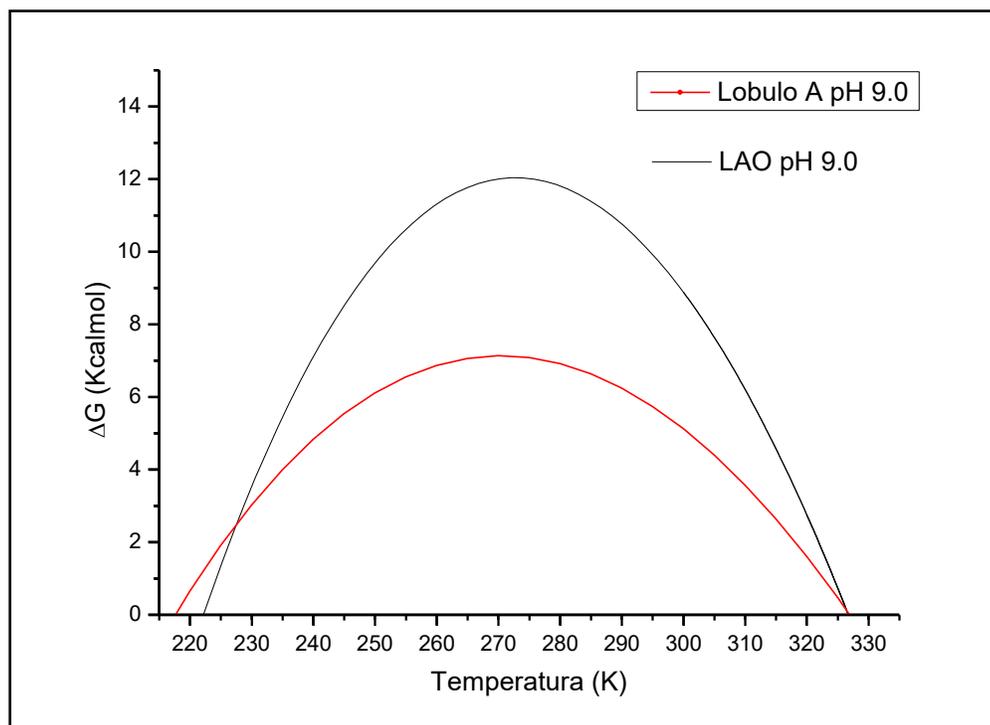


Figura 19. Muestra el gráfico de estabilidad para la proteína LAO (negro) (Vergara, 2011) y para el lóbulo A (rojo) utilizando los valores de ΔG de desplegamiento a cada valor de temperatura. Los cálculos se realizaron utilizando la ecuación de Gibbs-Helmholtz.

Hasta ahora, los resultados de desnaturalización térmica al equilibrio son evidencia de que el proceso de desplegamiento del lóbulo A se ajusta a un modelo de dos estados, tal y como se observó para la proteína LAO.

Ensayos de desnaturalización con urea.

Posteriormente se realizó la desnaturalización química del lóbulo A utilizando como agente desnaturalizante a la urea. Se tomaron los espectros de la proteína a 0 M de urea (estado nativo) y 5.5 M de urea (estado desnaturalizado) seguidos por fluorescencia (Figura 20 A) y dicroísmo circular (Figura 20 B). Los datos obtenidos con ambas técnicas se utilizaron para construir el gráfico de fracción desnaturalizada (f_D) contra la concentración de urea a pH 9 (Figura 21). Al final se

compararon los gráficos de f_D contra concentración de urea seguidos por dicroísmo a pH 9 del lóbulo A y LAO (Figura 22).

La Tabla 3 muestra la comparación entre los valores de ΔG , m , y concentración media de desnaturalizante (C_m) para LAO y el lóbulo A.

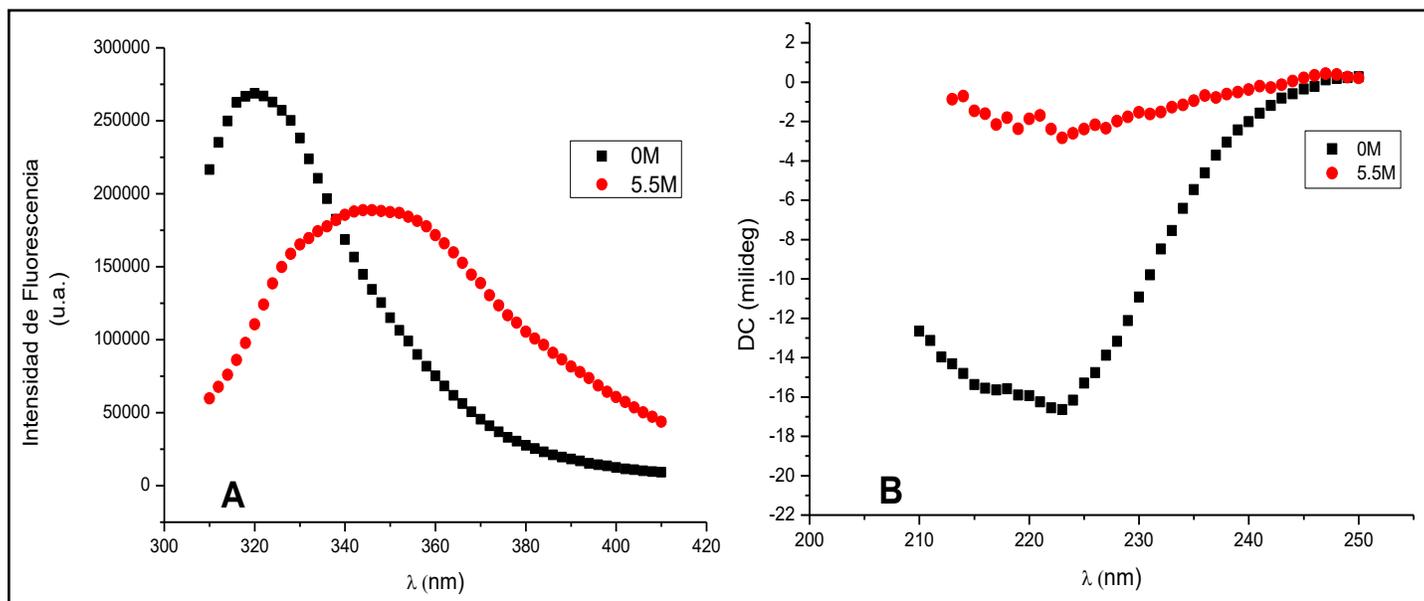


Figura 20. Espectros de fluorescencia del estado nativo (negro) y desnaturalizado (rojo) para el lóbulo A a 0 M y 5.5 M de urea (A). Espectros de dicroísmo circular del estado nativo (negro) y desnaturalizado (rojo) para el lóbulo A a 0 M y 5.5 M de urea (B).

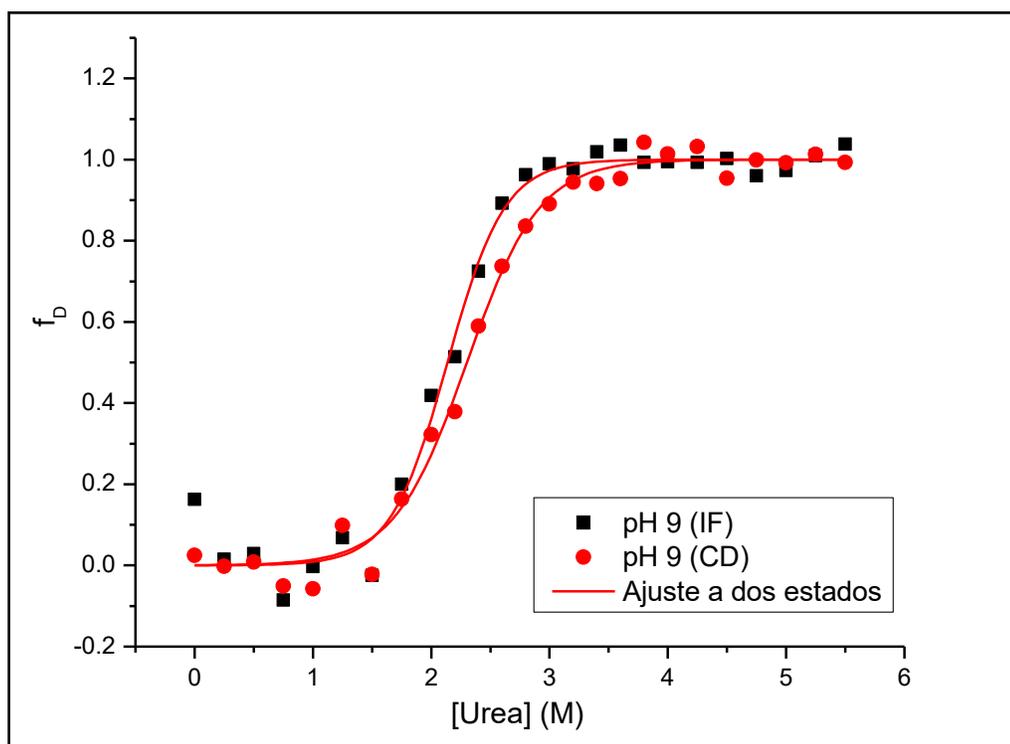


Figura 21. Desnaturalización por urea del lóbulo A. Se muestra la fracción desnaturalizada del lóbulo A a pH 9 seguida por dicroísmo circular y fluorescencia y ajustada a un modelo de dos estados (-) con la ecuación de Santoro y Bolen (Ec.6).

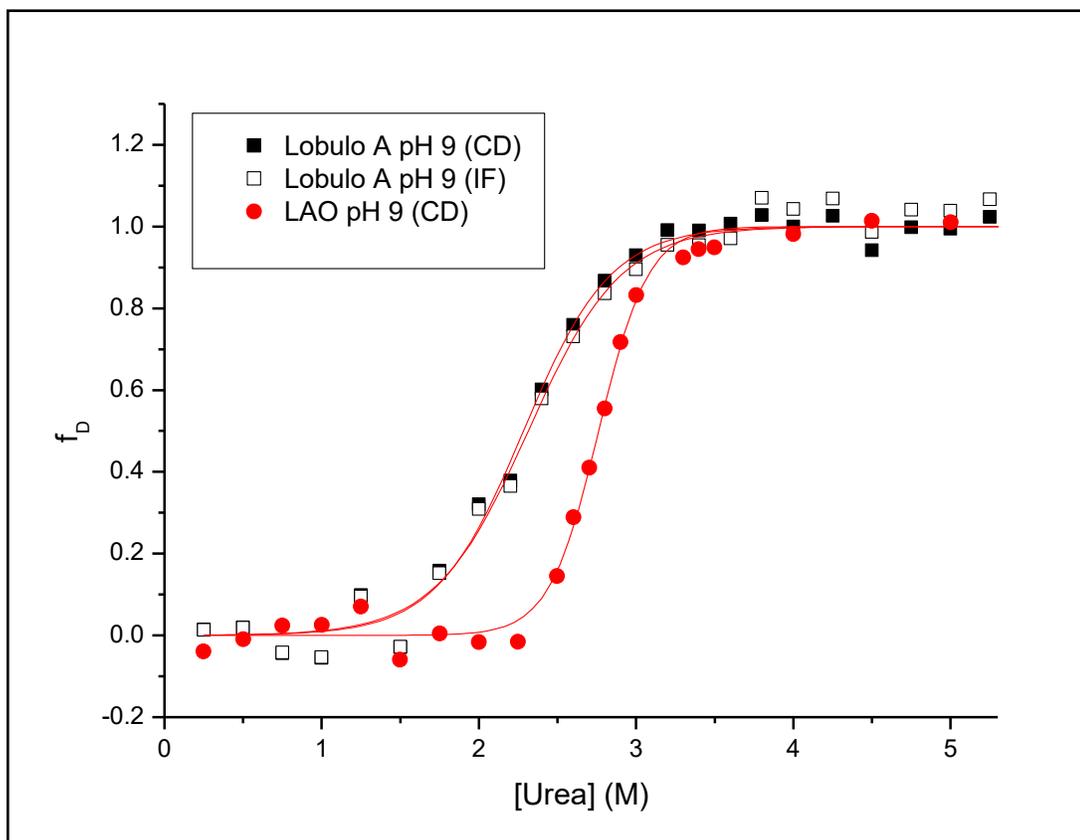


Figura 22. Comparación entre las curvas de fracción desnaturalizada para el lóbulo A (DC ■, IF □) y LAO (DC ●). Las tres sigmoides se ajustaron a un modelo de dos estados (-) con la ecuación de Santoro y Bolen (Ec. 6).

Tabla 3. Comparación entre los valores de ΔG , m y C_m para la proteína LAO y el lóbulo A.

	ΔG (kcal mol ⁻¹)	m (kcal mol ⁻¹ M ⁻¹)	C_m (M)
Lóbulo A (CD)	4.9 ± 0.4	2.1 ± 0.2	2.3
Lóbulo A (IF)	4.6 ± 0.4	2.0 ± 0.2	2.3
LAO	9.8 ± 0.8	3.7 ± 0.1	2.7

Experimentos cinéticos de desplegamiento y replegamiento.

Por otra parte, se realizaron experimentos cinéticos de desplegamiento y replegamiento a diferentes concentraciones de urea utilizando flujo detenido. A continuación se muestran los resultados obtenidos cuando la proteína se desnaturizó en 5 M de urea, la señal de dicroísmo circular se siguió a 222 nm con un ancho de banda de 8 nm. Los datos de las cinéticas de desnaturalización y renaturalización a 5 M de urea se ajustaron mejor a dos exponenciales de acuerdo con los gráficos de los residuales (Figura 23 y 24, respectivamente).

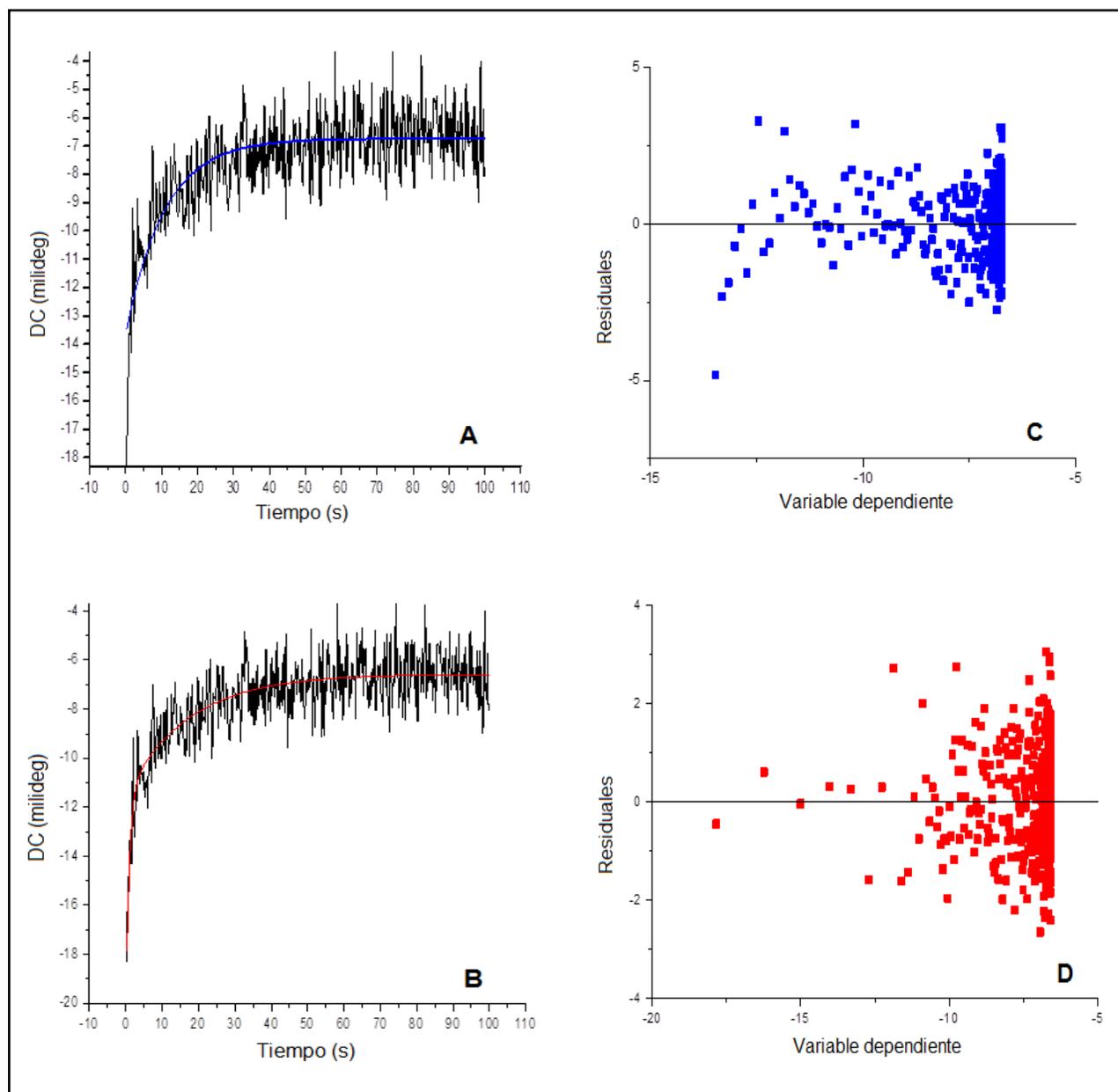


Figura 23. Cinética de desnaturalización del lóbulo A a 5 M de urea. Los datos se ajustaron a una (A -) y dos exponenciales (B -) de acuerdo a los residuales (C ■ y D ■, respectivamente).

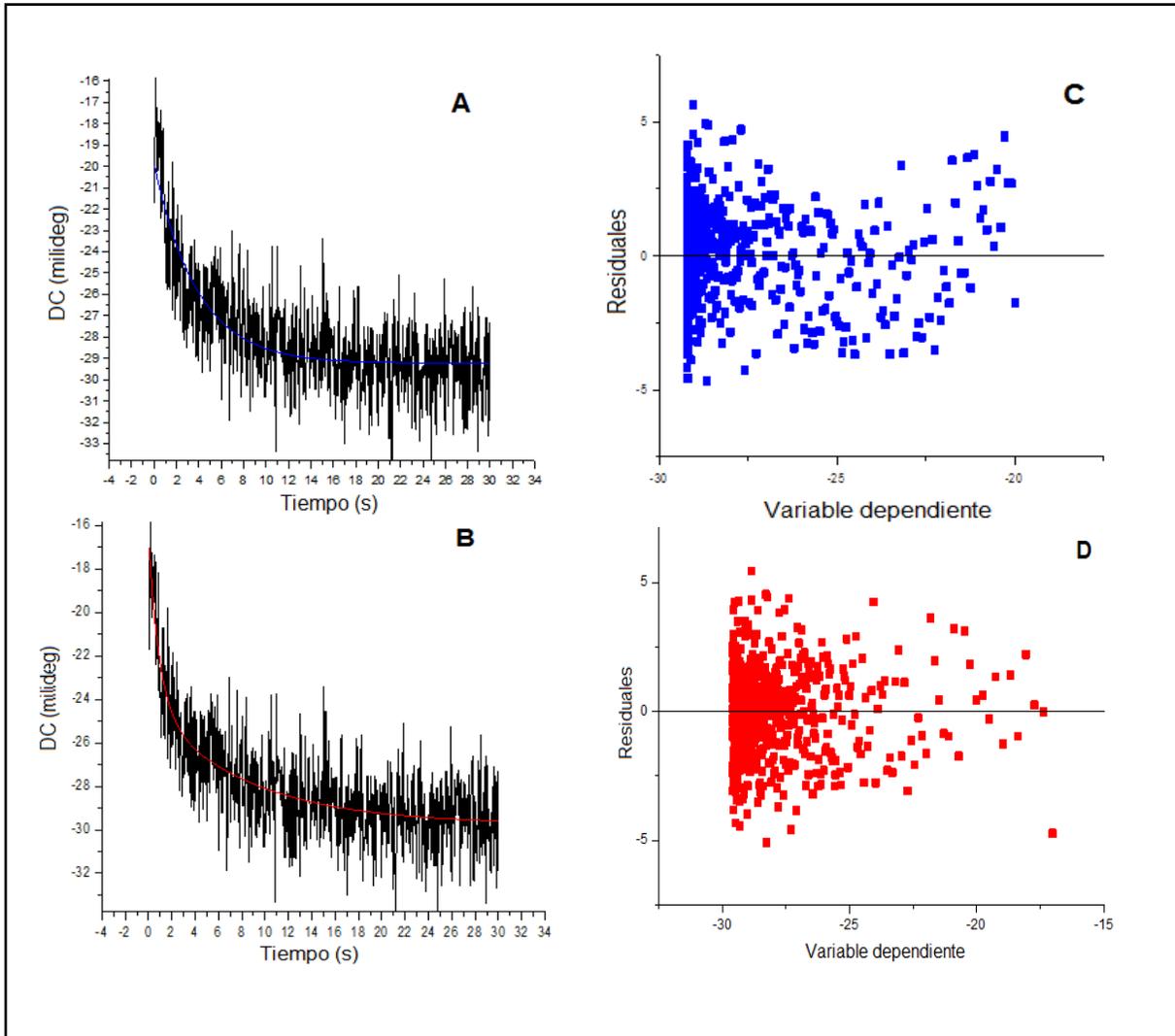


Figura 24. Cinética de renaturalización del lóbulo A a 5 M de urea. Los datos se ajustaron a una (A -) y dos exponenciales (B -) de acuerdo a los residuales (C ■ y D ■, respectivamente).

Por otra parte, tanto en el proceso de desnaturalización como en el de renaturalización, ocurre un fenómeno durante el tiempo muerto del equipo (1 miliseg) cuyos datos no se pueden obtener, se dice entonces que existe la presencia de una fase explosiva (Figura 25), la cual se aprecia en la diferencia que hay entre el valor del primer punto en la cinética de desnaturalización y renaturalización y el de su respectiva línea base.

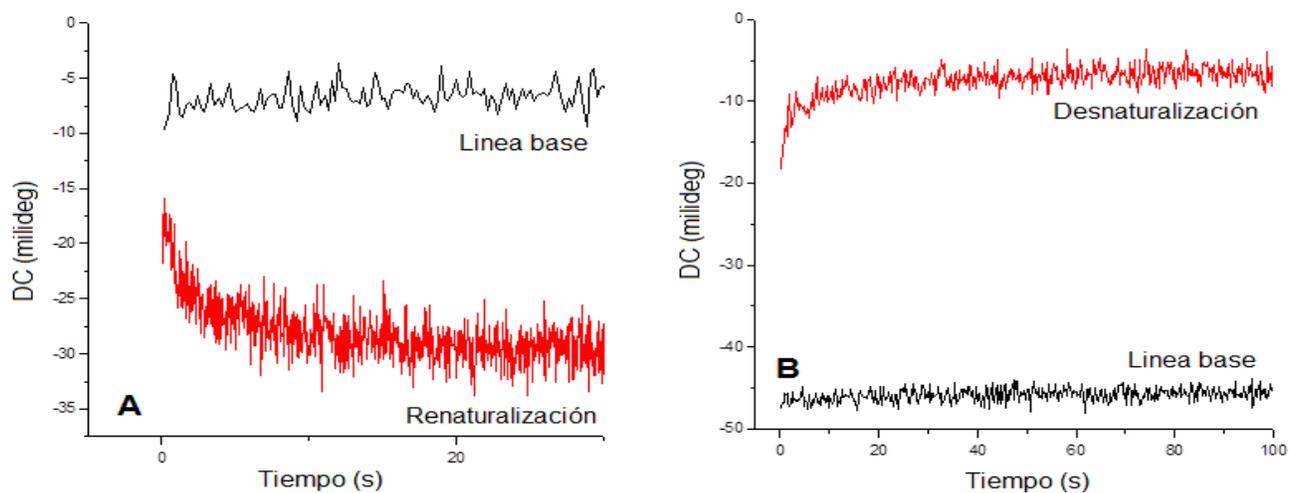


Figura 25. Se observa la línea base graficada junto con la cinética de renaturalización del lóbulo A a 0.6 M de urea (A), así como la línea base graficada junto con la cinética de desnaturalización a 5 M de urea (B).

Con el \ln de la k_{obs} para cada concentración de urea se construyó el gráfico de chevron para el lóbulo A (Figura 26 A) y se comparó con el existente para la proteína LAO (Figura 26 B). Estos resultados parecen indicar que, contrario a lo pensado en un inicio, el plegamiento del dominio A es más complejo que el de la proteína completa.

A diferencia del chevron de LAO, el del lóbulo A presenta dos ramas en el proceso de renaturalización, lo que sugiere la presencia de al menos un intermediario cinético durante éste procedimiento. Además, la rama del proceso de desnaturalización del lóbulo A carece de linealidad en las concentraciones más bajas de desnaturalizante, otro criterio que señala la existencia de un intermediario. Por otra parte, se observa un empalme entre la rama del proceso rápido de desnaturalización de LAO y la rama de desnaturalización del proceso lento del lóbulo A. Lo anterior indica que la rama lenta del proceso de desnaturalización del lóbulo A podría estar relacionada con el proceso de isomerización de la prolina 16 presente en éste dominio. De acuerdo con Vergara, 2015; la rama del proceso rápido de desplegamiento en el chevron de LAO está relacionada con el intermediario que se forma durante la isomerización de la P-16, ya que, una vez agregando cis-trans proliil isomerasa, dicha rama desaparece del chevron de LAO.

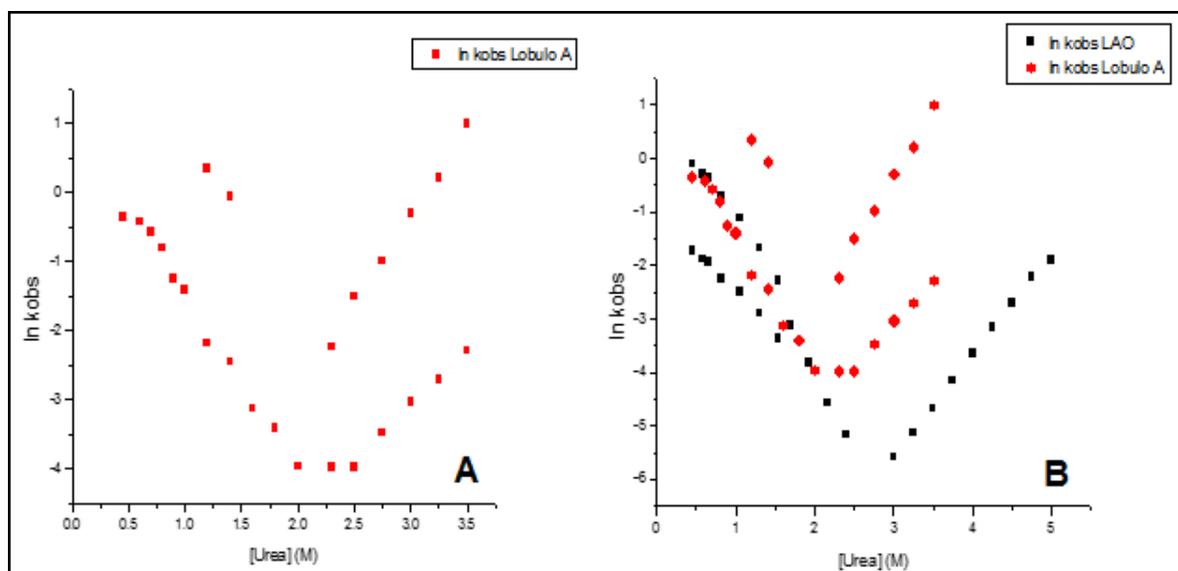


Figura 26. Chevron construido para el lóbulo A desnaturalizado a partir de 5 M de urea (A). Comparación del chevron para la proteína LAO (■) con el chevron del lóbulo A desnaturalizado a partir de 5 M de urea (●) (B).

Posteriormente se llevaron a cabo nuevas cinéticas de replegamiento y desplegamiento del lóbulo A mediante flujo detenido. Partiendo de 4 M de urea se siguió la señal de dicroísmo circular a 230 nm con un ancho de banda de 8 nm. La decisión anterior se tomó con la finalidad de reducir el ruido, llegar a una concentración menor del agente desnaturizante en la renaturalización y basados en la premisa de que a dicha concentración de urea la proteína ya se encuentra desnaturizada. Las cinéticas de desnaturización (Figura 27), al igual que las de renaturalización (Figura 28), se ajustaron mejor a dos exponenciales, excepto por las concentraciones 2.3 y 2.5 M.

La fase explosiva observada en el desplegamiento llegando hasta 5 M de urea ya no se observa al llegar a una concentración de 4 M de urea. Sin embargo, para el proceso de replegamiento la fase “*burst*” se sigue observando aun partiendo de una concentración más baja de desnaturizante, es decir, 4 M de urea.

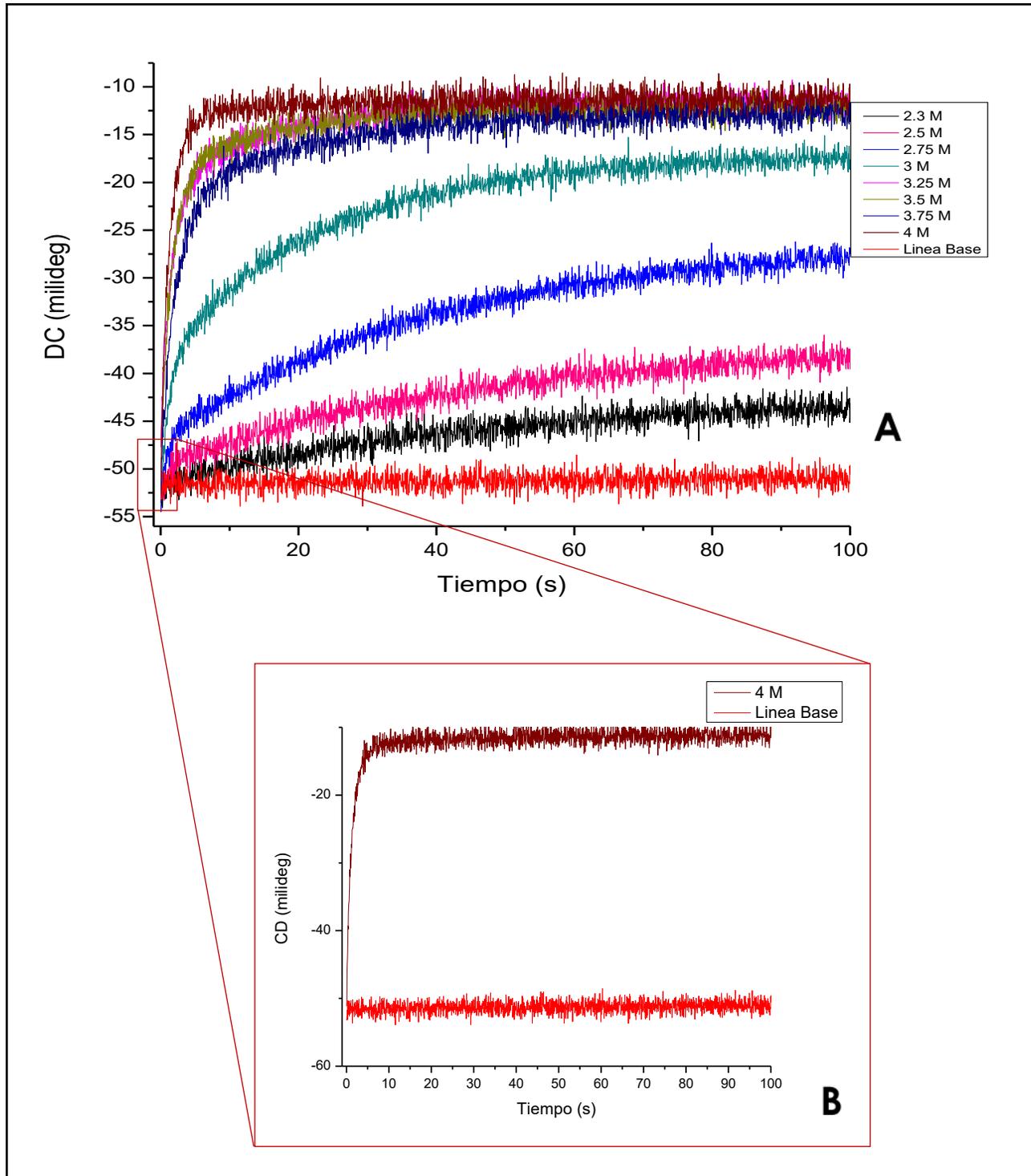


Figura 27. Cinéticas de desnaturalización del lóbulo A partiendo de 4 M de urea, seguidas por DC (A). En el inserto de la figura se muestra la línea base y cinética del lóbulo A en 4 M de urea seguida por DC (B).

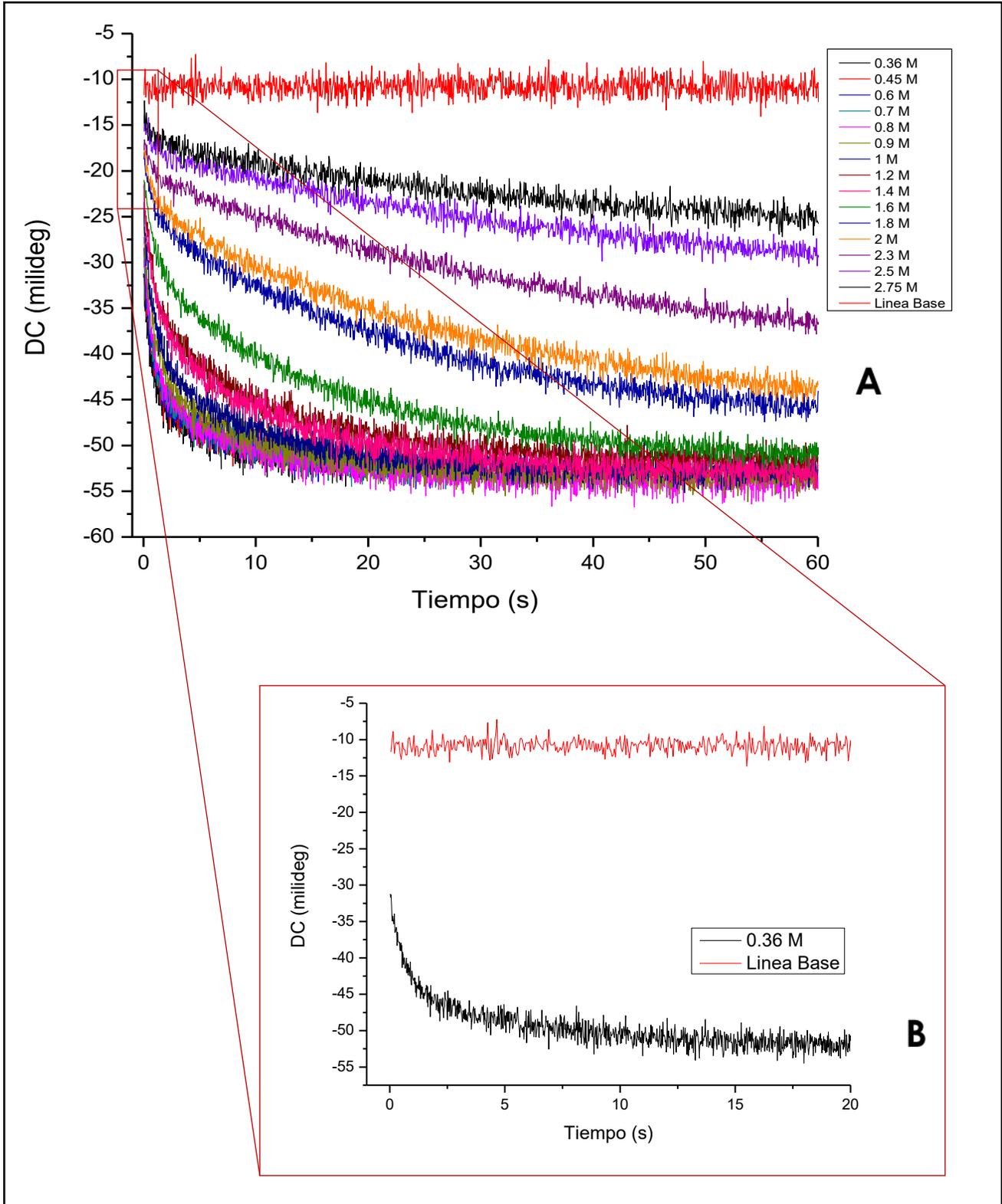


Figura 28. Cinéticas de renaturalización del lóbulo A partiendo de 4 M de urea, seguidas por DC (A). En el inserto de la figura se muestra la línea base y cinética del lóbulo A en 0.36 M de urea (concentración más baja) seguida por DC (B).

Como se puede observar en el gráfico de las amplitudes (Figura 29), ambas constantes de velocidad tienen una contribución importante en el proceso, la cual cambia con la concentración de desnaturalizante. Esto se muestra tanto para la renaturalización como para la desnaturalización, lo que indica que ninguna de las constantes es un artificio.

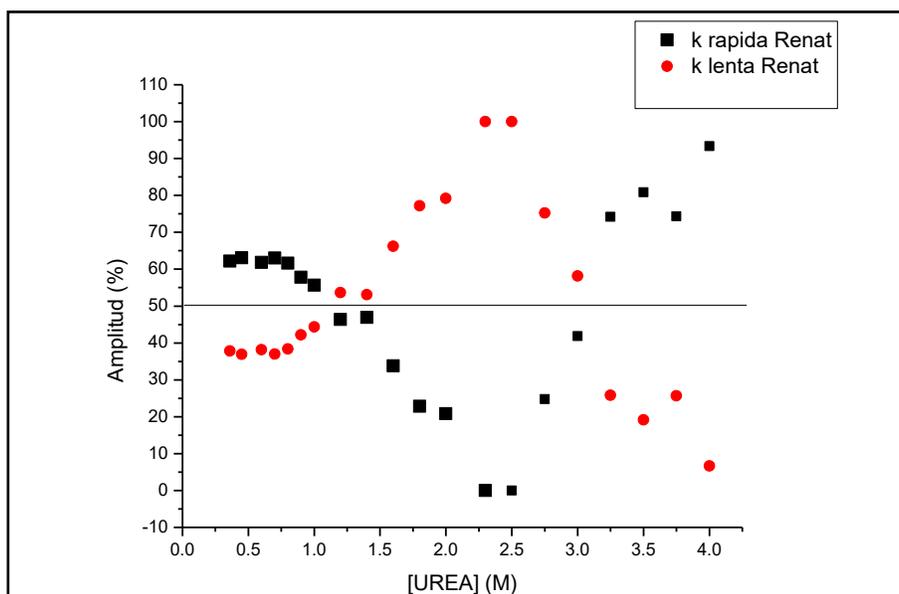


Figura 29. Amplitudes correspondientes a las constantes de velocidad de replegamiento y desplegado del lóbulo A.

El gráfico de chevron obtenido a partir de dichas constantes presenta dos ramas tanto para el proceso de renaturalización como el de desnaturalización. La rama lenta de desnaturalización se muestra dependiente a la concentración y presenta curvatura, además es coincidente con la rama lenta de desnaturalización del chevron a 5 M (Figura 31). La rama rápida de desnaturalización parece no tener dependencia con la concentración de desnaturalizante y no coincide con la rama rápida del chevron a 5 M. Por otra parte, la rama lenta de renaturalización presenta una dependencia lineal a la concentración de urea entre 1.4 y 2.3 M, sin embargo, a partir de 1.6 M dicha dependencia deja de ser lineal y eso se asocia a la presencia de intermediarios. Además, el comportamiento de la rama rápida de renaturalización también es referente de la presencia de dichas especies. A diferencia de la rama de desnaturalización, la rama de renaturalización partiendo de la proteína desnaturalizada a 4 M de urea es más lenta que la rama partiendo de 5 M de urea (Figura 31).

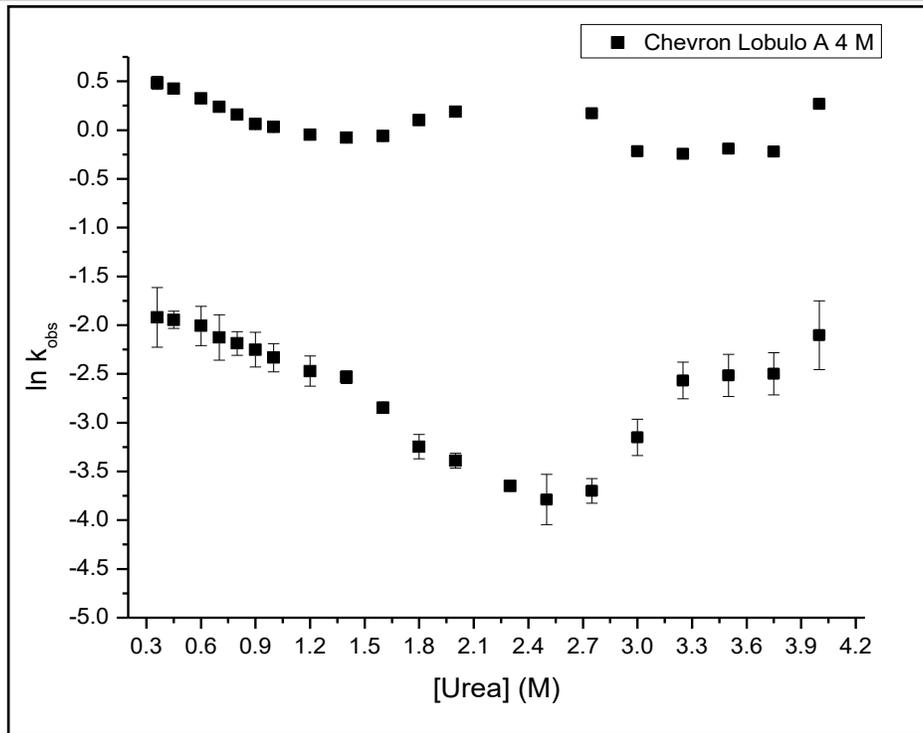


Figura 30. Chevron para el lóbulo A desnaturalizado a 4 M de urea, obtenido mediante DC.

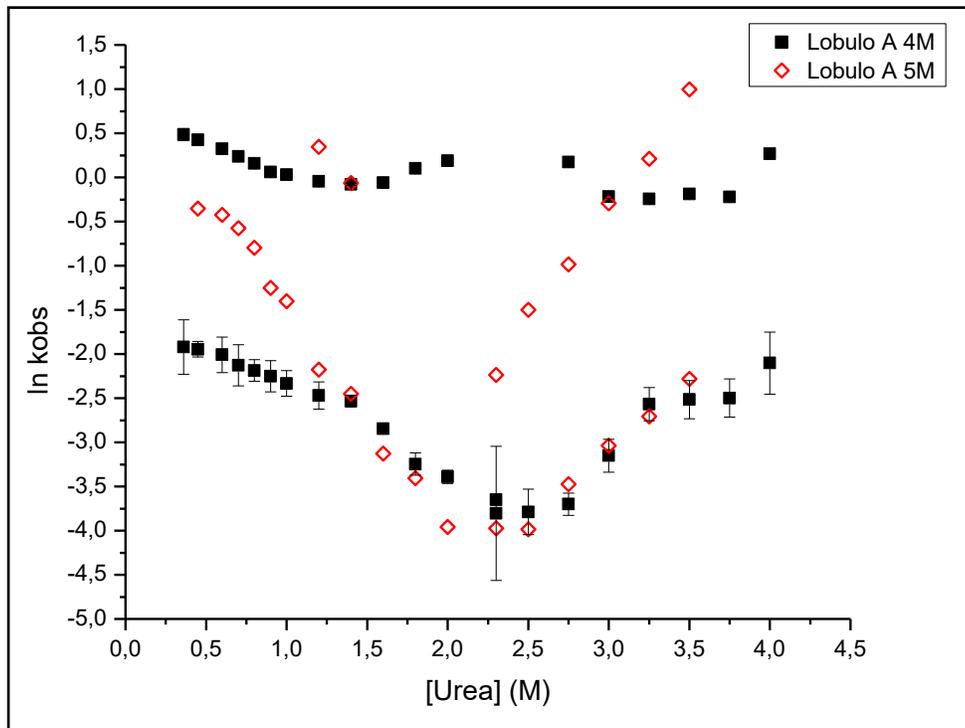


Figura 31. Chevron de lóbulo A desnaturalizado a 4 M de urea (■) comparado con el chevron a 5 M de urea (◊).

Por otra parte, se realizaron cinéticas de renaturalización y desnaturalización seguidas por fluorescencia, partiendo de una concentración 4 M de urea. Como se observa en la Figura 32, la cinética de renaturalización del lóbulo A a 0.45 M (concentración más baja) presenta un aumento en la intensidad de fluorescencia entre al segundo 0 y 2 del proceso, para posteriormente comenzar a descender. Lo anterior no se observó en el procesos seguido por DC a la misma concentración de agente desnaturizante y tampoco para la proteína LAO ni en DC y fluorescencia. A partir de los datos de estas cinéticas se construyó el grafico de chevron (Figura 33) y se hizo una comparación con el obtenido mediante DC.

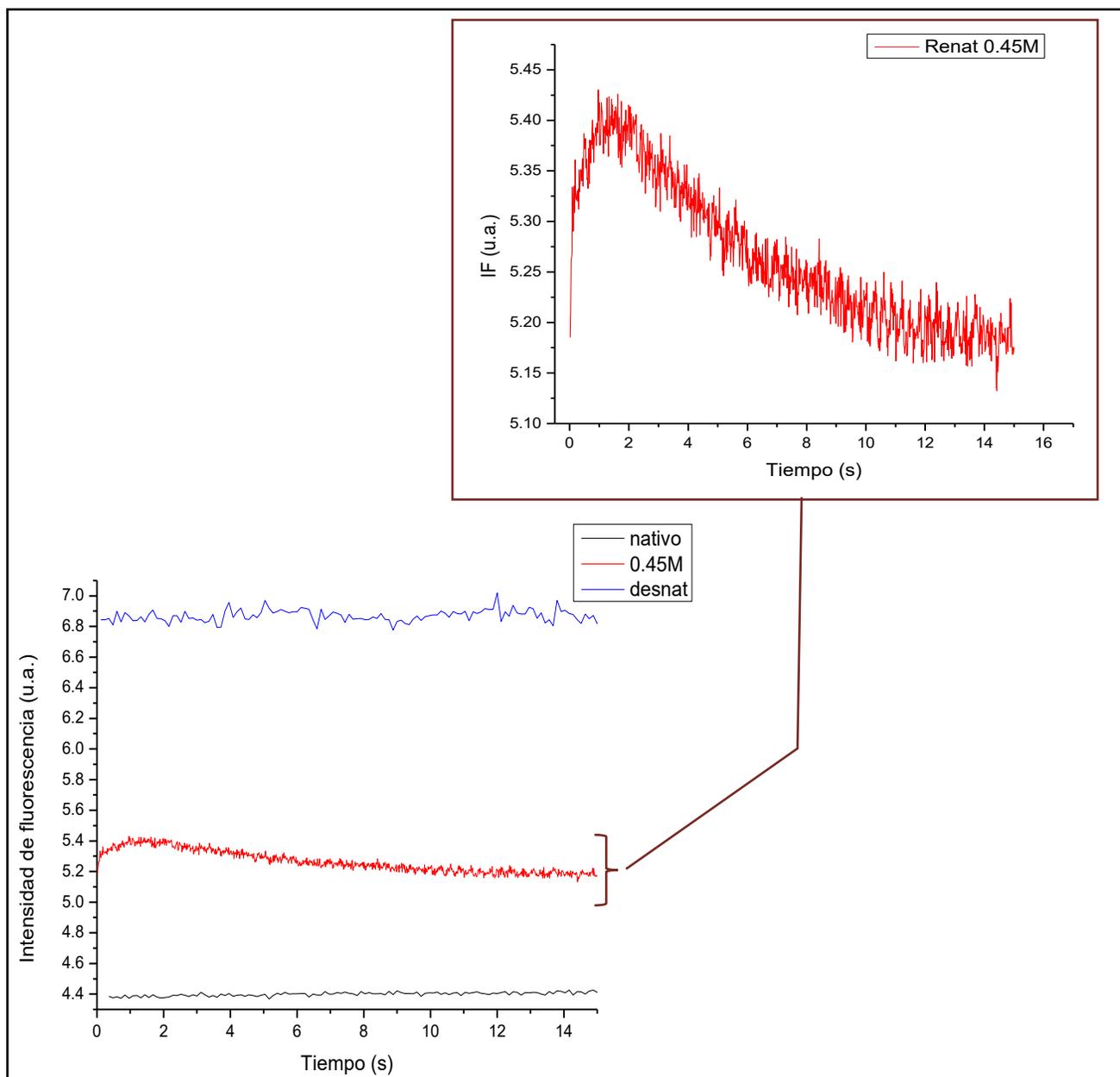


Figura 32. Cinética de renaturalización del lóbulo A partiendo de 4 M de urea, seguidas por intensidad de fluorescencia (IF) a 320 nm. Se graficó la línea base, la cinética del estado nativo, así como la cinética del lóbulo A en 0.45 M de urea.

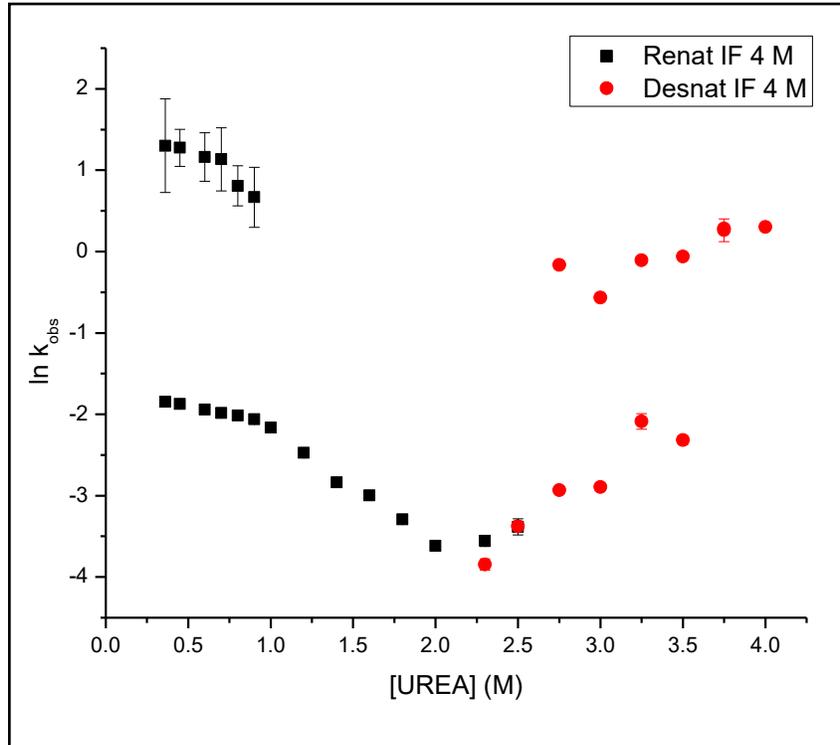


Figura 33. Chevron para el lóbulo A desnaturalizado a partir de 4 M de urea, obtenido mediante IF.

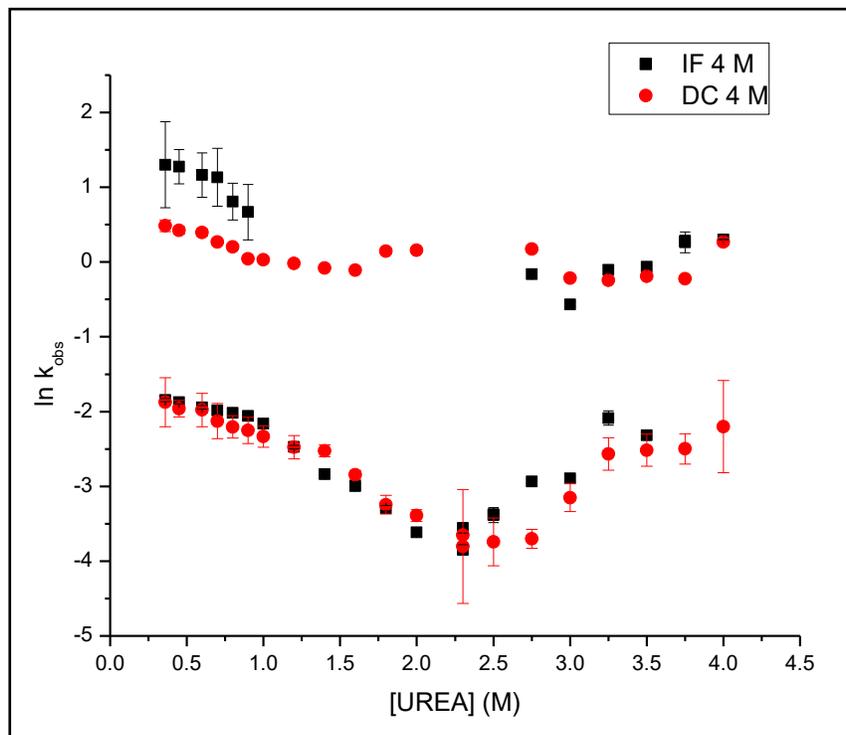


Figura 34. Gráfico de chevron para el lóbulo A desnaturalizado a partir de 4 M de urea obtenido mediante DC (■) e IF (●).

Calorimetría de titulación isotérmica.

Con la finalidad de saber si el dominio discontinuo de LAO es capaz de unir arginina (uno de los ligandos por los que la proteína completa muestra mayor afinidad), se llevaron a cabo experimentos de ITC. Dado que la unión de LAO por sus ligandos está descrita por un cambio conformacional que incluye la exclusión de estos en el sitio de unión del solvente, el objetivo central en este experimento es conocer la habilidad del dominio discontinuo para unir a la L-arginina. La firma termodinámica nos dio pista de cómo se rige la unión (Figura 37).

Se obtuvo un valor para la constante de disociación $K_d = 1.3 \times 10^{-4} M$ mediante la Ecuación 15.

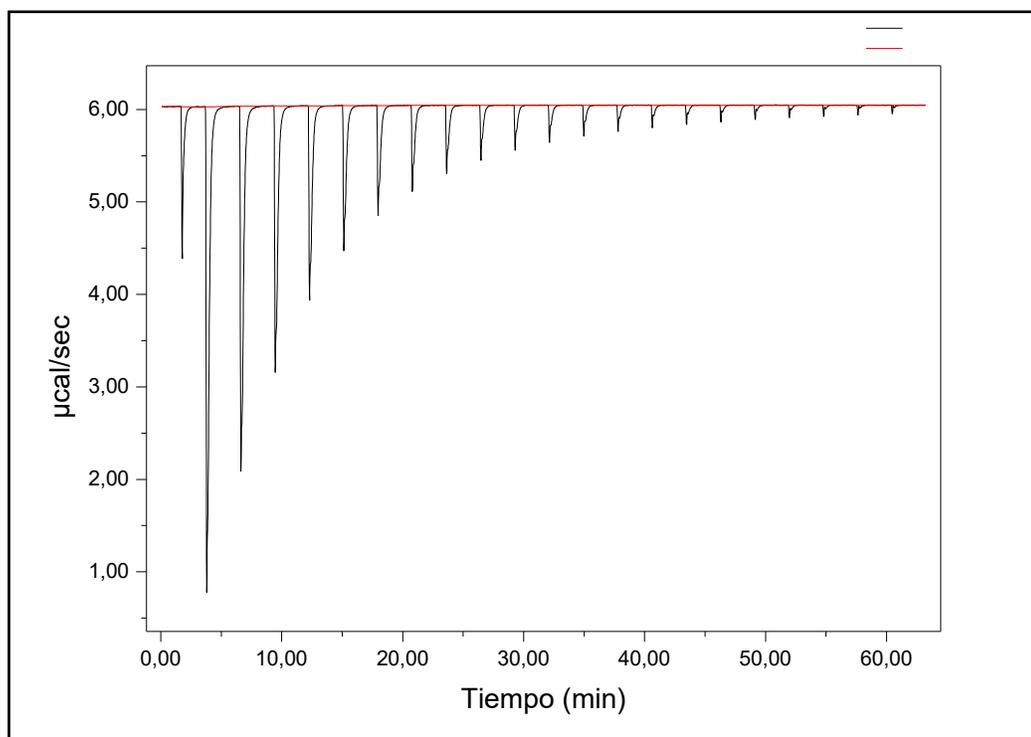


Figura 35. Isoterma obtenida de los experimentos de ITC para la unión del lóbulo A con arginina.

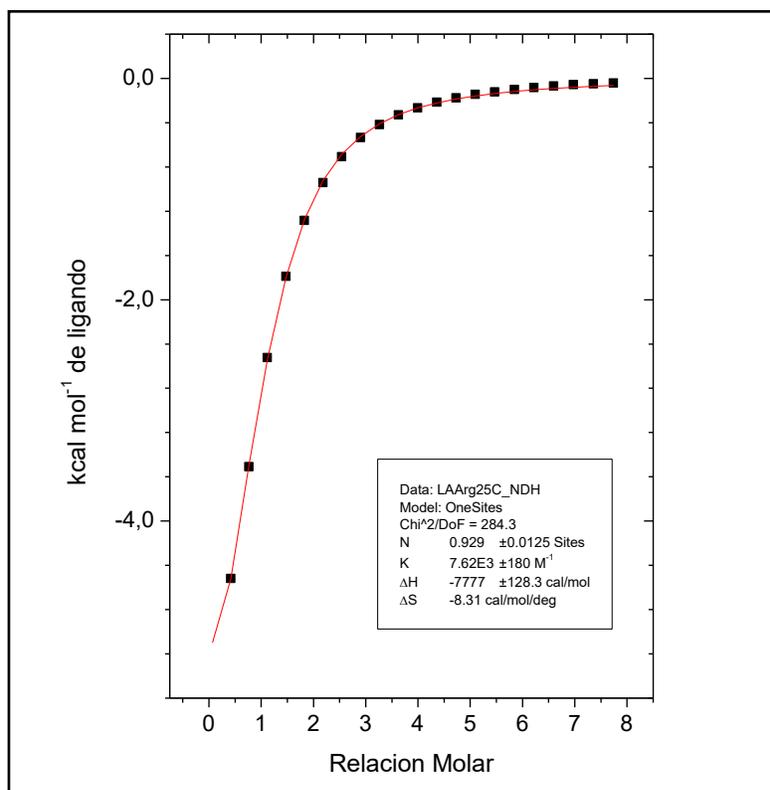


Figura 36. Perfil de ITC para la unión a ligando del lóbulo A a 25°C, en 10 mM de HEPES, pH 8. Lóbulo A (0.27 mM) titulado con Arginina (20 mM).

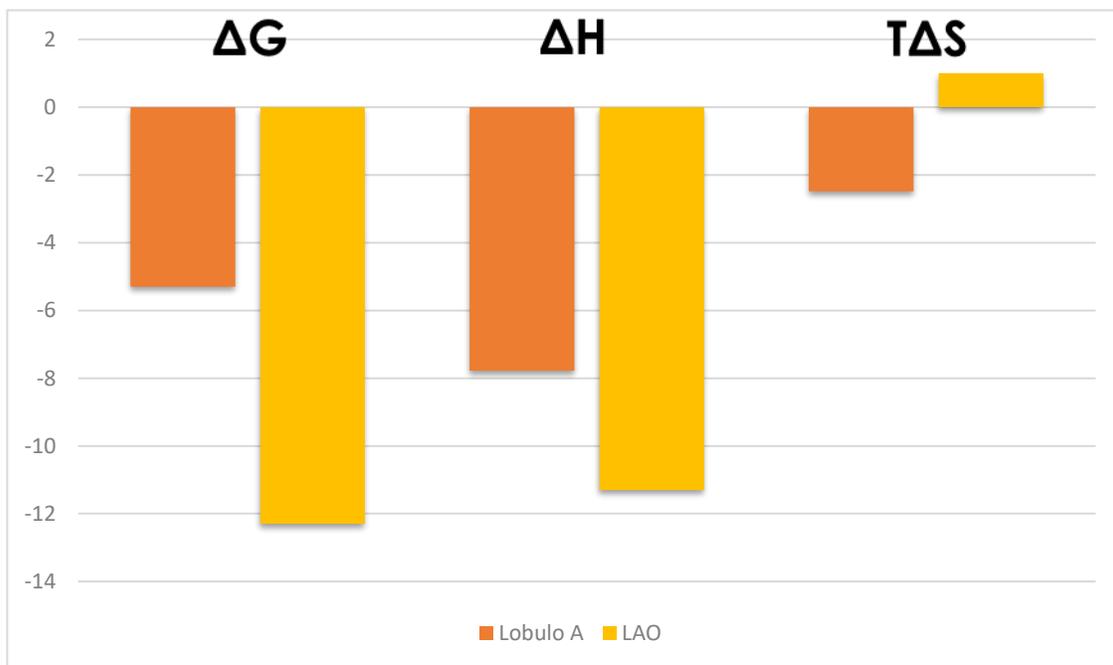


Figura 37. Comparación de los perfiles de energía para la unión del Lóbulo A y LAO a Arginina.

Tabla 4. Comparación de los perfiles de energía para la unión del Lóbulo A y LAO a Arginina.

	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)
Lóbulo A	-5.3	-7.77	-2.47
LAO	-12.3	-11.3	1
Diferencia	7	3.5	3.47

Discusión.

Aunque el plegamiento de las proteínas ha sido estudiado intensamente por más de 50 años, aún carecemos de información suficiente para poder relacionar la secuencia de aminoácidos con la estructura terciaria y, por lo tanto, con la función. Adicionalmente, la mayor parte de los estudios de plegamiento hasta ahora cubren tan solo una pequeña fracción del proteoma, según señala Braselmann. Lo anterior se debe a que los estudios de plegamiento se han centrado en proteínas que pueden existir en su estado plegado y desplegado al equilibrio, lo que permite su caracterización cinética y termodinámica. El enfoque en proteínas que se repliegan de manera reversible comparte una serie de características: son pequeñas (< 100 aminoácidos), de un solo dominio, monoméricas, marginalmente estables y de plegamiento rápido.

Por lo anterior, en nuestro laboratorio se decidió caracterizar el plegamiento de la proteína LAO que, como ya se mencionó antes, está formada por dos dominios unidos mediante una región de bisagra, lo que la hace una proteína más compleja. Además, se sabe que las PBP's surgieron de la duplicación génica de la proteína CheY, un sistema monomérico de 132 amino ácidos. Los estudios del desplegamiento al equilibrio para la proteína LAO indicaron que dicho proceso es de dos estados. Lo anterior también se observó para otras PBPs, como HisJ o la proteína de unión a maltosa. Vergara (2015) en su tesis de maestría, señala que *“Los resultados obtenidos para estas proteínas son interesantes ya que sugieren que el desplegamiento de las PBPs no presenta intermediarios estables”*. Por otra parte, resalta el contraste entre éstas y otras proteínas de menor tamaño y complejidad, las cuales se despliegan en dos o más etapas. Partiendo de estos antecedentes se planteó la interrogante: ¿cómo afecta al plegamiento y la función de la proteína LAO la expresión por separado de sus dominios?, es decir, ¿cómo se modifica el plegamiento de la proteína LAO cuando se convierte en un sistema más sencillo?

En cuanto a los resultados de expresión de ambos dominios, sólo se logró expresar el lóbulo discontinuo (A), mientras que el lóbulo B tuvo un peso mayor al esperado, tal y como lo muestra la figura 11. Resulta interesante que el lóbulo

discontinuo haya logrado expresarse mientras que el lóbulo continuo no, ya que para el diseño del primero simplemente se unieron los aminoácidos de los extremos donde se cortó la proteína (91 y 185) mientras que para el lóbulo B no se requirió de ningún otro tipo de modificación. El motivo por el cual el lóbulo B no se expresó pudo ser porque el péptido señal que se utilizó en el diseño no permitió que se exportara al periplasma.

Una vez que se expresó y purificó el lóbulo A, se procedió a indagar si estaba plegado utilizando DC. El espectro obtenido es característico para una proteína con estructura alfa-beta, además, el gráfico de desnaturalización por temperatura mostró una sola transición, lo que indica que el dominio está plegado y sugiere que el proceso de desplegamiento es de dos estados, de la misma manera que se observó para LAO.

El desplegamiento del lóbulo A al equilibrio.

Los estudios de desnaturalización térmica del lóbulo A seguidos por dicroísmo circular e intensidad de fluorescencia presentan una transición monofásica y coincidente, lo cual sugiere que el proceso de desplegamiento es cooperativo, altamente reversible y de dos estados, así como con LAO.

En cuanto a los parámetros termodinámicos, el valor experimental para el ΔC_p del lóbulo A fue de $1.9 \pm 0.2 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, el cual de acuerdo a las ecuaciones paramétricas de Robertson & Murphy, corresponde a una proteína de aproximadamente 100 aminoácidos, lo que indica que el lóbulo A se despliega completamente al aumentar la temperatura. Es muy interesante notar que el C_p obtenido para el lóbulo A es muy semejante al valor obtenido para la LAO completa ($\Delta C_p = 2.3 \pm 0.1 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$). Con base en la ecuación propuesta por Robertson & Murphy, se calculó un valor de ΔC_p para una proteína de 238 aminoácidos y resultó ser de $\sim 4.1 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$; dicha cifra es el doble que la del ΔC_p experimental de LAO. Además, los espectros de desnaturalización por temperatura para LAO muestran la presencia de estructura residual (Vergara, 2011), no así los espectros para el lóbulo A. De esta manera, el hecho de que los valores de ΔC_p para LAO y el lóbulo A sean prácticamente iguales indica que

ambas proteínas tienen la misma proporción de área expuesta al solvente y que sugiere que la estructura residual observada en LAO se encuentra en el lóbulo B (continuo) y que el C_p observado para la proteína completa corresponde al desplegamiento del lóbulo A.

Por otra parte, los estudios de desnaturalización química utilizando urea como agente desnaturalizante presentan una transición monofásica y los parámetros termodinámicos son coincidentes con los obtenidos en los estudios de desnaturalización térmica. De esta manera se comprueba que el proceso de desplegamiento del lóbulo A es de dos estados al equilibrio, es decir, no presenta intermediarios. El corrimiento en el valor de C_m indica cooperatividad en LAO, ya que, si los dominios de la proteína se desplegaran de manera independiente, el valor de C_m del lóbulo A sería el mismo que para LAO (Tabla 3).

Estudios cinéticos del lóbulo A.

Para los estudios cinéticos del lóbulo A se realizaron experimentos de desnaturalización y renaturalización partiendo de 5 M de urea. Al analizar las cinéticas de desplegamiento y replegamiento seguidas por DC se observó la presencia de una fase “burst” en ambos procesos que no se observa para las cinéticas de LAO. Lo anterior puede sugerir la presencia de un intermediario para el replegamiento. Sin embargo, para el desplegamiento puede significar que el estado nativo del lóbulo A está formado por más de una especie que se desnaturalizan con diferentes velocidades, o que diferentes zonas de la proteína se modifican con diferentes velocidades. Por otra parte, el gráfico de chevron construido a partir de estos datos presenta dos ramas en la renaturalización, la rama lenta tiene curvatura y coincide con la rama rápida del chevron de LAO, la cual, al extrapolarse al eje de las ordenadas, indica la velocidad de formación del estado nativo al intermediario en su vía de plegamiento (Vergara, 2015). Además, el hecho de que ambas ramas coincidan puede significar que el plegamiento del lóbulo A por separado es igual al del plegamiento dentro de LAO en esas condiciones. Adicionalmente, dado que ambas presentan curvatura, es probable que la formación del intermediario en la vía de LAO esté relacionada con cambios estructurales en el lóbulo A. Es importante mencionar que la rama lenta en el

chevron de LAO se relacionó con la isomerización de la prolina 16; sin embargo, dicho proceso no se observa para el lóbulo A, que es el que tiene éste amino ácido. Finalmente, se observan dos ramas en la desnaturalización del lóbulo continuo, lo que puede indicar que existe al menos un intermediario cinético. Todo lo anterior presenta evidencia de que las características cinéticas son más complejas que al equilibrio, donde claramente el plegamiento del lóbulo A presenta un plegamiento de dos estados.

Sin duda, los experimentos cinéticos partiendo de 5 M de urea proporcionaron información nueva y relevante sobre el proceso de plegamiento del lóbulo discontinuo; sin embargo, las cinéticas obtenidas presentaron mucho ruido y el chevron construido tiene desviaciones muy grandes. Debido a esto, decidimos repetir los experimentos, pero ahora partiendo de 4 M de urea, donde, según la Figura 21, a esta concentración el lóbulo A ya está desnaturalizado.

Partiendo de 4 M de urea y cambiando la longitud de onda se logró el objetivo de disminuir el ruido. Las cinéticas de renaturalización seguidas por DC aún presentan la fase burst observada a 5 M (Figura 28), no así las de desnaturalización (Figura 27). El chevron construido a partir de estos datos presentó dos ramas en la desnaturalización, la rama rápida, que parece no ser dependiente de la concentración de urea, puede estar relacionada con la isomerización de la prolina 16. La rama lenta presenta curvatura y es más lenta que la del chevron del lóbulo A a 5 M de urea. Por otra parte, el proceso de renaturalización también presentó dos ramas. La rama rápida tampoco parece depender de la concentración de urea, mientras que la rama lenta no es lineal y está relacionado con un movimiento en el estado de transición.

Adicionalmente, las cinéticas de renaturalización seguidas por IF muestran un aumento súbito en la señal que posteriormente disminuye hasta llegar al estado nativo, lo que puede sugerir que el lóbulo A va del estado desplegado a un estado más compacto donde existe menor área expuesta al solvente, para finalmente llegar al estado nativo (Figura 32). El chevron construido a partir de estos datos es muy similar al que se obtuvo por DC, lo que indica que los cambios observados no

se deben al cambio en la longitud de onda, sino al cambio en la concentración de urea.

Hasta ahora, los resultados han mostrado que el plegamiento del lóbulo A parece ser de dos estados, al igual que LAO; sin embargo, los estudios cinéticos han sido mucho más complejos de lo esperado. Dado que el lóbulo discontinuo es más pequeño que LAO, se tenía la hipótesis de que su plegamiento sería menos complejo que el de la proteína completa.

Estudios de la unión de arginina al lóbulo A.

En cuanto a la repercusión en la función del dominio discontinuo, se observó que, si bien es capaz de unir a la arginina, la afinidad por dicho aminoácido disminuye considerablemente si se compara con la de LAO. Lo anterior señala que la disminución en la afinidad no es proporcional al número de residuos que hacen contacto con el ligante (el lóbulo A tiene 5 residuos que tienen interacción directa con los ligantes, mientras que el B sólo 2) y que el dominio continuo, así como la región de bisagra, son clave para la función de LAO, tal y como pasó con los estudios realizados en HisJ (Chu, 2013).

Conclusiones y Perspectivas.

El plegamiento del lóbulo A al equilibrio es igual de sencillo que el de LAO, ya que ambas proteínas presentan un proceso de dos estados. Sin embargo, los estudios cinéticos mostraron mucha mayor complejidad para el lóbulo A en comparación a los obtenidos para LAO. Lo anterior resulta interesante ya que, contrario a lo que se pensó, la complejidad del plegamiento no necesariamente aumenta al aumentar la complejidad estructural de la proteína. De esta manera podemos hipotetizar que la formación de proteínas multidominio tendrá la ventaja de “concertar” la cinética de plegamiento de los dominios aislados.

Por otra parte, los estudios de unión mostraron que el lóbulo A es capaz de unir arginina ($K_D = 1.31 \times 10^5$ nM), aunque con una afinidad 10 mil veces menor que la proteína LAO ($K_D = 0.96 \pm 0.01$ nM).

Todo lo anterior sugiere que la familia de las PBPs evolucionó de manera tal que el plegamiento y la función resultaran más eficientes.

Finalmente, para poder tener un panorama más completo es necesario expresar y caracterizar el plegamiento y la unión del dominio continuo (B), lo cual nos permitirá conocer más a detalle la relación entre ambos lóbulos y cómo influyen en el plegamiento de LAO.

Bibliografía.

- Ames, G. (1986). Bacterial Periplasmic Transport Systems: Structure, Mechanism, and Evolution. *Annu. Rev. Biochem.*, 55(1), pp.397-425.
- Ausili, A., Staiano, M., Dattelbaum, J., Varriale, A., Capo, A. and D'Auria, S. (2013). Periplasmic Binding Proteins in Thermophiles: Characterization and Potential Application of an Arginine-Binding Protein from *Thermotoga maritima*: A Brief Thermo-Story. *Life*, 3(1), pp.149-160.
- Berrocal Gama, T. (2015). Análisis computacional de la estabilidad, flexibilidad y conectividad de la familia de proteínas periplásmicas de unión a aminoácidos básicos. Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Braselmann, E., Chaney, J. and Clark, P. (2013). Folding the proteome. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(7), pp.337-344.
- Brockwell, D. and Radford, S. (2007). Intermediates: ubiquitous species on folding energy landscapes? *Current Opinion in Structural Biology*, 17(1), pp.30-37.
- Buchner, Johannes and Thomas Kiefhaber. *Protein Folding Handbook*. Weinheim: Wiley-VCH, 2005.
- Capaldi, A., Shastry, R., Kleanthous, C., Roder, H. and Radford, S. (2001). Ultrarapid mixing experiments reveal that Im7 folds via an on-pathway intermediate. *Nature*, [online] 8(1), pp.68-72. Disponible en: <http://structbio.nature.com>.
- Capaldi, Andrew P., Colin Kleanthous, and Sheena E. Radford. "Im7 Folding Mechanism: Misfolding On A Path To The Native State". *Nature Structural Biology* (2002).
- Chu, B., DeWolf, T. and Vogel, H. (2013). Role of the Two Structural Domains from the Periplasmic *Escherichia coli* Histidine-binding Protein HisJ. *Journal of Biological Chemistry*, 288(44), pp.31409-31422.
- Daggett, Valerie y Alan R. Fersht. "Is There A Unifying Mechanism For Protein Folding?" *Trends in Biochemical Sciences* 28.1 (2003): 18-25.

- Doige, C A y G F Luzzi Ames. "ATP-Dependent Transport Systems In Bacteria And Humans: Relevance To Cystic Fibrosis And Multidrug Resistance". Annual Review of Microbiology 47.1 (1993): 291-319.
- Felder, C., Graul, R., Lee, A., Merkle, H. and Sadee, W. (1999). The venus flytrap of periplasmic binding proteins: An ancient protein module present in multiple drug receptors. AAPS PharmSci, 1(2), pp.7-26.
- Fersht, Alan R. "Nucleation Mechanisms In Protein Folding". Current Opinion in Structural Biology 7.1 (1997): 3-9.
- Fersht, A. (1999). Structure and mechanism in protein science. Nueva York: W.H. Freeman.
- Friel, Claire T., Godfrey S. Beddard, and Sheena E. Radford. "Switching Two-State To Three-State Kinetics In The Helical Protein Im9 Via The Optimisation Of Stabilising Non-Native Interactions By Design". *Journal of Molecular Biology* 342.1 (2004): 261-273.
- Fukami-Kobayashi, K., Tateno, Y. and Nishikawa, K. (1999). Domain dislocation: a change of core structure in periplasmic binding proteins in their evolutionary history. *Journal of Molecular Biology*, 286(1), pp.279-290.
- Gómez, J., Hilser, V., Xie, D. and Freire, E. (1995). The heat capacity of proteins. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 22(4), pp.404-412.
- Kang, C., Gokcen, S. and Ames, G. (1992). Crystallization and preliminary X-ray studies of the liganded lysine, arginine, ornithine-binding protein from *Salmonella typhimurium*. *Journal of Molecular Biology*, 225(4), pp.1123-1125.
- Kang, C., Kim, S., Nikaido, K., Gokcen, S. and Ames, G. (1989). Crystallization and preliminary X-ray studies of HisJ and LAO periplasmic proteins from *Salmonella typhimurium*. *Journal of Molecular Biology*, 207(3), pp.643-644.
- Kathuria, S., Day, I., Wallace, L. and Matthews, C. (2008). Kinetic Traps in the Folding of $\beta\alpha$ -Repeat Proteins: CheY Initially Misfolds before Accessing the Native Conformation. *Journal of Molecular Biology*, 382(2), pp.467-484.
- Kiefhaber, T. (1995). Kinetic traps in lysozyme folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(20), pp.9029-9033.
- Krüger, D., Rathi, P., Pflieger, C. and Gohlke, H. (2013). CNA web server: rigidity theory-based thermal unfolding simulations of proteins for linking structure, (thermo-) stability, and function. *Nucleic Acids Research*, 41(W1), pp.W340-W348.
- McKee, T. y McKee, J. (2009). *Biochemistry*. 6th ed. Boston: Oxford University Press.
- Miller, D., Olson, J., Pflugrath, J. and Quioco, F. (1983). rates of ligand binding to periplasmic proteins involved in bacterial transport and chemotaxis. *The journal of biological chemistry*, 258(22), pp.13665-13672.

- Morris, E. and Searle, M. (2012). Overview of Protein Folding Mechanisms: Experimental and Theoretical Approaches to Probing Energy Landscapes. *Current Protocols in Protein Science*, pp.28.2.1-28.2.22.
- Müller-Esterl, W., Brandt, U. y Centelles Serra, J. (2008). *Bioquímica*. Barcelona: Editorial Reverté, pp, 88, 99.
- Nikaido, K. y Ames, G. (1992). Purification and characterization of the periplasmic lysine-, arginine-, ornithine-binding protein (LAO) from *Salmonella typhimurium*. *The Journal of biological chemistry*, 267, pp.20706-12.
- Oh, B., Pandit, J., Kan, C., Nikaido, K., Gokcen, S. and Ames, G. (1993). Three-dimensional Structures of the Periplasmic Lysine/Arginine/ Ornithine-binding Protein with and without ligand. *The journal of Biological Chemistry*, 268, pp.11348-11355.
- Oldham, M. y Chen, J. (2011). Crystal Structure of the Maltose Transporter in a Pretranslocation Intermediate State. *Science*, 332(6034), pp.1202-1205.
- Photophysics.com. (2016). Stopped-flow Spectroscopy: A Beginner's Guide | Applied Photophysics. [online] Available at: <https://www.photophysics.com/lab/stopped-flow-spectroscopy-beginners-guide> [Accessed 17 May 2016].
- Pulido, N., Silva, D., Tellez, L., Pérez-Hernández, G., García-Hernández, E., Sosa-Peinado, A. and Fernández-Velasco, D. (2015). On the molecular basis of the high affinity binding of basic amino acids to LAOBP, a periplasmic binding protein from *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Recognit.*, 28(2), pp.108-116.
- Quiocho, F., Vyas, N., Pflugrath, J., Saper, M., Vyas, M. and Sack, J. (1985). Novel tertiary structures and stereospecificities of periplasmic binding proteins involved in active transport and chemotaxis. *J Biosci.* 8(1-2), pp.461-470.
- Robertson, A. and Murphy, K. (1997). Protein Structure and the Energetics of Protein Stability. *Chemical Reviews*, 97(5), pp.1251-1268.
- Sambrook, J. and Russell, D. (2001). *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santoro, M. and Bolen, D. (1988). Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl .alpha.-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry*, 27(21), pp.8063-8068.
- Schindler, T., Herrler, M., Marahiel, M. and Schmid, F. (1995). Extremely rapid protein folding in the absence of intermediates. *Nat Struct Mol Biol.* 2(8), pp.663-673.
- Shilton, B., Flocco, M., Nilsson, M. and Mowbray, S. (1996). Conformational Changes of Three Periplasmic Receptors for Bacterial Chemotaxis and Transport: The Maltose-, Glucose/Galactose- and Ribose-binding Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 264(2), pp.350-363.

- Vázquez-Contreras, E. (2003). Bioquímica y Biología Molecular en línea. [online] Laguna.fmedic.unam.mx. Disponible en: <http://bq.unam.mx/~evazquez> [Consultada el 17 de Mayo de 2016].
- Vergara, J. (2011). *El desplegamiento de la proteína LAO, estudios cinéticos y termodinámicos*. Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de Mexico.
- Vergara, J. (2015). “Caracterización cinética y termodinámica del plegamiento de la proteína de unión a lisina, arginina y ornitina (LAO). Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Yang, A. and Mancera, R. (2008). Molecular dynamics simulations of ligand-induced backbone conformational changes in the binding site of the periplasmic lysine-, arginine-, ornithine-binding protein. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 22(11), pp.799-814.