



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO DE LAS BASES TERMODINÁMICAS Y ESTRUCTURALES QUE
DETERMINAN LA ALTA AFINIDAD PARA LA UNIÓN DE LIGANDOS POR
PARTE DE LA PROTEÍNA DE UNIÓN A LISINA, ARGININA Y ORNITINA (LAO)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Jesús Renán Vergara Gutiérrez

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco
Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Miguel Antonio Costas Basin
Facultad de Química, UNAM

Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella
Instituto de Biotecnología, UNAM

Ciudad de México. Diciembre, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

El desarrollo de este proyecto fue financiado por PAPIIT IN 220616, CONACYT 254514 y la Facultad de Medicina de la UNAM.

Agradezco el apoyo económico recibido por parte del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para realizar una estancia de investigación en la Universidad de Washington, Seattle, Estados Unidos.

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

CONTENIDO

ABREVIATURAS	2
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	5
HIPÓTESIS	12
OBJETIVO	13
Objetivos particulares	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Mutagénesis sitio dirigida	14
Expresión y purificación de proteína	15
Calorimetría de titulación isotérmica	16
Cristalografía de rayos-X	18
Cálculo de los valores de ΔC_p experimentales y basados en estructura	21
RESULTADOS	22
Termodinámica de unión y estructura cristalográfica de las mutantes pertenecientes al “grupo de unión a cadena principal” (D161A, S72A y R77A)	26
Termodinámica de unión y estructura cristalográfica de las mutantes pertenecientes al “grupo de unión a motivo guanidino” (D11A y S69A)	32
Termodinámica de unión y estructura cristalográfica de las mutantes pertenecientes al “grupo de unión a motivo guanidino” (Y14A y F52A)	36
Termodinámica de unión y estructura cristalográfica de las mutantes pertenecientes al “grupo de unión mediada por agua” (D30A y S70A)	42
Cálculos de ΔC_p para la unión de ligandos	46
Estado conformacional semi-abierto	51
DISCUSIÓN	52
Participación de los residuos de sitio de unión de LAO en la afinidad y selectividad	52
Participación del solvente en la termodinámica de unión	54
Capacidad calorífica de unión	55
Conformaciones semi-abiertas y el complejo de encuentro	55
Comparación entre PBPs relacionadas	56
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	60
REFERENCIAS	62

ABREVIATURAS

ASA = Área accesible al solvente

HisJ = Proteína de unión a histidina

ITC = Calorimetría de titulación isotérmica

K_d = Constante de disociación

LAO = Proteína de unión a lisina, arginina, ornitina

PBP = Proteína de unión a ligando

SBP = proteína de unión a sustrato

ΔG_b = Cambio en la energía libre de unión

ΔH_b = Cambio en la entalpía de unión

$-T\Delta S_b$ = Cambio en la entropía de unión

$\Delta\Delta G_{mut-wt}$ = Diferencia entre el cambio en la energía libre de unión de la proteína mutante y el de la proteína silvestre ($\Delta G_{mut} - \Delta G_{wt}$)

$\Delta\Delta H_{mut-wt}$ = Diferencia entre el cambio en la entalpía de unión de la proteína mutante y el de la proteína silvestre ($\Delta H_{mut} - \Delta H_{wt}$)

$\Delta(-T\Delta S)_{mut-wt}$ = Diferencia entre el cambio en la entropía de unión de la proteína mutante y el de la proteína silvestre ($-T\Delta S_{mut} - (-T\Delta S)_{wt}$)

$\Delta\Delta G_{arg-his}$ = Diferencia entre el ΔG_b para la unión de arginina e histidina ($\Delta G_{arg} - \Delta G_{his}$)

RESUMEN

La comprensión detallada de las bases energéticas y estructurales que guían el reconocimiento molecular es crucial para entender adecuadamente los procesos celulares y lograr nuevos avances biotecnológicos.

Las proteínas periplásmicas de unión (PBPs) forman parte de los sistemas de transporte periplásmico bacterianos, los cuales están involucrados en la translocación de nutrientes al citoplasma de bacterias gram negativas. Las PBPs son utilizadas como modelo de estudio de los procesos de asociación proteína-ligando y se han empleado para desarrollar biosensores. Diversos grupos han buscado rediseñar los sitios de unión de dichas macromoléculas con el propósito de generar nuevos complejos PBP-ligando. Sin embargo, el diseño de nuevas interacciones proteína-ligando con alta afinidad y especificidad ha resultado un desafío. Esto indica que la comprensión actual de las bases estructurales que guían la energética de unión es limitada. Por ello, es necesario profundizar en el estudio de los procesos de asociación en tales sistemas.

La proteína LAO es una PBP involucrada en el transporte de los aminoácidos básicos L-arginina y L-histidina en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. LAO interactúa con ambas moléculas en el mismo sitio de unión, el cual está formado por los residuos D161, S72, R77, Y14, F52, D11, S69, D30 y S70. Los valores de K_d para la unión de arginina e histidina son de 1 nM y 2.7 μ M, respectivamente, lo cual representa una diferencia en afinidad de cuatro órdenes de magnitud. Las estructuras cristalográficas de LAO en presencia de ambos ligandos sugieren que los residuos D11 y S69 son responsables de tal diferencia. El objetivo de este trabajo es el estudio de la contribución de todos los residuos que conforman el sitio de unión de LAO a la energética de asociación. Para ello, se realizó un escaneo de alaninas y se estudió el efecto termodinámico y estructural de las mutantes en la unión de arginina e histidina a través de experimentos de calorimetría de titulación isotérmica y cristalografía de rayos X. Como resultado, se encontró que la diferencia de cuatro órdenes de magnitud en la afinidad no depende exclusivamente de los contactos formados por D11 y S64. Además de ello, los datos cristalográficos sugieren que la contribución de las interacciones proteína-ligando a la

termodinámica de unión está influenciada por el solvente. Finalmente, se encontró que el estado cerrado de la proteína no es perturbado por las mutaciones, no obstante, la conformación del estado abierto es modificada por la remoción de los residuos R77 y F52.

INTRODUCCIÓN

Las proteínas son macromoléculas que llevan a cabo una gran diversidad de funciones dentro y fuera de la célula, como es el transporte de nutrientes, la producción de ATP, la catálisis de las reacciones metabólicas y la respuesta inmune, entre otras. Para llevar a cabo estas funciones, las proteínas requieren interactuar con otras moléculas, por ello, el estudio del reconocimiento molecular es esencial para entender a detalle los procesos celulares.

La asociación proteína-ligando depende de la formación de contactos no covalentes entre las moléculas interactuantes (puentes de hidrógeno, interacciones iónicas, interacciones de van de Waals), los cuales, a su vez, determinan la termodinámica de unión [1–5]. La afinidad de interacción está relacionada con la energía libre de unión (ΔG_b) de acuerdo a la ecuación 1.

Ecuación 1.
$$\Delta G = -RT \ln K_d$$

El valor de ΔG_b , por su parte, depende de dos parámetros termodinámicos: 1) el cambio en entalpía de unión (ΔH_b), el cual está asociado directamente con la formación de las interacciones antes mencionadas, y 2) el cambio en entropía de unión (ΔS_b), el cual está relacionado con el cambio en los grados de libertad de las moléculas implicadas en la interacción (ecuación 2).

Ecuación 2.
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Es importante mencionar que otra característica estructural que tiene un gran impacto en la termodinámica de unión es el solvente [6,7]. De este modo, comprender detalladamente la manera en la cual las interacciones proteína-ligando, en conjunto con el solvente, “modulan” la termodinámica de asociación es parte fundamental en el estudio de los procesos de reconocimiento molecular. Además, tal conocimiento es necesario para el diseño exitoso de nuevos complejos proteína-ligando con fines médicos y biotecnológicos. Desafortunadamente, el diseño de nuevas interacciones proteína-ligando con alta afinidad y selectividad aun representa un gran reto [8–11]. Por ello, es importante continuar el estudio de los

procesos de asociación de los complejos proteína-ligando presentes en la naturaleza.

Las proteínas de unión a sustrato (SBPs por sus siglas en inglés) participan en varios procesos de señalización y transporte en organismos procariontes y eucariontes [12]. Dichas proteínas se encuentran asociadas a diversos complejos de membrana, entre los cuales se encuentran los transportadores ABC, receptores asociados a proteínas G, sistemas de dos componentes y canales iónicos, entre otros. Todas las SBPs están constituidas por dos dominios o lóbulos (α/β) unidos por una región de bisagra (figura 1A) y pueden presentar un peso molecular entre 25 y 70 kDa. El sitio de unión a ligandos se encuentra ubicado entre ambos dominios, cerca de la región de bisagra. Estas macromoléculas han sido clasificadas en seis grupos o clases (A-F) con base a las características estructurales mostradas por la región de bisagra [12]. Las proteínas pertenecientes al grupo A presentan una hélice α conectando a ambos dominios mientras que los miembros del grupo B muestran tres segmentos polipeptídicos sin estructura secundaria definida. Por su parte, la zona de bisagra en los miembros del grupo C está constituida por un tercer dominio, el cual, de acuerdo a Berntsson y colaboradores, podría ser necesario para la unión de péptidos, principales ligandos de estas proteínas. De manera similar al grupo B, los miembros de las clases D y F muestran dos segmentos polipeptídicos conectando a ambos dominios, siendo su longitud la principal diferencia entre los dos grupos. Finalmente, las proteínas pertenecientes al grupo E presentan una hélice α y una hebra β formando parte de la zona de bisagra.

Las SBPs pueden interactuar con una gran variedad de moléculas de bajo peso molecular, entre las cuales podemos encontrar carbohidratos (ej. glucosa, lactosa, arabinosa, maltosa), aminoácidos (ej. arginina, leucina, lisina, histidina), metales (ej. zinc, hierro, manganeso), vitaminas (ej. vitamina B12), péptidos, entre otras, mostrando afinidades en el orden nM a μ M. La asociación SBP-ligando está acompañada por un movimiento de cuerpo rígido tipo “fly trap” por el cual las SBPs pasan de una conformación abierta a una conformación cerrada [13–15] (figura 1B). Varios biosensores se han desarrollado a partir de SBPs al acoplar dicho cambio

conformacional a una señal detectable, como la fluorescencia, por esta razón tales macromoléculas son de gran importancia biotecnológica [14,16–20].

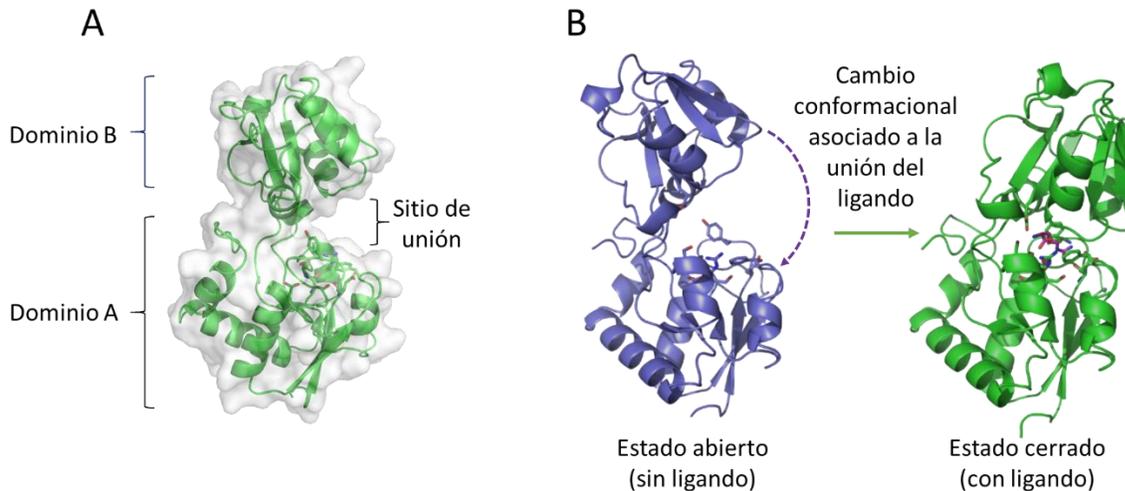


Figura 1. La asociación del ligando induce un cambio conformacional en la estructura de LAO . A) Representación de “caricaturas” y superficie de la estructura cristalográfica de LAO wt (PDB: 2LAO) donde se indican la posición de los dominios denominados A y B, así como el sitio de unión. B) Cambio conformacional asociado a la unión del ligando. El estado abierto (sin ligando) se muestra en color púrpura mientras que el estado cerrado (con ligando) se muestra en color verde; la flecha punteada representa el movimiento de los dominios.

Las proteínas periplásmicas de unión (PBPs por sus siglas en inglés) son un grupo de SBPs asociadas a transportadores ABC las cuales están involucradas en la internalización de diversos nutrientes al citoplasma de bacterias gram negativas [12–15]. Estas proteínas son sintetizadas con una secuencia señal para su exportación al periplasma bacteriano, la cual es proteolisada en dicho compartimiento. Las PBPs unen a sus ligandos para posteriormente asociarse al transportador ABC correspondiente, el cual se encuentra insertado en la membrana interna (figura 2). Todos los transportadores ABC están constituidos por cuatro dominios estructurales: dos dominios transmembranales (TMDs por sus siglas en inglés) y dos dominios de unión a nucleótido (NBDs por sus siglas en inglés), los cuales se encuentran localizados en la cara citoplásmica de la membrana interna [21,22]. La interacción PBP-transportador se lleva a cabo entre la cara periplásmica

del transportador y ambos dominios de la PBP; posterior a su interacción, los dominios NBD catalizan la hidrólisis de ATP lo cual propicia la apertura de la PBPs y el transporte del ligando (figura 2) [23].

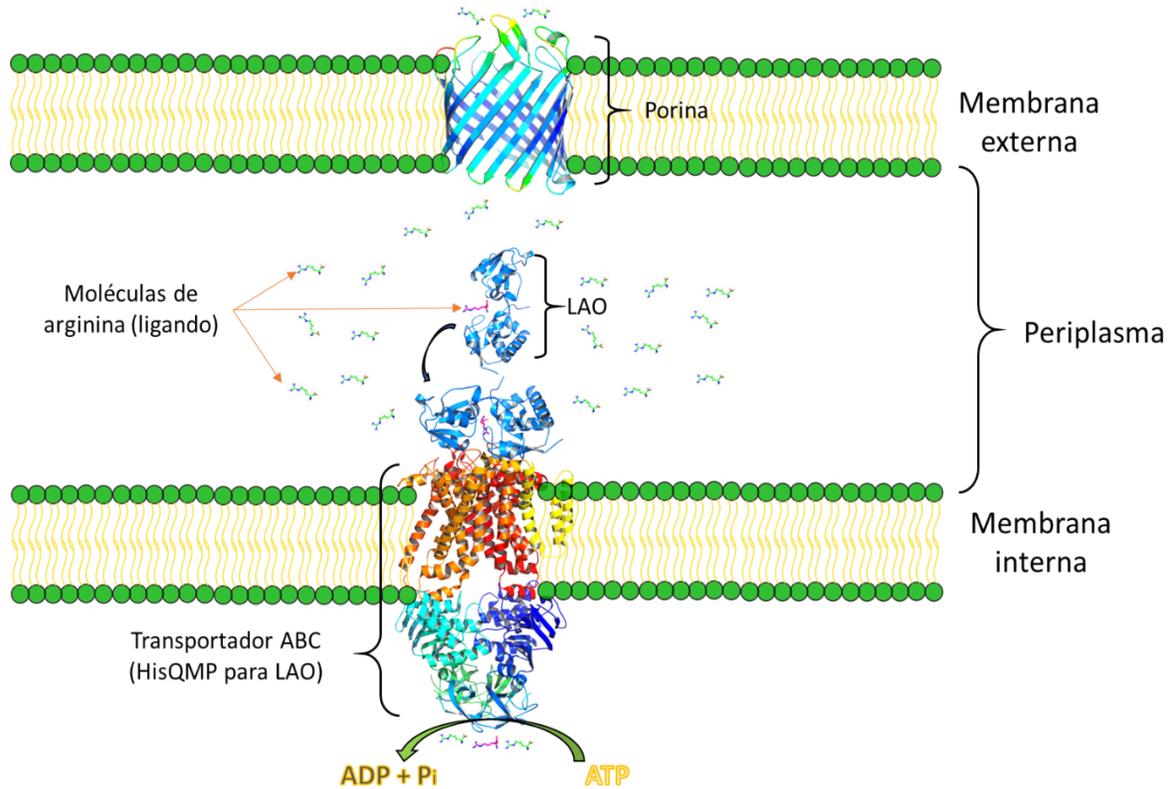


Figura 2. Las PBPs se asocian a transportadores ABC para la internalización de nutrientes al citoplasma bacteriano. Representación gráfica del sistema de transporte de membrana utilizado por la PBP LAO para la internalización de aminoácidos básicos (lisina, arginina, ornitina e histidina).

En general, una sola PBP pueda unir más de un ligando en el mismo sitio de unión con diferentes afinidades y proteínas homólogas pueden unir los mismos ligandos con distintas selectividades, por ello, las PBPs se han usado ampliamente como modelo de estudio de los procesos de asociación [6,15,24–32]. Los datos estructurales obtenidos para los complejos PBP-ligando han mostrado que la presencia de residuos aromáticos y moléculas de solvente, además de otros residuos capaces de formar interacciones favorables con el ligando, juegan un papel importante en la interacción [25,26,30,31,33,34]. Por su parte, los estudios

termodinámicos muestran una correlación entre la polaridad del ligando, la entalpía y la entropía de unión (polares guiadas por entalpía y apolares por entropía), sin embargo, existen diversos casos que siguen un comportamiento distinto (ej. Ligando polar guiado por entropía) [25,27–30,33,35]. A pesar todos los trabajos realizados con PBPs, aún es complicado entender a detalle la manera en la cual las características estructurales de los complejos PBP-ligando determinan la energética (y cinética) de interacción. Varios grupos han buscado rediseñar los sitios de unión de ciertas PBPs con el propósito de estudiar las bases estructurales de su selectividad así como generar nuevos biosensores, basado en los conocimientos adquiridos hasta ahora. A pesar de que se ha logrado que algunas PBPs interactúen con moléculas distintas a los ligandos naturales, no ha sido posible reproducir las mismas características energéticas (ej. alta afinidad) [14,33,36]. Por ello, diversos autores han hecho hincapié en que es necesario estudiar con mayor profundidad los complejos PBP-ligando.

Entre las PBPs estudiadas previamente se encuentra la proteína de unión a lisina, arginina y ornitina (LAO), una proteína de 238 residuos cuyos ligandos son los aminoácidos básicos L-lisina, L-arginina, L-ornitina y L-histidina, siendo arginina e histidina los de mayor y menor afinidad, respectivamente (tabla 1) [31,37,38]. Desde el punto de vista biológico, LAO pertenece al sistema de transporte de aminoácidos básicos presente en *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* [27,37,39,40]. Posterior a la unión del ligando, LAO interactúa con el complejo de membrana HisQMP₂ quien transporta al aminoácido en cuestión al citoplasma bacteriano a partir de la hidrólisis de ATP (figura 2) [27,39]. Dicho complejo de membrana se comparte con la proteína de unión a histidina (HisJ), ambas proteínas muestran un 70% de identidad en secuencia y unen los mismos ligandos con afinidades opuestas [27,31,37–39].

El sitio de unión de LAO está constituido por los residuos Arg-77, Asp-161, Ser-72, Tyr-14, Phe-52, Asp-11, Ser-69, Ser-70 y Asp-30 (figura 3). Los residuos Arg-77, Asp-161 y Ser-72 interactúan con los grupos amino y carboxilo de todos los ligandos, mientras que la Tyr-14 y la Phe-52 realizan interacciones catión- π con la

cadena lateral. Por su parte, el residuo Asp-11 solo interactúa con los ligandos arginina y lisina, mientras que la cadena lateral de Ser-69 interactúa exclusivamente con el grupo guanidino del ligando arginina. Por último, la cadena lateral de los residuos Ser-70 y Asp-30 hacen contacto con una molécula de agua (a la cual llamaremos Wat1) quien interactúa directamente con el grupo guanidino del ligando arginina. El cambio conformacional asociado a la unión del ligando, característico de las PBPs, también se observa en LAO. Dicha modificación estructural es una rotación de 52° de un lóbulo con respecto al otro alrededor de un eje imaginario ubicado en la zona de bisagra.

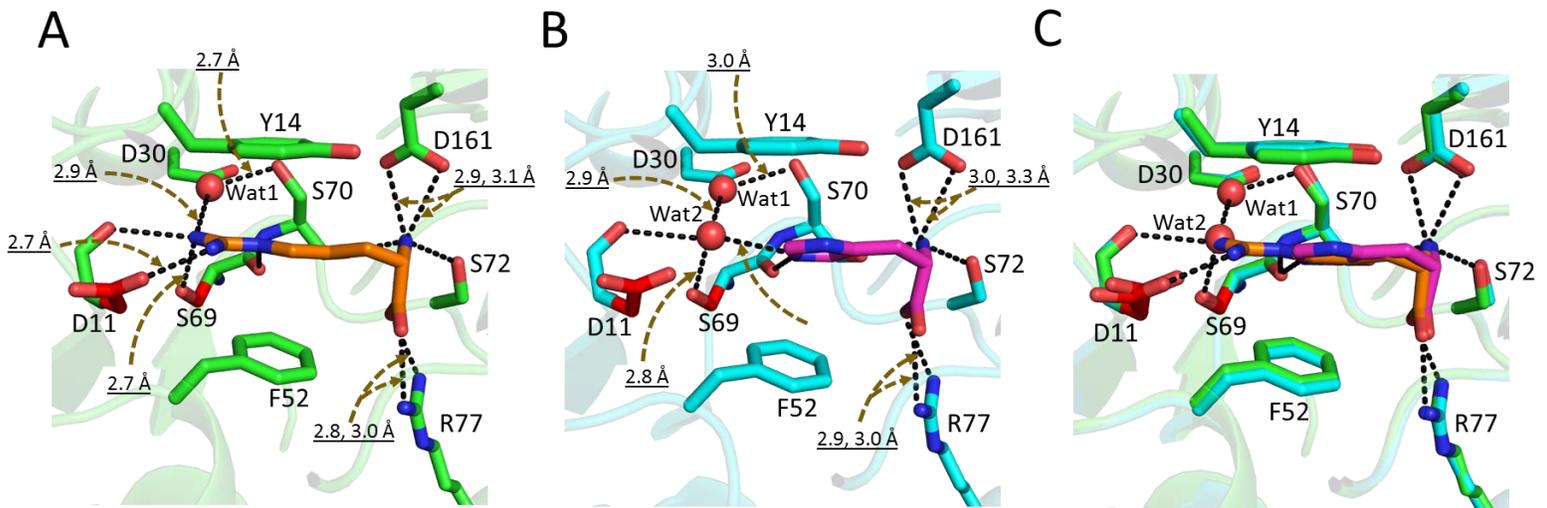


Figura 3. El sitio de unión de LAO adopta conformaciones similares en presencia de arginina e histidina. A) Sitio de unión en presencia de arginina (PDB ID: 1LAF, ligando en color naranja); los residuos que lo integran se muestran en “sticks” verdes mientras que la molécula de agua denominada Wat1 se representa como una esfera roja. B) Sitio de unión en presencia de histidina (PDB: 1LAG, ligando en color magenta); los residuos que lo integran se muestran en “sticks” color azul claro mientras que las esferas rojas representan a las moléculas de agua Wat1 y Wat2. C) Alineamiento de los sitios de unión mostrados en los paneles A y B.

Previamente en el laboratorio se estudió la termodinámica de unión de LAO en presencia de arginina e histidina a partir de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) [28]. La afinidad obtenida por ITC fue de 1 nM para la unión de arginina y 2.7 μ M para la unión de histidina (tabla 1), similar a los valores obtenidos anteriormente por diálisis al equilibrio [31]. En ambos casos, el proceso de asociación está guiado

por entalpía y la diferencia en afinidad para la unión de estos ligandos ($\Delta\Delta G_{\text{arg-his}} = 4.7 \text{ kcal mol}^{-1}$) es principalmente entálpica ($\Delta\Delta H_{\text{arg-his}} = 3.1 \text{ kcal mol}^{-1}$). Tales resultados correlacionan con el número de interacciones proteína-ligando que se observan en las estructuras de la LAO en complejo con arginina e histidina, en los que las cadenas laterales de los residuos D11 y S69 realizan contacto directo sólo con el primer ligando (figura 3, residuos en color rojo). Por ello, se propuso que D11 y S69 son los residuos responsables de la diferencia de afinidad entre la unión de arginina e histidina. Tal hipótesis nos lleva a plantear las siguientes preguntas: ¿Son D11 y S69 los únicos residuos responsables de la diferencia de afinidad observada para unión de arginina e histidina?, ¿Cuál es la contribución a la termodinámica de interacción de cada uno de los residuos del sitio de unión de LAO?, ¿Cuál es el papel que juegan las moléculas de agua presentes en el sitio de unión de LAO en la afinidad? Para dar repuestas a tales preguntas estudiamos la contribución de todos los residuos del sitio de unión de LAO a la energética de unión de los ligandos arginina e histidina. Para ello se realizó un escaneo de alaninas de los residuos D161, S72, R77, Y14, F52, D11, S69, D30 y S70 y se estudió el efecto termodinámico y estructural de las mutantes sencillas en la unión de ambos ligandos a través de experimentos de ITC y cristalografía de rayos X.

Tabla 1. Afinidad de unión para los ligando de LAO

Ligando	K_d (nM)
Arginina ^a	1.0
Lisina ^b	15
Ornitina ^b	29
Histidina ^a	2.7×10^3

^a Valores obtenidos a partir de experimentos de ITC.

^b Valores obtenidos a partir de experimentos de diálisis al equilibrio.

HIPÓTESIS

Los residuos D161 y R77 están conservados entre las PBS que unen aminoácidos, lo cual indica que son de gran relevancia para la unión de este tipo de moléculas. Por ello, se espera que tales residuos contribuyan de manera importante a la afinidad. No obstante, D161 y R77 interactúan de la misma forma con todos los ligandos, por lo cual, no deberían de contribuir a la selectividad. Por su parte, los estudios termodinámicos descritos previamente sugieren que la discriminación entre arginina e histidina está determinada por D11 y S69 [28]. De este modo, se espera que la contribución de estos residuos a la unión de cada ligando sea distinta. En cuanto a Y14 y F52, los estudios de dinámica molecular realizados por Silva y colaboradores indicaron que las interacciones catión-pi formadas por tales residuos son sumamente importantes en el proceso de unión [41]. De ser así, Y14 y F52 deberían de mostrar una contribución relevante a la afinidad. Finalmente, Ames y colaboradores sugirieron que la molécula de agua que se encuentra posicionada entre los residuos S70, D30 y el ligando también juega un papel importante en la asociación LAO-ligando [38]. Por ello, se espera que la perturbación de las interacciones formadas con esta molécula de agua tenga un efecto relevante en la unión.

OBJETIVO

Estudiar la contribución de los residuos del sitio de unión de LAO a la termodinámica de asociación a los ligandos arginina e histidina.

Objetivos particulares

- Generar mutantes de alanina de los residuos D161, S72, R77, Y14, F52, D11, S69 y D30.
- Realizar experimentos de calorimetría de titulación isotérmica a 25 °C de las mutantes en presencia de arginina e histidina para caracterizar la termodinámica de unión de ambos ligandos.
- Determinar la contribución de los residuos del sitio de unión a la afinidad y selectividad de LAO a partir de los resultados termodinámicos.
- Realizar experimentos de calorimetría de titulación isotérmica de las mutantes en presencia de arginina e histidina a distintas temperaturas para obtener los valores de capacidad calorífica de unión.
- Obtener estructuras cristalográficas de las mutantes en ausencia y presencia de ligandos para establecer una relación entre los efectos termodinámicos y estructurales de las mutaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Mutagénesis sitio dirigida

Cada una de las mutantes sencillas de los residuos del sitio de unión de LAO se generaron por mutagénesis sitio dirigida a partir del gen de LAO silvestre (*argT*) previamente clonado en el vector de expresión pET 12b. Para ello, se diseñaron y sintetizaron oligonucleótidos (IDT®) en los cuales se sustituyó el codón del residuo a mutar por el codón GCG el cual codifica para alanina (tabla 2). Con tales oligonucleótidos se amplificó completamente el plásmido pET 12b-*argT* por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para lo cual se utilizó la DNA polimerasa de alta fidelidad y procesividad Pfu-X (Jena Bioscience). EL protocolo de PCR implementado se describe a continuación: 1) desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos, 2) desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, 3) asociación a 62°C por 30 segundos, 4) elongación a 72 °C por 8 minutos, 5) elongación final a 75 °C por 20 minutos. El producto de PCR se incubó por 1 hora a 37 °C en presencia de la enzima DpnI (New England BioLabs) la cual digiere el DNA parental metilado. Finalmente, se transformaron células quimiocompetentes de *Escherichia coli* de la cepa XL 1-Blue con el producto de la digestión de DpnI y se crecieron en cajas de medio Luria Bertani (LB) con ampicilina para obtener un plásmido circular mutante.

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos usados para generar las mutaciones

Mutante	Oligonucleótido
D161	5'-CGC ATT ACA GGC TGA AGT CGC CG -3'
R77A	5'-ATC ACC GAT AAA GCC CAG CAA GAA AT -3'
S72A	5'-TTCATC GCT CGC TAT CAC CGA TA -3'
D11A	5'-CTC ATC AAA AGC TGC CAA AGG C -3'
S69A	5'-TGC CAT TAT TGC ATC GCTCTC TA -3'
Y14A	5'-ATA CCA CCG CCG CGC CTT T -3'
F52A	5'-CCA GCG ACG CTG ATG CGC T -3'
D30A	5'-TAT TGG CTT TGC TAT CGA TCT C-3'
S70A	5'-CCA TTA TTT CAG CGC TCT CTA TAC -3'

Expresión y purificación de proteína

La expresión de proteína se llevó a cabo en células de *E. coli* de la cepa BL21-A1 las cuales se transformaron con el DNA mutante por choque térmico y sembradas en una caja con medio LB + ampicilina para obtener colonias aisladas. A partir de una colonia se inocularon 10 mL de medio “terrific broth” (TB) + 100 µg/mL de ampicilina, los cuales se incubaron a 37 °C toda la noche. Los 10 mL de cultivo se transfirieron a un matraz con 1L de medio TB + 100 µg/mL de ampicilina el cual se incubó a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica (600 nM) de 0.8 -1.0. Una vez alcanzada la densidad óptica adecuada, la expresión de proteína se indujo con 0.25%de L-arabinosa, incubando a 37 °C por 4 horas. Todas las mutantes se expresaron con la secuencia de exportación a periplasma MKKSILALSLLVGLSTAASSYA, la cual se proteoliza en dicho compartimiento. De este modo, la proteína se extrajo del periplasma celular utilizando el método de choque osmótico. Para ello, las células se recolectaron centrifugando el medio de cultivo a 5129 g por 10 minutos y se resuspendieron suavemente en una solución de acetato de potasio 10 mM pH 5.1 + 20% de sacarosa + 1 mM de EDTA. Después de permanecer por 10 minutos en hielo, las células se centrifugaron por segunda ocasión en las condiciones antes mencionadas y se resuspendieron en una solución de acetatos de potasio 10 mM pH 5.1. Las células permanecieron en hielo por 20 minutos más y posteriormente se centrifugaron a 15256 g por 20 minutos. El sobrenadante, el cual contiene a la proteína, se recolectó y se colocó en un filtro Amicon® (Merck KGaA) Ultra-15 de 10K donde se agregó una solución de Tris 5 mM pH 8.5 + 2 M de cloruro de guanidina para desnaturalizar a la proteína y eliminar el ligando unido. El filtro se centrifugó hasta llevar a la muestra a un volumen de aproximadamente 3 mL y se agregó nuevamente la solución con cloruro de guanidina hasta completar un volumen de 15 mililitros; el proceso se repitió por 5 ocasiones. Posteriormente, se agregó una solución de Tris 5 mM pH 8.5 para eliminar el desnaturalizante y replegar a la proteína. El filtro se centrifugó y nuevamente se agregó la solución antes mencionada; el proceso se repitió por 5 ocasiones. Finalmente, se utilizó cromatografía de intercambio aniónico, para ello la muestra previamente filtrada se inyectó a una columna HiTrap™ Q HP (GE Healthcare

Bio-Sciences) y la elución se llevó a cabo con un gradiente lineal de 0-500 mM de NaCl. En todos los casos la proteína eluyó a una concentración de NaCl de aproximadamente 50 mM.

Calorimetría de titulación isotérmica

Los experimentos de unión se realizaron a temperaturas entre 10 °C y 40 °C, utilizando un calorímetro TA de bajo volumen (TA Instruments). La solución amortiguadora utilizada para todas las titulaciones fue HEPES 10 mM pH= 8.0, tal como se describe en [28]. Las muestras de proteína se dializaron exhaustivamente con el mismo amortiguador usado para diluir los ligandos con el objetivo de disminuir al máximo el calor de dilución. La muestra de proteína previamente degasificada fue cargada en la celda de 0.17 mL a concentraciones de 50 μ M a 600 μ M; por su parte, el ligando se cargó en la jeringa a concentraciones de 0.5 mM a 100 mM. Cada experimento se llevó a cabo realizando inyecciones de 1 μ L de ligando a la celda, con un tiempo de espera entre inyecciones de 300 s, agitando a 100 rpm. Para la mutante S69A se llevaron a cabo experimentos de unión a arginina de manera convencional y por desplazamiento. Para el ensayo de desplazamiento se preparó una muestra de 100 μ M de proteína + 4 μ M de histidina la cual se tituló con arginina 4 μ M.

Todos los datos experimentales se analizaron utilizando el programa Affinimeter [42]. Los valores de las constantes de disociación (K_d), los cambios en entalpía (ΔH) y la estequiometría de unión (n) se calcularon a partir del ajuste no lineal de las curvas de titulación normalizadas a un modelo de unión 1:1 (figura 4). Los valores de calor de dilución se obtuvieron del ajuste de las isotermas (calculados de la zona del ajuste donde se alcanza la saturación) y se restaron de los valores de entalpía. Los valores de ΔG y ΔS de unión se calcularon a partir de las ecuaciones 1 y 2 con base a los valores experimentales de K_d y ΔH .

La forma de las curvas de titulación depende del valor “ c ”, el cual está definido como el producto del número de sitios de unión n por la concentración de proteína [M], dividido entre la constante de disociación K_d (ec. 3).

Ecuación 3.

$$c = n [M]/K_d$$

A valores de c mayores a 5 se obtienen curvas sigmoidales donde la pendiente de la transición es proporcional a c . Por otra parte, a valores de c menores a 5 se obtienen curvas hiperbólicas, las cuales pueden llevar a una estimación incorrecta de los valores de ΔH debido a la dificultad para calcular adecuadamente el valor de n . Por ello, las concentraciones de proteína utilizadas se optimizaron con el objetivo de obtener valores de c mayores a 5. Sin embargo, para las titulaciones con L-histidina de las mutantes S72A, D161A, R77A, D11A, Y14A, F52A y D30A, así como la titulación con arginina de F52A no fue posible obtener valores de c mayores a 5 (tablas 4, 6, 8 y 10, sección de resultados) debido a que las concentraciones de proteína requerida era demasiado elevada. Con el objetivo de obtener datos termodinámicos confiables se realizaron tres repeticiones de los experimentos donde c fue mayor a 1 y cuatro cuando c fue menor a 1, en este último caso las curvas se ajustaron fijando el valor de n a 1.0 de acuerdo a [43]. Los valores reportados en la tabla 3 en la sección de resultados son el promedio \pm desviación estándar obtenidos de tres o cuatro réplicas.

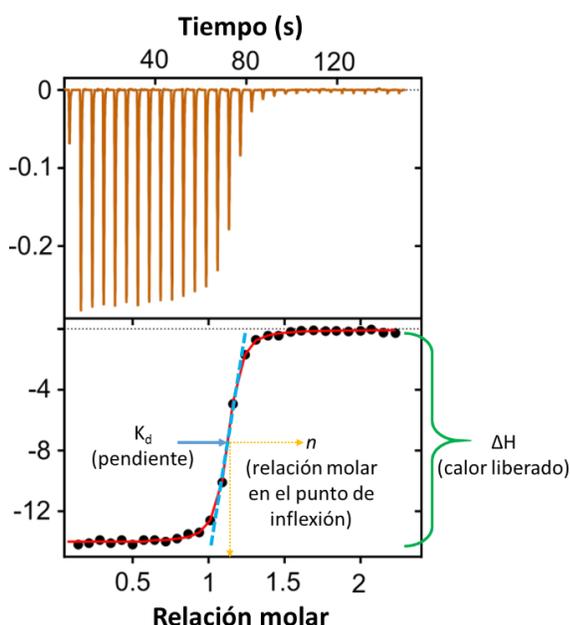


Figura 4. El análisis de los experimentos de ITC permite calcular la afinidad, la estequiometría y el cambio en entalpia de unión. En la parte superior se muestra un experimento representativo de ITC mientras que en el panel inferior se encuentra la curva de titulación que se obtiene de tales datos (círculos negros), ajustada a un modelo de unión 1:1 (línea roja). El valor de K_d se obtiene de la pendiente de la transición en la curva de titulación (línea azul) mientras que la estequiometría se obtiene de la relación molar en el punto de inflexión (flecha amarillas). Por su parte, el valor de ΔH representa la suma del calor liberado debido a la unión del ligando.

Cristalografía de rayos-X

Para los ensayos de cristalización, todas las proteínas se dializaron con una solución amortiguadora de HEPES 10 mM pH 8.0 y se concentraron utilizando filtros Amicon® Ultra-5 de 10K hasta alcanzar una concentración de aproximadamente 10 mg/mL. Se utilizó el método de difusión de vapor por gota colgante montado en cajas Limbro, para lo cual se probaron las mismas condiciones usadas previamente para la cristalización de LAO silvestre [38]. En ausencia de ligando, las gotas se prepararon mezclando una muestra de proteína con solución precipitantes en una relación 1:1, por otra parte, las pruebas con ligando se realizaron agregando una muestra de arginina o histidina 100 mM en HEPES 10 mM pH = 8.0 a la gota en una relación proteína-precipitante-ligando = 1/3:1/3:1/3. Se obtuvieron cristales incubando las gotas a 18 °C, en una solución precipitante de acetatos de potasio + cacodilato de sodio + PEG 800. La colecta de datos de difracción se llevó a cabo a una temperatura de -173 °C (100 K) con un detector DECTRIS PILATUS 200 K, oscilando 0.25° por cuadro. La fuente de rayos-X fue un ánodo rotatorio Rigaku MicroMax-007 HF el cual genera ondas electromagnéticas de 1.5418 Å en longitud de onda. Para la colección de datos se incluyeron reflexiones que mostraron picos de Bragg a alta resolución con un I/σ de 2 en al menos 2 cuadros (0 y 90 grados). Para la reducción de datos se seleccionó la capa con los mejores valores de R_{merge} y R_{pim} de acuerdo con la redundancia. Los datos obtenidos de la colecta se integraron y escalaron con el programa HKL-3000R [44]. El número de moléculas por unidad asimétrica se determinó a partir del cálculo del coeficiente de Matthews en CCP4 v.6.1.2 [45].

Las estructuras tridimensionales se determinaron por remplazo molecular con el programa PHASER, el cual es parte del conjunto de programas PHENIX [46], para ello se utilizaron las estructuras previamente resueltas de LAO silvestre en ausencia de ligando (PDB ID: 2LAO) y en presencia de arginina (PDB ID: 1LAF) e histidina (PDB: 2LAG). Los modelos se corrigieron y mejoraron a través de la inspección de los mapas de densidad electrónica utilizando el programa COOT [47]; el afinamiento

se llevó a cabo con phenix.refine [46]. Cada estructura se validó con MolProbity [48], así como el servidor de validación del Protein Data Bank (PDB) [49].

Dado que no hay factores de estructura depositadas en el PDB para LAO wt-arg (PDB ID: 1LAF), decidimos resolver nuevamente dicha estructura para asegurarnos que nuestras comparaciones estructurales están basadas en modelos resueltos adecuadamente (tabla 3). El alineamiento de la estructura previa (1LAF) con la que resolvimos en este trabajo (6MLE) arroja un RMSD calculado para todos los átomos 0.28 Å, lo cual indica que ambas estructuras son casi idénticas (figura 5).

Todas las imágenes mostradas en este trabajo fueron generadas con el programa PyMOL v1.5.0.4 (Schrödinger, LLC). Los mapas de densidad electrónica presentados son mapas de omisión compuesto con recocido simulado (2mFo-dFc).

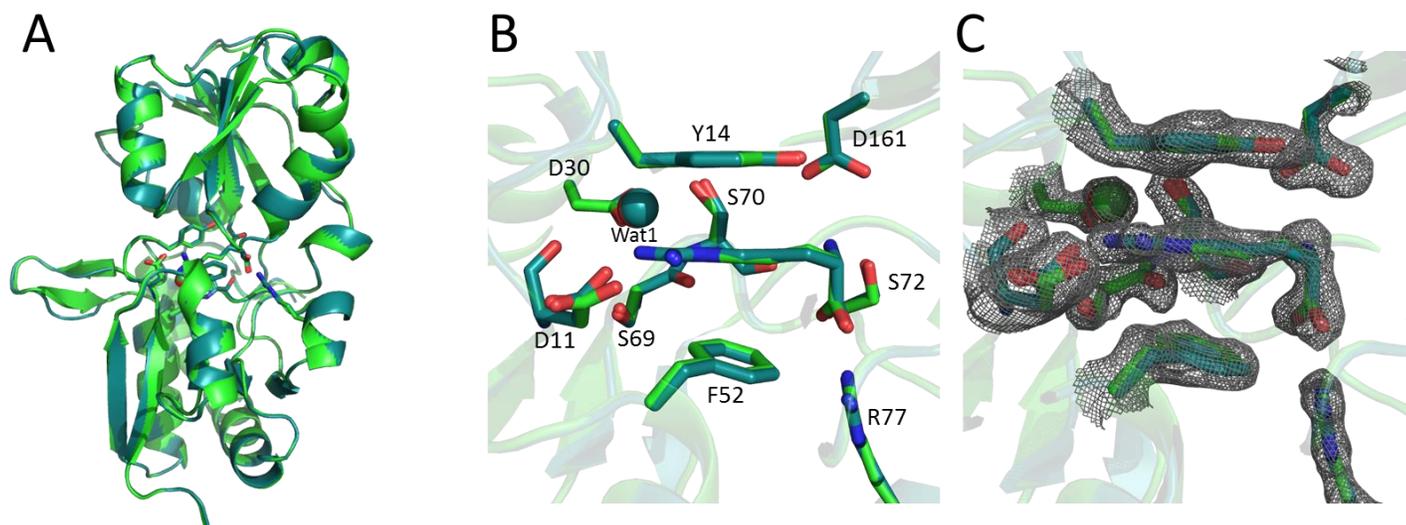


Figura 5. La estructura cristalográfica de LAO-arginina resuelta en este trabajo no presenta diferencias significativas con la estructura resuelta previamente . A) Alineamiento de las estructuras de LAO wt en presencia de arginina resueltas de manera independiente (1LAF se muestra en verde claro y 6MLE en verde fuerte); (RMSD = 0.28 Å). B-C) Acercamiento al sitio de unión del alineamiento mostrado en el panel A; en el panel C se muestra el mapa de densidad electrónica de omisión (2mFo-dFc) contorneado a 1σ .

Tabla 3. Colección de datos y estadísticas de afinamiento para LAO wt en presencia de arginina

Colecta de datos ^a	
Mutante	LAOwt arg
PDB ID	6MLE
Resolución (Å)	50.00-1.85 (1.88-1.85)
Grupo espacial	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)
Dimensiones de la celda unitaria	
a, b, c, (Å)	37.32, 58.93, 115.38
Mosaicismo	0.57-1.44
Reflexiones totales	84120 (6203)
Reflexiones únicas	21780 (2001)
Multiplicidad	3.9 (3.1)
Integridad (%)	98.3 (95.8)
I / sigma (I)	19.9 (2.2)
R-merge	0.120 (0.508)
CC1/2	0.992 (0.614)
Estadísticas de afinamiento	
R _{work} , R _{free}	0.171 , 0.226 (0.268, 0.3329)
Factor B promedio (Å ²)	22.2
Proteína	20.7
Ligando	34.2
Solvente	30.0
Factor B de Wilson (Å ²)	22.0
Numero de átomos	2152
Proteína	1814
Ligando	8
Moléculas de agua	325
Residuos de la Proteína	238
RMS (enlaces) (Å)	0.007
RMS (ángulos) (°)	0.940
En zonas favorecidas del Ramachandran, (%)	97.00
En zonas permitidas del Ramachandran (%)	3.00
Fuera de las zonas permitidas del Ramachandran (%)	0.00
Choques	0.84

^a En paréntesis se muestran los datos para la capa de alta resolución.

Las estructuras cristalográficas y los factores de estructura se depositaron en el PDB con los siguientes códigos de acceso (tablas 3, 5, 7, 9 y 11): 6MLE (LAO wt con arginina), 6MLN (mutante S72A con arginina), 6MKX (mutante R77A sin ligando), 6MLG (mutante R77A con arginina), 6MLI (mutante R77A con histidina), 6MLA (mutante D161A con arginina), 6MLV (mutante Y14A sin ligando), 6MLO (mutante Y14A con arginina), 6MLP (mutante Y14A con histidina), 6MLD (mutante F52A sin ligando), 6MKU (mutante D11A con arginina), 6MKW (mutante D11A con histidina), 6MLO (mutante S69A sin ligando), 6ML9 (mutante D30A con arginina), and 6MLJ (mutante S70A con arginina).

Todas las imágenes mostradas en este trabajo fueron generadas con el programa PyMOL v1.5.0.4 (Schrödinger, LLC).

Cálculo de los valores de ΔC_p experimentales y basados en estructura

Los valores del cambio en capacidad calorífica de unión (ΔC_p) experimentales se calcularon a partir de la dependencia de los valores de ΔH y $-T\Delta S$ con la temperatura, tal y como indica la ecuación 4.

Ecuación 4.
$$\Delta C_p = \frac{d\Delta H}{dT} = \frac{Td\Delta S}{dT}$$

Para ello se graficaron los valores de ambos parámetros termodinámicos obtenidos a distintas temperaturas con respecto a dicha magnitud y se ajustaron a una ecuación lineal de manera independiente, el valor de la pendiente representa el valor de ΔC_p en $\text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$. Los valores de capacidad calorífica para cada mutante mostrados en la tabla 8 son el promedio de las pendientes obtenidas de los gráficos de ΔH y $-T\Delta S$ vs T en unidades de $\text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$.

Las estimaciones de los valores de ΔC_p obtenidos de las estructuras cristalográficas se calcularon a partir de ecuaciones paramétricas que relacionan al cambio en capacidad calorífica con cambios en el área accesible al solvente (ΔASA); (ec. 5-8) [50–53] . Los valores de ΔASA utilizados en los cálculos son la diferencia entre los valores de área accesible al solvente de los estados abierto y cerrado, calculados con el programa VADAR [54] a partir de las estructuras cristalográficas resueltas.

En aquellas mutantes para las que no se resolvió la estructura del estado abierto sin ligando, se utilizó la estructura de LAO silvestre mutada *in silico*. Los valores de reportados en la tabla 8 son el promedio de los resultados obtenidos mediante las ecuaciones 5 a 8.

Ecuación 5.
$$\Delta C_p = (0.32 \pm 0.04)(\Delta ASA_{np}) - (0.32 \pm 0.04)(\Delta ASA_{pol})$$

Ecuación 6.
$$\Delta C_p = (0.45 \pm 0.02)(\Delta ASA_{np}) - (0.26 \pm 0.03)(\Delta ASA_{pol})$$

Ecuación 7.
$$\Delta C_p = (0.51)(\Delta ASA_{np}) - (0.21)(\Delta ASA_{pol})$$

Ecuación 8.
$$\Delta C_p = (0.66 \pm 0.21)(\Delta ASA_{np}) - (0.52 \pm 0.32)(\Delta ASA_{pol})$$

RESULTADOS

Para facilitar el análisis de los datos, clasificamos a los residuos del sitio de unión de LAO en cuatro grupos. Los residuos D161, S72, R77, F52 y Y14 realizan interacciones estructuralmente equivalentes con los ligandos arginina e histidina, los primeros tres (clasificados como el “grupo de unión a amino y carboxilo”) interactúan con los grupos amino y carboxilo de ambas moléculas, mientras los dos últimos (pertenecientes al “grupo de unión a cadena lateral”) hacen contacto con la cadena lateral. Por otra parte, los residuos D11 y S69 (clasificados como el “grupo de unión al motivo guanidino”) interactúan con el motivo guanidino del ligando arginina, no obstante, ninguno de ellos hace contacto con el grupo imidazol de la histidina. Finalmente, los residuos D30 y S70 (pertenecientes al “grupo de unión mediado por agua”) interactúan con la cadena lateral del ligando arginina a través de una molécula de agua (Wat1). La molécula Wat1 no interactúa directamente con la cadena lateral de la histidina ya que se encuentran a una distancia mayor a 5 Å.

Las figuras 6 y 7 muestran las isotermas de unión de arginina e histidina a 25 °C para todas las mutantes. La mayoría de los experimentos de titulación con arginina (excepto F52A) y algunas con histidina (D11A, S69A y S70A) mostraron curvas de unión sigmoidales. En el caso particular de S69A fue necesario realizar el experimento de unión a arginina por competencia debido a que la transición tan abrupta no permite calcular la afinidad con precisión (figura 6, panel J). En contraste, la mayor parte de las titulaciones con histidina y una con arginina mostraron curvas hiperbólicas debido a que las afinidades mostradas en tales sistemas hicieron prácticamente imposible alcanzar valores de c mayores a 1.

Los valores de ΔG , ΔH o $-T\Delta S$ obtenidos de los experimentos de ITC a 25°C se encuentran reportados en las tablas 4, 6, 8 y 10. Por su parte, los efectos termodinámicos de las mutantes en la unión de ligandos son presentados en las figuras 8, 11, 13 y 16 como $\Delta\Delta X_{\text{Ligando}} = \Delta X_{\text{mutante}} - \Delta X_{\text{wt}}$ (donde $X = G, H$ o $-T\Delta S$). Valores de $\Delta\Delta X_{\text{Ligando}}$ mayores a 0 indican un efecto desfavorable por parte de la mutación mientras que valores menores a 0 indican un efecto favorable. De este modo, las mutantes de los residuos más importantes para la afinidad tendrán los valores de $\Delta\Delta G_{\text{mut-wt}}$ más altos ($\gg 0$). Mientras tanto, las mutantes donde se removieron residuos implicados en la selectividad son aquellas donde el valor de $\Delta\Delta G_{\text{mut-wt}}$ para la unión de arginina es mayor que el valor para la unión de histidina, reduciendo, así, el $\Delta\Delta G_{\text{arg-his}}$ de 4.7 kcal mol⁻¹ observado en la proteína silvestre.

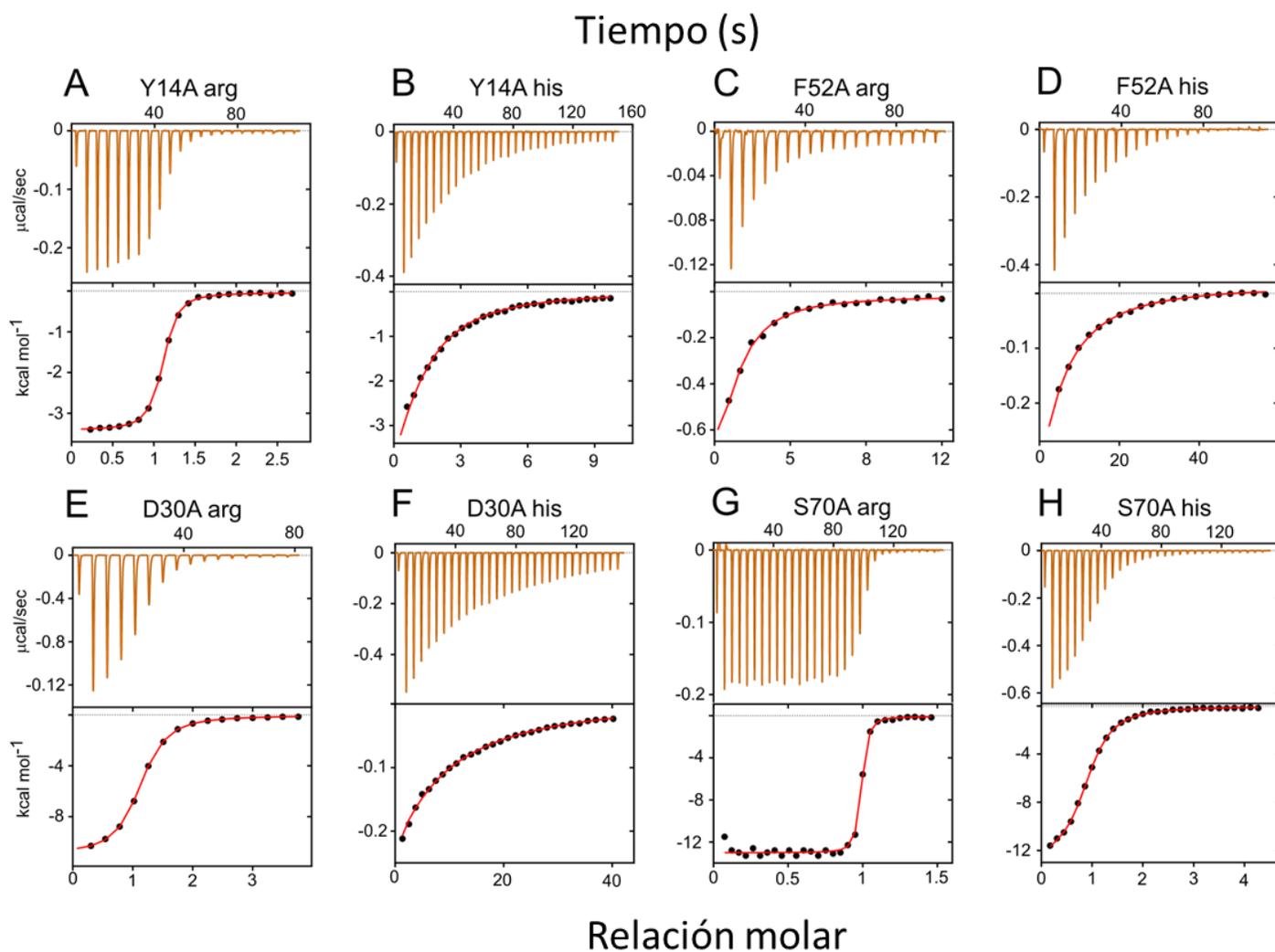


Figura 7. Los resultados calorimétricos para las mutantes Y14A, F52A, D30A y S70A muestran cambios en la afinidad para la unión de arginina e histidina. A) Experimentos representativos para la unión de arginina e histidina a 25°C por parte de las mutantes Y14A (paneles A y B), F52A (paneles C y D), D30A (paneles E y F) y S70A (paneles G y H). Los datos crudos se muestran en los paneles superiores de cada inciso mientras que las curvas de titulación (círculos negros) ajustadas a un modelo de unión 1:1 (líneas rojas) se muestran en los paneles inferiores.

Termodinámica de unión y estructura cristalográfica de las mutantes pertenecientes al “grupo de unión a cadena principal” (D161A, S72A y R77A)

En LAO wt, los residuos S72 y D161 realizan una y dos interacciones, respectivamente, con el grupo amino del ligando, mientras que R77 forma dos interacciones con el grupo carboxilo. Como se puede observar en la figura 3, estos tres residuos adquieren conformaciones idénticas en presencia de ambos ligandos, por lo cual se espera que la remoción de tales interacciones tengan el mismo efecto en la unión de arginina e histidina.

La mutante S72A afectó de manera similar a la unión de ambos ligandos ($\Delta\Delta G_{\text{arg}} = 2.1 \text{ kcal mol}^{-1} \approx \Delta\Delta G_{\text{his}} = 2.6 \text{ kcal mol}^{-1}$), tal y como fue predicho (comparar las barras verdes entre S72A arg y S72A his en la figura 8A). Como podemos observar en la tabla 4, la diferencia en la afinidad para la unión de arginina e histidina no disminuyó, por el contrario, el valor de $\Delta\Delta G_{\text{arg-his}}$ mostró un ligero incremento de $0.5 \text{ kcal mol}^{-1}$. En ambos casos, el valor de ΔH se modificó desfavorablemente por la mutación (barras azules en la figura 8A) mientras que el $-T\Delta S$ resultó favorecido (barras naranjas en la figura 8A).

Por el contrario, la mutante D161A tuvo un impacto distinto en el ΔG de unión para arginina e histidina ($\Delta\Delta G_{\text{arg}} = 6.4 \text{ kcal mol}^{-1} > \Delta\Delta G_{\text{his}} = 4.9 \text{ kcal mol}^{-1}$), provocando una reducción en el valor de $\Delta\Delta G_{\text{arg-his}}$ de $4.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ a $3.2 \text{ kcal mol}^{-1}$. El valor de ΔH se afectó de manera similar en ambos casos ($\Delta\Delta H_{\text{arg}} = 6.6 \text{ kcal mol}^{-1} \approx \Delta\Delta H_{\text{his}} = 6.5 \text{ kcal mol}^{-1}$), no obstante, el valor de $-T\Delta S$ no se modificó en la unión de arginina y fue favorecido en la unión de histidina ($\Delta(-T\Delta S_{\text{arg}}) = 0.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ y $\Delta(-T\Delta S_{\text{his}}) = -1.5 \text{ kcal mol}^{-1}$). Por lo tanto, la reducción en el valor de $\Delta\Delta G_{\text{arg-his}}$ es de origen entrópico.

De manera semejante a D161A, la mutación R77A tiene un efecto muy desfavorable en los valores de ΔG , siendo mayor para la unión de arginina que para histidina ($\Delta\Delta G_{\text{arg}} = 5.5 \text{ kcal mol}^{-1} > \Delta\Delta G_{\text{his}} = 4.3 \text{ kcal mol}^{-1}$). De este modo, el valor de $\Delta\Delta G_{\text{arg-his}}$ se redujo de $4.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ a $3.5 \text{ kcal mol}^{-1}$. Cabe resaltar que la pérdida en la afinidad por parte de esta mutante en la unión ambos ligandos es el resultado de un

impacto desfavorable tanto en ΔH como en $-T\Delta S$ (figura 8A), en lugar de ser exclusivamente entálpico como en D161A y S72A.

Como podemos observar, las mutantes D161A y R77A muestran valores de $\Delta\Delta G_{\text{arg}}$ y $\Delta\Delta G_{\text{his}}$ mayores a $4.0 \text{ kcal mol}^{-1}$, lo cual representa una disminución en la afinidad de al menos tres órdenes de magnitud. Estos resultados indican que los residuos D161 y R77 son determinantes de la unión de ambos ligandos. No obstante, contrario a lo esperado, los datos termodinámicos muestra que estos residuos también contribuyen a la selectividad.

Tabla 4. Datos termodinámicos obtenidos a 25 °C para la unión de arginina e histidina por parte de las mutantes del grupo de unión a cadena principal.

Grupo	Mutante	K_d (nM)	ΔG (kcal mol ⁻¹)	ΔH^a (kcal mol ⁻¹)	$-T\Delta S$ (kcal mol ⁻¹)	n sitios de unión	Valor c
LAO silvestre ^b	LAO arg	1.0 ± 0.2	-12.3 ± 0.1	-11.3 ± 0.1	-1.0 ± 0.2	0.99 ± 0.01	
	LAO his	$2.7 \pm 0.1 \times 10^3$	-7.6 ± 0.1	-8.2 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.99 ± 0.01	
	$\Delta\Delta G_{\text{arg-his}}$		4.7				
Grupo de unión a cadena principal ^c	S72A arg	29 ± 4	-10.2 ± 0.3	-8.0 ± 0.4	-2.2 ± 0.4	1.08 ± 0.05	1.7×10^3
	S72A his	$0.2 \pm 0.05 \times 10^6$	-5.0 ± 0.2	-4.1 ± 0.8	-0.9 ± 0.9	1.05 ± 0.03	1
	$\Delta\Delta G_{\text{arg-his}}$		5.2				
	D161A arg	$4.2 \pm 2 \times 10^4$	-5.9 ± 0.2	-4.7 ± 0.9	-1.2 ± 0.7	0.95 ± 0.1	5
	D161A his ^d	$8.9 \pm 6 \times 10^6$	-2.7 ± 0.5	-1.7 ± 1.2	-1.0 ± 1.2	1.0	0.02
	$\Delta\Delta G_{\text{arg-his}}$		3.2				
	R77A arg	$9.0 \pm 2 \times 10^3$	-6.8 ± 0.2	-8.4 ± 0.8	1.6 ± 0.8	1.1 ± 0.2	5
R77A his ^d	$3.7 \pm 0.3 \times 10^6$	-3.3 ± 0.1	-6.5 ± 0.1	3.2 ± 0.5	1.0	0.04	
$\Delta\Delta G_{\text{arg-his}}$		3.5					

^a Los valores experimentales de ΔH se corrigieron para la unión de histidina debido al efecto termodinámico de la protonación del ligando. Para ello se restaron $2.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ a los valores obtenidos directamente de los datos de ITC, tal y como se indica en [20].

^b Datos tomados de [20].

^c Los valores presentados son el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes cuando $c > 1$ y cuatro experimentos independientes cuando $c \leq 1$. Para las titulaciones donde $c < 1$ el valor de n fue fijado a 1.0 en el ajuste.

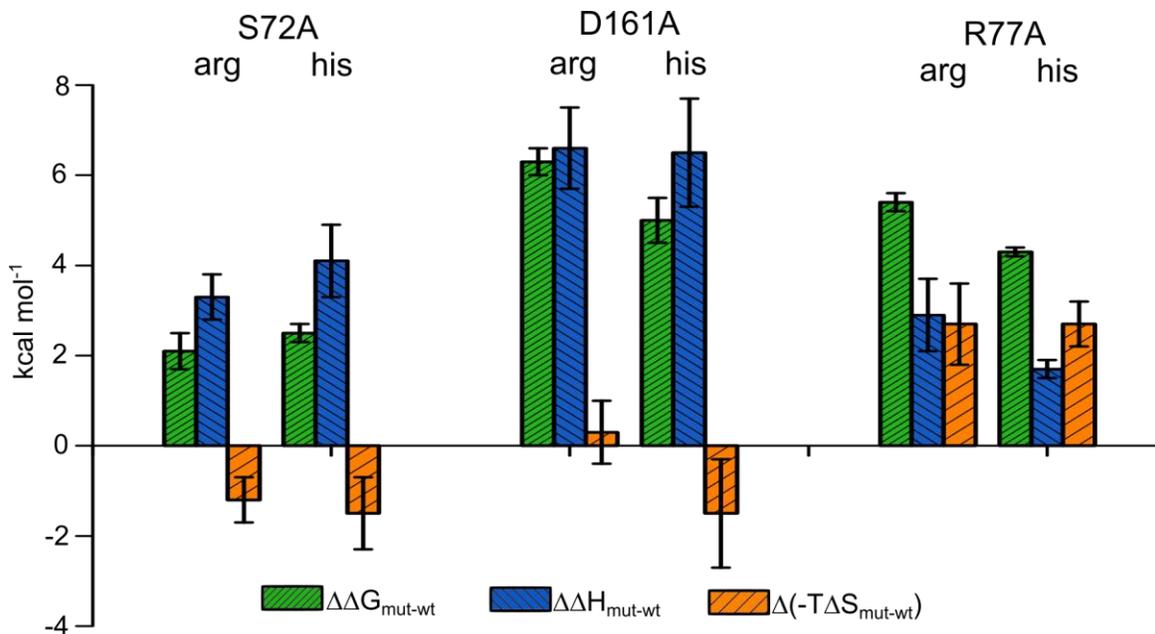


Figura 8. Los residuos D161 y R77 contribuyen de manera importante a la afinidad y participan en la selectividad. Los efectos termodinámicos de las mutantes S72A, D161A y R77A son expresados en referencia a los valores reportados para la proteína silvestre tal y como se describe a continuación: $\Delta\Delta G_{mut-wt}$ (barras verdes) = $\Delta G_{mutante} - \Delta G_{wild\ type}$, $\Delta\Delta H_{mut-wt}$ (barras azules) = $\Delta H_{mutante} - \Delta H_{wild\ type}$ y $\Delta(-T\Delta S_{mut-wt})$ (barras naranjas) = $(-T\Delta S_{mutante}) - (-T\Delta S_{wild\ type})$.

Con el propósito de obtener una explicación de los efectos termodinámicos en términos estructurales se utilizó cristalografía de rayos X para obtener las coordenadas de las mutantes en presencia y ausencia de ligandos. Para este grupo logramos resolver las estructuras de S72A y R77A en presencia de arginina, así como R77A vacía y en presencia de histidina. Todas ellas fueron resueltas a una resolución mayor a los 2.3 Å (mayor a 2.0 Å para aquellas con ligando) (tabla 5) lo cual permite comparar adecuadamente las características del sitio de unión de las mutantes con la proteína wt. La integridad de los datos colectados fue superior al 99% para la capa de baja resolución y mayor al 94% para la capa de alta resolución, con una multiplicidad de 4 a 11 y 3 a 6, respectivamente. Los valores del factor-b general son adecuados para las resoluciones obtenidas, mientras que las diferencias entre el R_{work} y el R_{free} se encuentran por debajo de 6%. Por otra parte, la densidad electrónica es continua a lo largo de la estructura primaria de la proteína

y se encuentra bien definida en el sitio de, además, ninguno de los modelos presenta ángulos ϕ y ψ fuera de las regiones permitidas del gráfico de Ramachandran. Cabe señalar que todas las estructuras reportadas en esta tesis se obtuvieron a partir de cristales crecidos en las mismas condiciones (Materiales y Métodos, página 17).

El sitio de unión de S72A-arg es prácticamente idéntico al sitio de unión de LAO wt-arg, las únicas diferencias claras son la mutación y la presencia de un pequeño cambio conformacional en la cadena lateral de D11 (figura 9), del cual se hablará más adelante. Ya que la principal diferencia entre las estructuras S72A y LAO wt es la mutación, podemos concluir que el efecto desfavorable de 2.1 kcal mol⁻¹ en la afinidad de unión a arginina observada en los resultados termodinámicos es consecuencia directa de la remoción de la interacción entre el OH de S72 y el grupo amino del ligando.

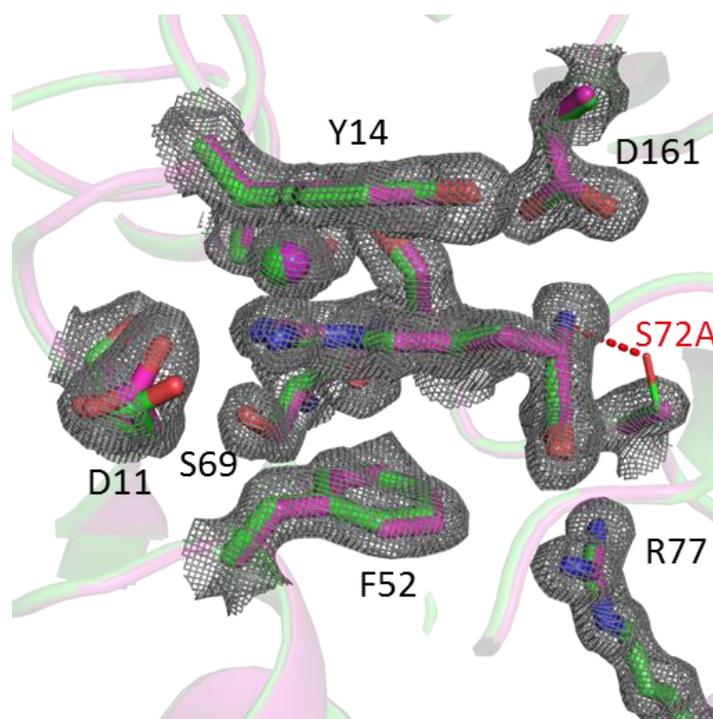


Figura 9. El sitio de unión de la mutante S72A en complejo con arginina es similar al de LAO wt . Alineamiento estructural del sitio de unión de LAO wt-arg (verde) con S72A-arg (magenta, panel A). La cadena lateral eliminada se muestra como un “stick” más delgado al resto y está marcada con una etiqueta roja. Las moléculas de solvente se encuentran representadas como esferas. En color gris se muestra el mapa de densidad electrónica de omisión (2mFo-dFc) contorneado a 1σ .

De manera similar, el sitio de unión de R77A en presencia de arginina e histidina no presenta cambios estructurales drásticos en comparación con la proteína silvestre. No obstante, en ambos casos se observan tres moléculas de agua ocupando el sitio de la mutación, dos de ellas interactuando con el ligando. Además, R77A-his muestra una molécula de agua extra interactuando con la cadena lateral de la histidina (figura 10).

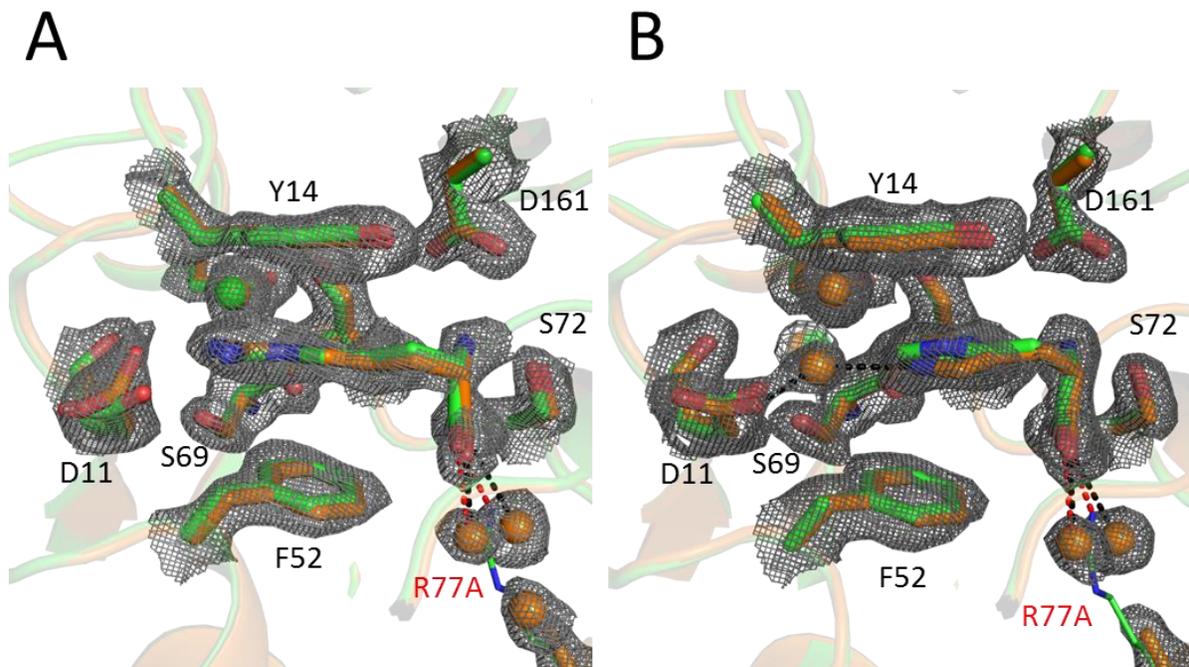


Figura 10. Las interacciones removidas en R77A son remplazados por contactos con el solvente. Alineamiento estructural del sitio de unión de LAO wt-arg (verde, panel A) con R77A-arg (naranja, panel A) y LAO wt-arg (verde, panel B) R77A-his (amarillo, panel B). La cadena lateral eliminada se muestra como un “stick” más delgado al resto y está marcada con una etiqueta roja. Las moléculas de solvente se encuentran representadas como esferas. En color gris se muestra el mapa de densidad electrónica de omisión ($2mF_o-dF_c$) contorneado a 1σ .

Tabla 5. Colección de datos y estadísticas de afinamiento para la mutantes pertenecientes al grupo de unión a cadena principal

Colecta de datos ^a				
Mutante	S72A arg	R77A vacía	R77A arg	R77A his
PDB ID	6MLN	6MKX	6MLG	6MLI
Resolución (Å)	50.00 - 1.72 (1.75-1.72)	50.00 - 2.28 (2.33-2.28)	50.00 - 1.91 (1.94-1.91)	50.00 - 1.88 (1.91-1.88)
Grupo espacial	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)
Dimensiones de la celda unitaria				
a, b, c, (Å)	36.80, 59.05, 115.37	35.00, 76.75, 86.17	37.21, 57.66, 101.26	37.20, 58.85, 115.28
Mosaicismo	0.59 -0.96	1.04-1.65	0.96-1.88	0.93-1.56
Reflexiones totales	260163 (15270)	78380 (3299)	85914 (4746)	136579 (7642)
Reflexiones únicas	27506 (2679)	10948 (1040)	17747 (1582)	21134 (2011)
Multiplicidad	9.5 (5.7)	7.2 (3.2)	4.8 (3.0)	6.5 (3.8)
Integridad (%)	100.0 (99.8)	99.6 (96.6)	98.9 (97.1)	99.4 (94.9)
I / sigma (I)	44.1 (6.0)	24.8 (3.9)	19.9 (2.0)	26.9 (2.3)
R-merge	0.065 (0.385)	0.109 (0.395)	0.140 (0.658)	0.106 (0.630)
CC1/2	0.997 (0.910)	0.995 (0.838)	0.992 (0.572)	0.996 (0.667)
Estadísticas de afinamiento				
R _{work} , R _{free}	0.144, 0.175 (0.193, 0.242)	0.191, 0.251 (0.0.268, 0.349)	0.159, 0.212 (0.273, 0.357)	0.164, 0.213 (0.323, 0.344)
Factor B promedio (Å ²)	17.9	24.6	21.0	23.0
Proteína	15.2	24.4	19.9	21.3
Ligando	42.1		39.4	47.2
Solvente	32.4	26.9	29.6	33.8
Factor B de Wilson (Å ²)	13.5	24.9	20.7	21.4
Numero de átomos	2081	1932	2015	2075
Proteína	1774	1812	1799	1831
Ligando	38		13	30
Moléculas de agua	266	120	203	214
Residuos de la Proteína	235	238	238	238
RMS (enlaces) (Å)	0.006	0.010	0.007	0.007
RMS (ángulos) (°)	1.000	1.060	0.940	0.980
^b En zona favorecida (%)	97.00	96.19	97.00	98.00
^b En zona permitida (%)	3.00	3.81	3.00	2.00
^b En zona no permitida (%)	0.00	0.00	0.00	0.00
Choques	1.13	3.92	0.85	1.64

^a En paréntesis se muestran los datos para la capa de alta resolución.

^a En gráfico de Ramachandran

Al comparar las estructuras cristalográficas de estas dos mutantes se puede observar observar que las principales diferencias recaen en el número de moléculas de agua presentes en el sitio de unión. Aun cuando es necesario otro tipo de estudios, es probable que las diferencias observada en los efectos entálpicos y entrópicos de R77A con respecto a D161A y S72A estén relacionadas con la incorporación del solvente.

Termodinámica de unión y estructura cristalográfica de las mutantes pertenecientes al “grupo de unión a motivo guanidino” (D11A y S69A)

Como se mencionó anteriormente, las cadenas laterales de los residuos D11 y S69 interactúan directamente con el grupo guanidino del ligando arginina y no con el grupo imidazol del ligando histidina (figura 3). Tal discrepancia es la única diferencia estructural clara entre los sitios de unión de LAO wt-arg y LAO wt-his. Por ello, se propuso a D11 y S69 como los residuos responsables de la diferencia de 4.7 kcal mol⁻¹ en la afinidad de LAO por arginina e histidina. Con base a esta hipótesis se espera que las mutantes de alanina de tales residuos tengan un impacto importante en la afinidad por arginina y un efecto pequeño en la afinidad por histidina.

La mutante D11A tuvo un efecto desfavorable en el ΔG de unión de ambos ligandos, no obstante, tal efecto fue mayor para la unión de arginina ($\Delta\Delta G_{\text{arg}} = 2.6 \text{ kcal mol}^{-1} > \Delta\Delta G_{\text{his}} = 1.2 \text{ kcal mol}^{-1}$), tal y como se esperaba. De este modo, el valor de $\Delta\Delta G_{\text{arg-his}}$ se redujo de 4.7 kcal mol⁻¹ a 3.3 kcal mol⁻¹ (tabla 6). De manera interesante, la mutación favoreció al ΔH en la unión de ambos ligandos, mientras que el valor de $-T\Delta S$ fue desfavorecido (figura 11). Estos resultados confirman la participación del residuo D11 en la selectividad de la proteína. En contraste, los valores de ΔG para la unión arginina e histidina no fueron modificados por la mutante S69A indicando que S69 no contribuye a la afinidad de ninguno de los ligandos utilizados, y por lo tanto a la selectividad (figura 11).

Tabla 6. Datos termodinámicos obtenidos a 25 °C para la unión de arginina e histidina por parte de las mutantes del grupo de unión a motivo guanidino.

Grupo	Mutante	K_d (nM)	ΔG (kcal mol ⁻¹)	ΔH^a (kcal mol ⁻¹)	$-T\Delta S$ (kcal mol ⁻¹)	n sitios de unión	Valor c
LAO silvestre ^b	LAO arg	1.0 ± 0.2	-12.3 ± 0.1	-11.3 ± 0.1	-1.0 ± 0.2	0.99 ± 0.01	
	LAO his	2.7 ± 0.1 × 10 ³	-7.6 ± 0.1	-8.2 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.99 ± 0.01	
	$\Delta\Delta G_{arg-his}$		4.7				
Grupo de unión a grupo guanidino ^c	D11A arg	70 ± 30	-9.7 ± 0.3	-13.7 ± 0.4	4.0 ± 0.4	1.1 ± 0.05	580
	D11A his	1.7 ± 0.8 × 10 ⁴	-6.4 ± 0.3	-12.1 ± 1.2	5.5 ± 1.0	1.2 ± 0.2	3
	$\Delta\Delta G_{arg-his}$		3.3				
	S69A arg	1.0 ± 0.5	-12.3 ± 0.4	-13.0 ± 0.8	0.7 ± 0.5	1.06 ± 0.04	2.2 × 10 ⁵
	S69A his	2.1 ± 0.1 × 10 ³	-7.8 ± 0.1	-8.9 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1 ± 0.09	35
$\Delta\Delta G_{arg-his}$		4.6					

^a Los valores experimentales de ΔH se corrigieron para la unión de histidina debido al efecto termodinámico de la protonación del ligando. Para ello se restaron 2.1 kcal mol⁻¹ a los valores obtenidos directamente de los datos de ITC, tal y como se indica en [20].

^b Datos tomados de [20].

^c Los valores presentados son el promedio ± desviación estándar de tres experimentos independientes cuando $c > 1$ y cuatro experimentos independientes cuando $c \leq 1$. Para las titulaciones donde $c < 1$ el valor de n fue fijado a 1.0 en el ajuste.

^d For these systems $c < 1$, therefore ΔH and ΔS data must be taken with caution.

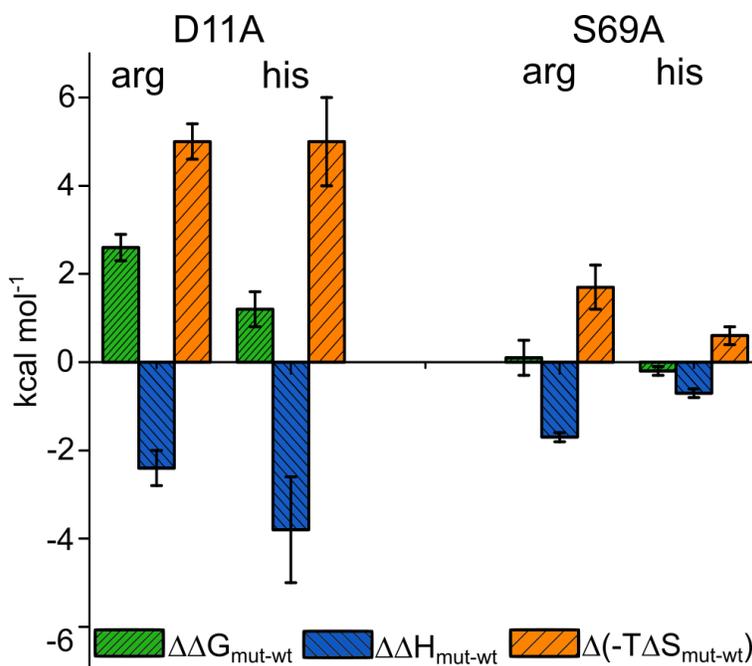


Figura 11. La contribución del residuo D11 está guiada por entropía mientras que S69 no contribuye a la afinidad. Los efectos termodinámicos de las mutantes D11A y S69A son expresados en referencia a los valores reportados para la proteína silvestre tal y como se describe en la figura 8.

Para tratar de dilucidar la razón por la cual la mutación del residuo D11 tienen un efecto entálpico favorable se determinaron las estructuras cristalográficas de D11A en presencia de arginina e histidina (1.7 Å y 2.3 Å de resolución, respectivamente). La integridad de los datos colectados fue superior al 97% para la capa de baja resolución y mayor al 93% para la capa de alta resolución, con una multiplicidad de 4 a 7 y 3 a 4, respectivamente (tabla 7). Los valores del factor-b general son adecuados para las resoluciones obtenidas, mientras que las diferencias entre el R_{work} y el R_{free} se encuentran por debajo de 6%. Por otra parte, la densidad electrónica es continua a lo largo de la estructura primaria de la proteína y se encuentra bien definida en el sitio de unión. Ninguno de los modelos presenta ángulos ϕ y ψ fuera de las regiones permitidas del gráfico de Ramachandran.

De manera sorprendente, la estructura de D11A es prácticamente idéntica a LAO wt-arg (RMSD = 0.14 Å), la única diferencia clara es un ligero desplazamiento (0.6 Å) de la cadena lateral del residuo T13 en conjunto con una molécula de agua denominada Wat13 (figura 12 A). En consecuencia, la distancia entre Wat13 y la cadena lateral de la arginina se reduce de 3.5 Å a 3.0 Å, lo cual podría contribuir al efecto entálpico desfavorable observado. Adicionalmente, el valor del factor b de Wat 13 disminuye de 20 Å² en LAO wt a 1.0 Å² en D11, lo cual correlaciona con la pérdida de entropía. El alineamiento de la estructura de LAO wt-arg resuelta previamente (1LAF) con la estructura que se resolvió en este trabajo (6MLE) muestra un ligero movimiento en la cadena lateral de D11 (figura 5 B), similar a lo observado en las estructuras D161A-arg, S72-arg y R77-arg. Esto nos indica que D11 puede adquirir distintas conformaciones al interactuar con el ligando sin impactar significativamente al ΔG de unión . De hecho, la cadena lateral de este residuo muestra el factor b más alto en el sitio de unión (24 Å²) sugiriendo que D11 presenta una vibración mayor al resto de los residuos.

De manera similar, la estructura de D11A en presencia de histidina muestra un ligero desplazamiento en la cadena lateral de T13 en conjunto con Wat13. Adicionalmente se observa la incorporación de una molécula de agua al sitio de unión la cual interactúa con el ligando y Wat13 (figura 12 B).

Tabla 7. Colección de datos y estadísticas de afinamiento para la mutantes pertenecientes al “grupo de unión a grupo guanidino”.

Colecta de datos^a			
Mutante	D11A arg	D11A his	S69A vacía
PDB ID	6MKU	6MKW	6ML0
Resolución (Å)	50.00-1.73 (1.76-1.73)	50.00-2.32 (2.36-2.32)	50.00-1.68 (1.71-1.68)
Grupo espacial	P 21 21 21 (19)	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)
Dimensiones de la celda unitaria			
a, b, c, (Å)	37.16, 58.61, 115.28	36.81, 58.88, 115.16	35.51, 77.50, 102.89
Mosaicismo	0.94-1.45	1.27 - 4.76	0.84-1.81
Reflexiones totales	117866 (3482)	70586 (3482)	191095 (8999)
Reflexiones únicas	27021 (1055)	11203 (1055)	33775 (3103)
Multiplicidad	4.4 (3.2)	6.3 (3.3)	5.4 (2.9)
Integridad (%)	99.2 (96.0)	97.9 (93.1)	99.3 (95.8)
I / sigma (I)	18.1 (2.3)	22.1 (4.3)	47.6 (4.0)
R-merge	0.120 (0.587)	0.098 (0.327)	0.074 (0.317)
CC1/2	0.990 (0.592)	0.993 (0.865)	0.998 (0.834)
Estadísticas de afinamiento			
R _{work} , R _{free}	0.194, 0.236 (0.291, 0.287)	0.173, 0.229 (0.206, 0.248)	0.191, 0.244 (0.233, 0.293)
Factor B promedio (Å ²)	14.2	22.1 (4.3)	21.1
Proteína	12.8	21.9	18.4
Ligando	25.3	25.9	30.2
Solvente	22.8	24.8	29.6
Factor B de Wilson (Å ²)	12.5	19.2	19.0
Numero de átomos	2090	1966	2445
Proteína	1808	1835	1855
Ligando	10	12	10
Moléculas de agua	270	119	580
Residuos de la Proteína	238	237	238
RMS (enlaces) (Å)	0.006	0.010	0.006
RMS (ángulos) (°)	0.960	1.080	0.960
En zonas favorecidas del Ramachandran, (%)	96.00	95.74	96.50
En zonas permitidas del Ramachandran (%)	4.00	4.26	3.50
Fuera de las zonas permitidas del Ramachandran (%)	0.00	0.00	0.00
Choques	0.56	3.57	2.16

^a En paréntesis se muestran los datos para la capa de alta resolución.

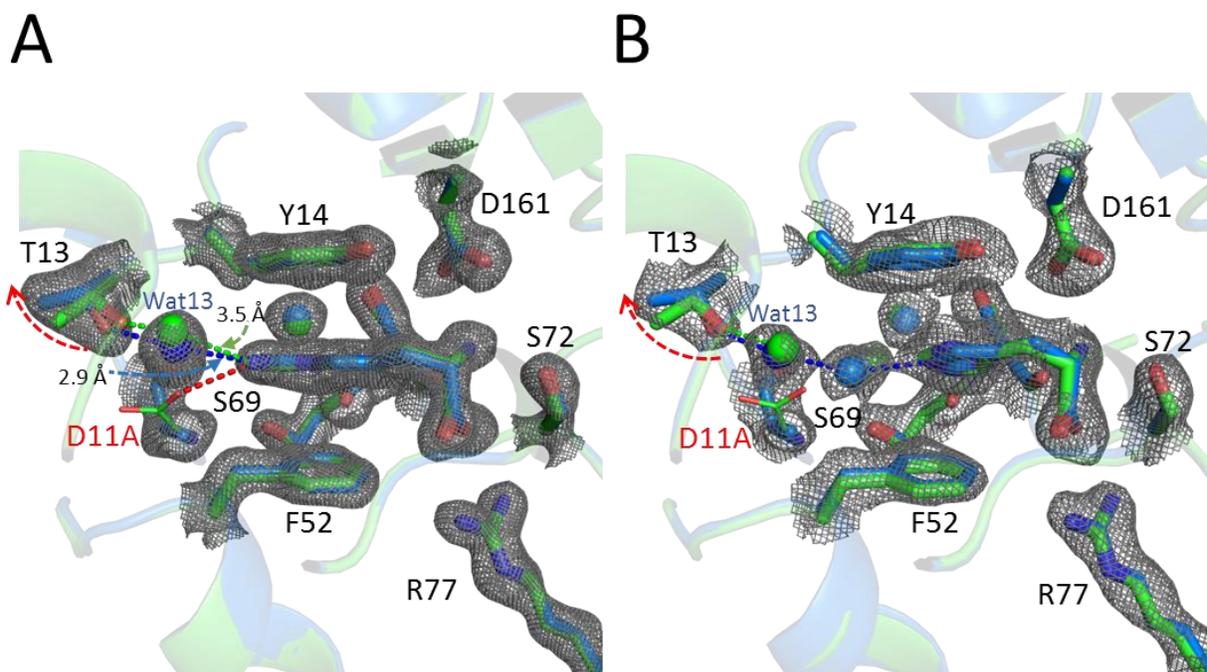


Figura 12. El sitio de unión de D11A presenta pequeñas diferencias estructurales relacionadas con el solvente. Alineamiento estructural del sitio de unión de LAO wt-arg (verde, panel A) con D11A-arg (azul, panel A) y LAO wt-his (verde, panel B) con D11A-his (azul, panel B). La cadena lateral eliminada se muestra como un “stick” más delgado al resto y está marcada con una etiqueta roja. Las moléculas de solvente se encuentran representadas como esferas. En color gris se muestra el mapa de densidad electrónica de omisión ($2mFo-dFc$) contorneado a 1σ .

Termodinámica de unión y estructura cristalográfica de las mutantes pertenecientes al “grupo de unión a motivo guanidino” (Y14A y F52A)

Los residuos aromáticos Y14A y F52A realizan interacciones catión-pi con la cadena lateral de ambos ligandos (figura 3). La mutante Y14A tuvo un impacto desfavorable de $4.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ en el ΔG de unión a arginina (tabla 8), tal efecto es el resultado de un cambio entálpico altamente desfavorable ($\Delta\Delta H_{\text{arg}} = 8.1 \text{ kcal mol}^{-1}$) y un cambio entrópico muy favorable ($\Delta(-T\Delta S_{\text{arg}}) = -4.1 \text{ kcal mol}^{-1}$); (figura 13). Por otra parte, el ΔG de unión a histidina fue afectado por $2.5 \text{ kcal mol}^{-1}$, causado completamente por un efecto entálpico desfavorable ($\Delta\Delta H_{\text{arg}} = 2.5 \text{ kcal mol}^{-1}$); (figura 13). Como podemos observar, el efecto de Y14A en el ΔG es mayor para la unión de arginina, lo cual indica que Y14 contribuye a la selectividad, reduciendo el valor de $\Delta\Delta G_{\text{arg-his}}$ a $3.2 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Tabla 8. Datos termodinámicos obtenidos a 25 °C para la unión de arginina e histidina por parte de las mutantes del grupo de unión a cadena lateral.

Grupo	Mutante	K_d (nM)	ΔG (kcal mol ⁻¹)	ΔH^a (kcal mol ⁻¹)	$-T\Delta S$ (kcal mol ⁻¹)	n sitios de unión	Valor c
LAO silvestre ^b	LAO arg	1.0 ± 0.2	-12.3 ± 0.1	-11.3 ± 0.1	-1.0 ± 0.2	0.99 ± 0.01	
	LAO his	2.7 ± 0.1 × 10 ³	-7.6 ± 0.1	-8.2 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.99 ± 0.01	
	$\Delta\Delta G_{arg-his}$		4.7				
Grupo de unión a cadena lateral ^c	Y14A arg	0.8 ± 0.1 × 10 ³	-8.3 ± 0.1	-3.2 ± 0.2	-5.1 ± 0.3	1.1 ± 0.1	163
	Y14A his	0.2 ± 0.02 × 10 ⁶	-5.1 ± 0.1	-5.7 ± 0.6	0.6 ± 0.7	1 ± 0.1	1
	$\Delta\Delta G_{arg-his}$		3.2	2.6	5.8		
	F52A arg	0.1 ± 0.03 × 10 ⁶	-5.4 ± 0.2	-1.7 ± 0.8	-3.7 ± 0.9	1.03 ± 0.15	1
	F52A his ^d	3 ± 0.6 × 10 ⁶	-3.4 ± 0.1	-2.8 ± 0.6	-0.6 ± 0.6	1.0	0.06
	$\Delta\Delta G_{arg-his}$		2.0				

^a Los valores experimentales de ΔH se corrigieron para la unión de histidina debido al efecto termodinámico de la protonación del ligando. Para ello se restaron 2.1 kcal mol⁻¹ a los valores obtenidos directamente de los datos de ITC, tal y como se indica en [20].

^b Datos tomados de [20].

^c Los valores presentados son el promedio ± desviación estándar de tres experimentos independientes cuando $c > 1$ y cuatro experimentos independientes cuando $c \leq 1$. Para las titulaciones donde $c < 1$ el valor de n fue fijado a 1.0 en el ajuste.

^d For these systems $c < 1$, therefore ΔH and ΔS data must be taken with caution.

La mutante F52A mostró un valor de $\Delta\Delta G_{arg} = 6.9$ kcal mol⁻¹, lo cual representa un aumento en la K_d de 5 órdenes de magnitud (tabla 9); cabe señalar que este es el mayor impacto en la afinidad observado para las mutantes estudiadas en este trabajo. De manera similar, F52A tuvo un impacto de 4.0 kcal mol⁻¹, en el $\Delta\Delta G_{his}$ lo cual representa un aumento en la K_d de aproximadamente 3 órdenes de magnitud, tal efecto es superado solamente por D161A y R77A. El impacto mostrado sobre el valor de ΔG para la unión de ambos ligandos es consecuencia de un cambio altamente desfavorable en el valor de ΔH en conjunto con un cambio favorable en el valor de $-T\Delta S$ (figura 13). Estos resultados indican que F52 es de suma importancia para la unión de arginina e histidina, contribuyendo entálpicamente a la afinidad. No obstante, el efecto causado por la remoción de la cadena lateral de F52 es considerablemente mayor para la unión de arginina ($\Delta\Delta G_{arg-his} = 3.1$ kcal mol⁻¹), disminuyendo la diferencia de afinidad entre ambos ligandos a tan solo un orden de magnitud. De este modo, podemos afirmar que ambos residuos aromáticos contribuyen a la selectividad.

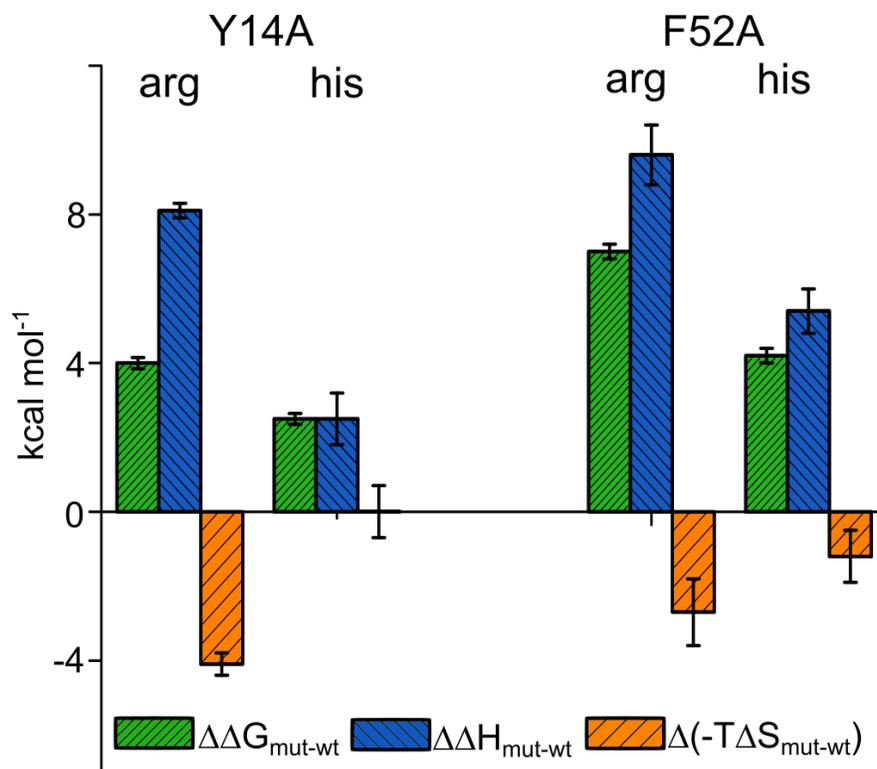


Figura 13. F52 es el residuo más importante para la afinidad y selectividad de LAO. Los efectos termodinámicos de las mutantes Y14A y F52A son expresados en referencia a los valores reportados para la proteína silvestre tal y como se describe en la figura 8.

Las estructuras cristalográficas de Y14A en presencia de arginina, histidina, y en ausencia de ligando se resolvieron a 1.7 Å, 1.5 Å y 2.1 Å de resolución, respectivamente. La integridad de los datos colectados fue superior al 98% para ambas capas de resolución, con una multiplicidad por arriba de 4 (a excepción de la capa de alta resolución en Y14A sin ligando); (tabla 9). Los valores del factor-B general son adecuados para las resoluciones obtenidas, mientras que las diferencias entre el R_{work} y el R_{free} se encuentran por debajo de 5%. Por otra parte, la densidad electrónica es continua a lo largo de la estructura primaria de la proteína y se encuentra bien definida en el sitio de unión. Todos los ángulos ϕ y ψ para los tres modelos se encuentran dentro de las áreas permitidas en el gráfico de Ramachandran.

Como se puede observar en la figura 14, la mutación Y14A no modificó la posición de los grupos amino y carboxilo de ningún ligando, sin embargo, la cadena lateral de ambas moléculas sufrió un ligero desplazamiento hacia la zona de la mutación, acompañado de un cambio en la conformación de la cadena lateral del residuo D11. Esta reubicación en D11 es similar, aunque de mayor magnitud, a la observada en D161A, S72A y R77A. En ambas estructuras, el espacio que dejó la remoción de Y14 es ocupado por moléculas de agua (tres en Y14A-his y cuatro en Y14A-arg), creando un canal que cruza el sitio de unión y deja al ligando expuesto al solvente (figura 15 A).

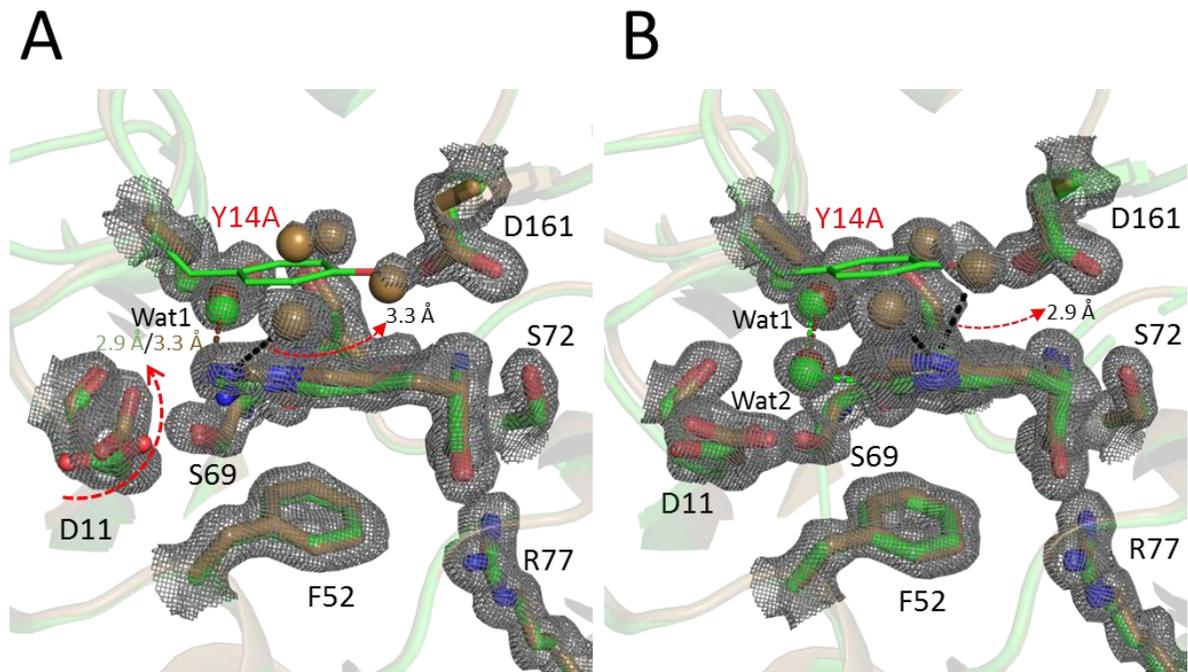


Figura 14. La mutación del residuo Y14 propicia la entrada de varias moléculas de agua al sitio de unión. Alineamiento estructural del sitio de unión de LAO wt-arg (verde, panel A) con Y14A-arg (café, panel A) y LAO wt-his (verde, panel B) con Y14A-his (café, panel B). La cadena lateral eliminada se muestra como un “stick” más delgado al resto y está marcada con una etiqueta roja. Las moléculas de solvente se encuentran representadas como esferas. En color gris se muestra el mapa de densidad electrónica de omisión ($2mF_o-dF_c$) contorneado a 1σ .

Tabla 9. Colección de datos y estadísticas de afinamiento para la mutantes pertenecientes al “grupo de unión a cadena lateral”

Colecta de datos ^a				
Mutante	Y14A empty	Y14A arg	Y14A his	F52A empty
PDB ID	6MLV	6MLO	6MLP	6MLD
Resolución (Å)	50.00 – 2.08 (2.13-2.08)	50.00 - 1.72 (1.78-1.72)	50.00 - 1.48 (1.51-1.48)	50.00 - 1.66 (1.69-1.66)
Grupo espacial	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)
Dimensiones de la celda unitaria				
a, b, c, (Å)	35.54, 76.80, 98.61	37.17, 58.65, 115.46	36.99, 57.22, 101.03	34.76, 76.23, 85.36
Mosaicismo	1.05 – 2.01	0.83 - 1.27	0.55-0.91	0.94-1.28
Reflexiones totales	87925 (4568)	218332 (14274)	351569 (18827)	293208 (15529)
Reflexiones únicas	16624 (1575)	27578 (3103)	35985 (3362)	27708 (2632)
Multiplicidad	5.3 (2.9)	7.9 (4.6)	9.8 (5.6)	10.6 (5.9)
Integridad (%)	98.3 (85.3)	99.2 (94.3)	99.5 (98.8)	99.9 (99.6)
I / sigma (I)	15.0 (2.5)	29.6 (2.3)	24.7 (2.5)	25.7 (2.1)
R-merge	0.122 (0.498)	0.073 (0.669)	0.109 (0.719)	0.097 (0.784)
CC1/2	0.987 (0.646)	0.996 (0.646)	0.995 (0.673)	0.994 (0.644)
Estadísticas de afinamiento				
R _{work} , R _{free}	0.192 , 0.220 (0.319, 0.428)	0.176 , 0.219 (0.316, 0.371)	0.156 , 0.182 (0.2874, 0.338)	0.161 , 0.211 (0.251, 0.293)
Factor B promedio (Å ²)	21.1	21.7	13.1	15.3
Proteína	20.8	20.4	11.1	13.5
Ligando		34.4	30.5	32.4
Solvente	23.7	29.7	26.1	24.6
Factor B de Wilson (Å ²)	20.1	17.0	9.0	13.5
Numero de átomos	2078	2137	2090	2120
Proteína	1859	1841	1821	1785
Ligando		10	16	16
Moléculas de agua	219	285	245	316
Residuos de la Proteína	238	238	238	238
RMS (enlaces) (Å)	0.010	0.009	0.006	0.006
RMS (ángulos) (°)	1.030	1.080	1.030	0.990
En zonas favorecidas del Ramachandran, (%)	96.61	98.00	98.00	97.00
En zonas permitidas del Ramachandran (%)	3.39	2.00	2.00	3.00
Fuera de las zonas permitidas del Ramachandran (%)	0.00	0.00	0.00	0.00
Choques	2.96	4.62	0.28	1.14

^a En paréntesis se muestran los datos para la capa de alta resolución.

El impacto entálpico altamente desfavorable observado para la unión de arginina puede ser causado en gran medida por la pérdida de la interacción catión-pi entre Y14 y el ligando, sumado a la pérdida del contacto Y14-D161 y al aumento en la distancia entre Wat1 y el grupo guanidino. Las cuatro moléculas de agua que entran al sitio de unión a causa de la mutación parecen no compensar tal efecto debido a que solo una de ellas se encuentra a la distancia apropiada (3.3 Å) para interactuar con el ligando. Por otra parte, el impacto de la mutación en la entalpía de unión a histidina es de menor magnitud, posiblemente debido a que la interacción catión-pi formada con este ligando es más débil a la establecida con arginina. Adicionalmente, dos de las tres moléculas que entran al sitio de unión interactúan de manera cercana (2.9 Å) con la cadena lateral de la histidina. Dichas interacciones solvente-histidina podrían estar compensando el efecto desfavorable de la mutación. Cabe señalar que el ancho del canal formado a causa de la mutación es distinto en Y14A-arg y Y14A-his lo cual podría estar asociado a las diferencias descritas en la organización del solvente.

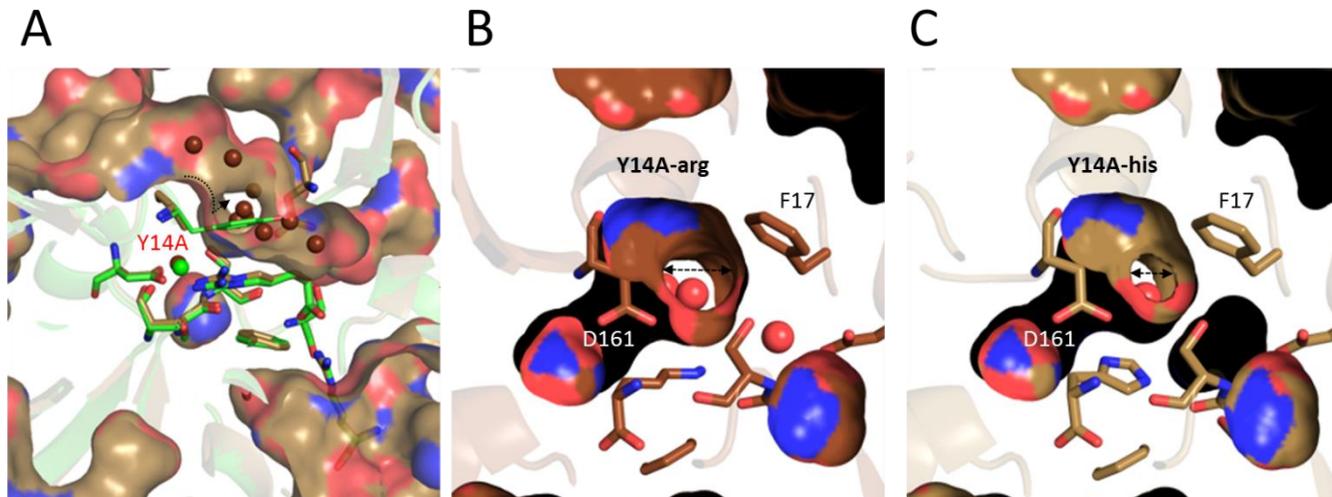


Figura 15. El sitio de unión de Y14A presenta un canal que expone al ligando al solvente. Alineamiento estructural del sitio de unión de LAO wt-arg (verde, panel A) con Y14A-arg (café, panel A) y LAO wt-his (verde, panel B) con Y14A-his (café, panel B). La cadena lateral eliminada se muestra como un “stick” más delgado al resto y está marcada con una etiqueta roja. Las moléculas de solvente son presentadas en representación de esfera.

Termodinámica de unión y estructura cristalográfica de las mutantes pertenecientes al “grupo de unión mediada por agua” (D30A y S70A)

Las cadenas laterales de los residuos D30 y S70 interactúan con la molécula de agua Wat1, la cual, a su vez, interactúa directamente con el grupo guanidino del ligando arginina. Wat1 no interactúa con el grupo imidazol del ligando histidina debido a que se encuentran a más de 5 Å de distancia y entre ellos se encuentra posicionada la molécula Wat2 (figura 3).

La mutación del residuo D30 causó una reducción de 5.1 kcal mol⁻¹ en el valor de ΔG para la unión de arginina, tal efecto es causado principalmente por un efecto entrópico desfavorable (tabla 10, figura 16). De manera similar, el ΔG de unión a histidina se afectó en 4.1 kcal mol⁻¹, en esta ocasión como resultado de un efecto entálpico desfavorable y un efecto entrópico favorable (tabla 10, figura 16). Estos resultados indican que el residuo D30 es de suma importancia para la unión de ambos ligandos a pesar de no interactuar directamente con ellos.

Tabla 10. Datos termodinámicos obtenidos a 25 °C para la unión de arginina e histidina por parte de las mutantes del grupo de unión mediada por agua.

Grupo	Mutante	K_d (nM)	ΔG (kcal mol ⁻¹)	ΔH^a (kcal mol ⁻¹)	$-T\Delta S$ (kcal mol ⁻¹)	n sitios de unión	Valor c
LAO silvestre ^b	LAO arg	1.0 ± 0.2	-12.3 ± 0.1	-11.3 ± 0.1	-1.0 ± 0.2	0.99 ± 0.01	
	LAO his	2.7 ± 0.1 × 10 ³	-7.6 ± 0.1	-8.2 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.99 ± 0.01	
	$\Delta\Delta G_{arg-his}$		4.7				
Grupo de unión mediado por moléculas de agua ^c	D30A arg	5.0 ± 0.3 × 10 ³	-7.2 ± 0.1	-10.9 ± 0.2	3.5 ± 0.2	1.08 ± 0.05	20
	D30A his ^d	3.1 ± 3 × 10 ⁶	-3.3 ± 0.4	-1.7 ± 2.0	-1.6 ± 2.0	1.0	0.1
	$\Delta\Delta G_{arg-his}$		4.1				
	S70A arg	55 ± 20	-9.8 ± 0.5	-11.4 ± 0.7	1.6 ± 0.7	0.98 ± 0.1	1.8 × 10 ³
	S70A his	7.6 ± 0.8 × 10 ³	-7.0 ± 0.1	-9.1 ± 1.0	2.1 ± 1.0	0.87 ± 0.1	14
$\Delta\Delta G_{arg-his}$		2.8					

^a Los valores experimentales de ΔH se corrigieron para la unión de histidina debido al efecto termodinámico de la protonación del ligando. Para ello se restaron 2.1 kcal mol⁻¹ a los valores obtenidos directamente de los datos de ITC, tal y como se indica en [20].

^b Datos tomados de [20].

^c Los valores presentados son el promedio ± desviación estándar de tres experimentos independientes cuando $c > 1$ y cuatro experimentos independientes cuando $c \leq 1$. Para las titulaciones donde $c < 1$ el valor de n fue fijado a 1.0 en el ajuste.

^d For these systems $c < 1$, therefore ΔH and ΔS data must be taken with caution.

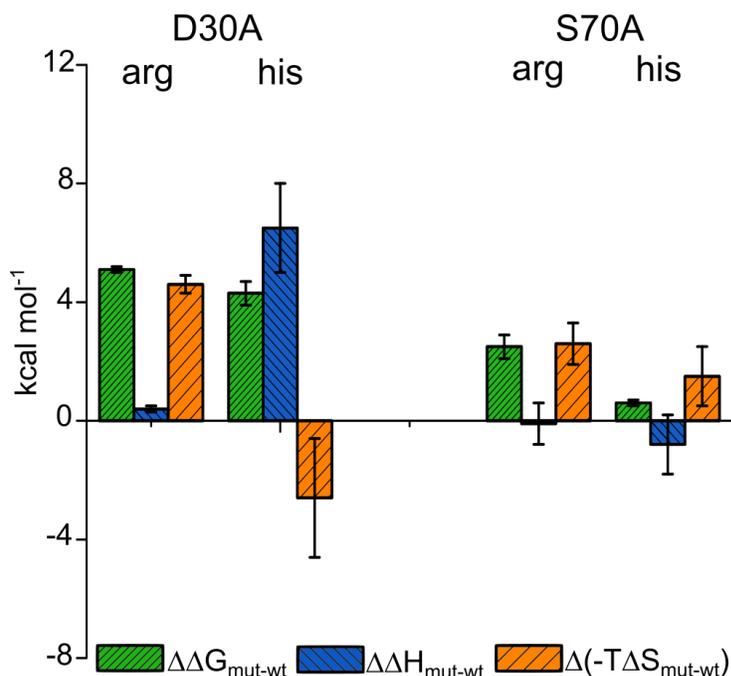


Figura 16. Los residuos D30 y S70 son importantes para la afinidad y selectividad de LAO. Los efectos termodinámicos de las mutantes D30A y S70A son expresados en referencia a los valores reportados para la proteína silvestre tal y como se describe en la figura 8.

Por otra parte, la mutante S70A mostró una disminución de 2.6 kcal mol⁻¹ en el ΔG de unión a arginina como consecuencia de una alteración desfavorable en la entropía, tal y como se observa en D30A (figura 16). En contraste, el valor de ΔG para la unión a histidina no se afectó por la mutación ($\Delta\Delta G_{his} = 2.0$ kcal mol⁻¹) debido a una compensación entalpía-entropía. Como se puede observar, el impacto de la mutación S70A es mayor para arginina que para histidina, reduciendo el valor de $\Delta\Delta G_{arg-his}$ de 4.7 kcal mol⁻¹ a 2.8 kcal mol⁻¹. De este modo podemos afirmar que el residuo S70 contribuye principalmente a la selectividad de la proteína.

Las estructura cristalográfica de D30A en presencia de arginina se resolvió a 1.7 Å de resolución. El porcentaje de datos colectados fue superior al 98% para la capa de baja resolución y 96% para la capa de alta resolución, con una multiplicidad de

8 y 4, respectivamente (tabla 11). Los valores del factor-B general son adecuados para la resolución obtenida, mientras que la diferencias entre el R_{work} y el R_{free} se encuentran por debajo de 4%. Por otra parte, la densidad electrónica es continua a lo largo de la estructura primaria de la proteína y se encuentra bien definida en el sitio de unión.

Como se puede observar en la figura 17, la estructura D30A-arg muestra el mismo cambio conformacional observado previamente en la cadena lateral de D11. Adicionalmente, se observa un movimiento en la cadena lateral de S18 el cual permite la formación de un nuevo contacto entre dicho residuo y Wat1 (figura 17). Resulta interesante observar que la posición de Wat1 en el sitio de unión no se modificó (figura 17), de modo que el efecto de la mutación en la afinidad no se debe a una cambio en la distancia Wat1-arginina.

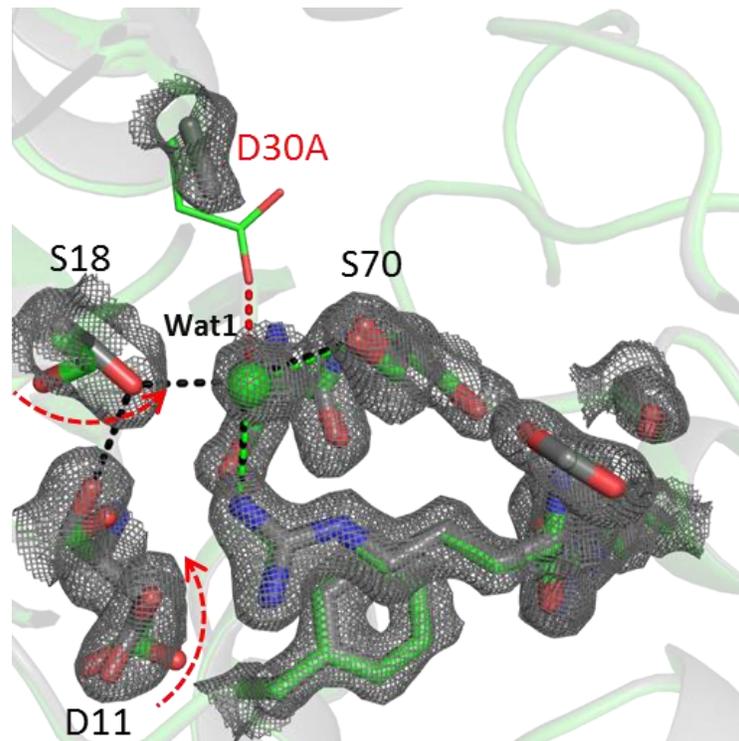


Figura 17. La posición de Wat1 en el sitio de unión no es modificada por la mutación del residuo D30. Alineamiento estructural del sitio de unión de LAO wt-arg (verde) con D30A-arg (gris). La cadena lateral eliminada se muestra como un “stick” más delgado al resto y está marcada con una etiqueta roja. Las moléculas de agua Wat1 se encuentran representadas como esferas. En color gris se muestra el mapa de densidad electrónica de omisión ($2mFo-dFc$) contorneado a 1σ .

Tabla 11. Colección de datos y estadísticas de afinamiento para la mutantes pertenecientes al “grupo de unión a mediada por molécula de agua”

Colecta de datos^a	
Mutante	D30A arg
PDB ID	6ML9
Resolución (Å)	50.00 - 1.68 (1.75-1.68)
Grupo espacial	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)
Dimensiones de la celda unitaria	
a, b, c, (Å)	37.18, 57.77, 101.44
Mosaicismo	0.91-1.20
Reflexiones totales	201796 (10242)
Reflexiones únicas	25298 (2382)
Multiplicidad	8.0 (4.3)
Integridad (%)	98.6 (96.0)
I / sigma (I)	38.3 (3.8)
R-merge	0.089 (0.418)
CC1/2	0.998 (0.857)
Estadísticas de afinamiento	
R _{work} , R _{free}	0.135, 0.172 (0.180, 0.278)
Factor B promedio (Å ²)	17.0
Proteína	15.2
Ligando	33.3
Solvente	29.3
Factor B de Wilson (Å ²)	14.1
Numero de átomos	2086
Proteína	1829
Ligando	14
Moléculas de agua	241
Residuos de la Proteína	238
RMS (enlaces) (Å)	0.010
RMS (ángulos) (°)	1.200
En zonas favorecidas del Ramachandran, (%)	97.00
En zonas permitidas del Ramachandran (%)	3.00
Fuera de las zonas permitidas del Ramachandran (%)	0.00
Choques	0.82

^a En paréntesis se muestran los datos para la capa de alta resolución.

Cálculos de ΔC_p para la unión de ligandos

El cambio en capacidad calorífica de unión (ΔC_p) es un parámetro termodinámico importante ya que determina la dependencia del ΔG , ΔH y ΔS con la temperatura. En estudios previos se observó que, para la transferencia de solutos entre fases, el plegamiento de proteínas y la unión de ligandos, el valor de ΔC_p correlaciona con el cambio en el área expuesta al solvente (ΔASA) resultante del proceso [50–53]. Anteriormente se encontró que los valores de ΔC_p obtenidos de manera experimental para la unión de arginina e histidina por parte de LAO wt (299 y 264 cal mol⁻¹ K⁻¹, respectivamente) pueden ser reproducidos de manera adecuada (286 y 252 cal mol⁻¹ K⁻¹, respectivamente) a partir de ecuaciones paramétricas al utilizar los valores de ΔASA calculados de las estructuras de LAO en ausencia y presencia de ligandos [28]. Las tres características estructurales que contribuyen al ΔC_p de LAO wt de acuerdo a [28] son las siguientes: 1) el ΔASA debido a la deshidratación del ligando la cual corresponde a $\approx 18\text{-}40$ cal mol⁻¹ K⁻¹; 2) la inclusión de moléculas de agua al sitio de unión asociadas a la interacción proteína-ligando a la cual se le atribuyen $\approx 27\text{-}36$ cal mol⁻¹ K⁻¹; 3) el ΔASA asociado al cambio conformacional, el cual representa la mayor contribución ($\approx 207\text{-}210$ cal mol⁻¹ K⁻¹).

Los valores de ΔC_p obtenidos de manera experimental para las mutantes de LAO son muy variados ya que en distintos casos tal parámetro no se modificó, mientras que en otros se observó un incremento o disminución de hasta 100 cal mol⁻¹ K⁻¹ (tabla 12, figura 18). Dado que el 80 % del ΔC_p es atribuido al cambio conformacional, se esperaba observar un efecto notable en los estados abierto y/o cerrado de la proteína. No obstante, todas las estructuras obtenidas en presencia de ligando mostraron la misma conformación cerrada presente en LAO wt (figura 19). Por otra parte, las estructuras en ausencia de ligando para las mutantes F52A y R77A presentaron una conformación abierta distinta a la de la proteína silvestre. Aunque tal modificación en el estado abierto podría ser responsable de cambios en la capacidad calorífica, el ΔC_p para F52A no muestra diferencias en con respecto a LAO wt, mientras que la unión de arginina e histidina en R77A presenta efectos opuestos en el ΔC_p (tabla 4). De manera interesante, todos los ΔC_p obtenidos de

forma experimental fueron reproducidos adecuadamente por métodos paramétricos (figura 20). Estos resultados indican que los efectos de las mutaciones sobre el ΔASA que causaron los cambios en el ΔC_p están representados en las estructuras cristalográficas a pesar de no mostrar cambios en la conformación cerrada y en el modo de unión.

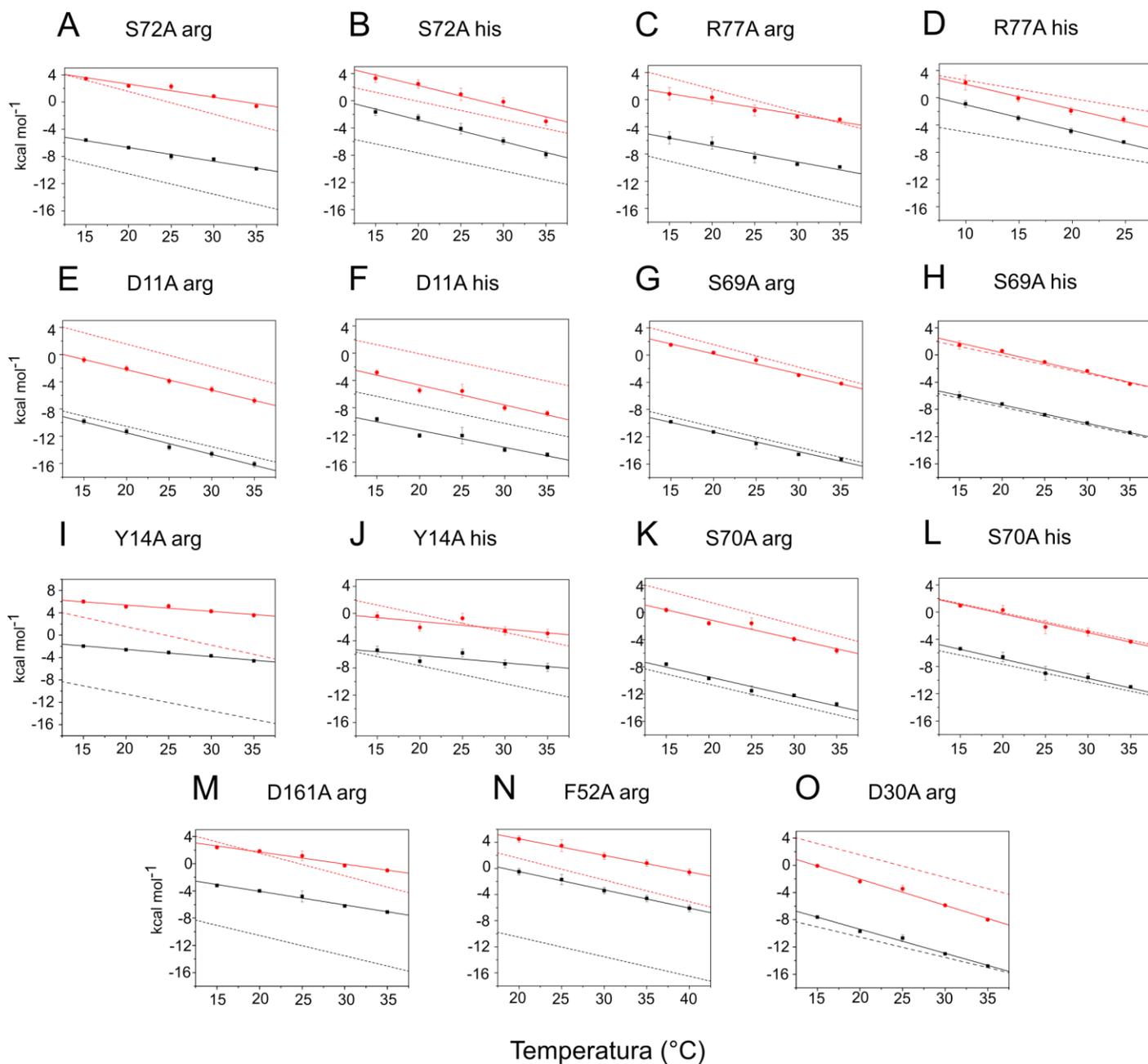


Figura 18. Dependencia de los valores de ΔH y $T\Delta S$ con la temperatura. Los valores experimentales de ΔH y $T\Delta S$ para la unión de arginina e histidina por parte de las mutantes se muestran en círculos negros y rojos, respectivamente; el ajuste lineal de los datos es presentado como líneas continuas. La dependencia de ambos parámetros termodinámicos en LAO wt se muestran en cada panel como líneas punteadas.

Tabla 12. Valores de ΔC_p obtenidos para la unión de arginina e histidina de manera experimental y predichos a partir del análisis estructural.

Grupo	Mutante	Δ ASA no polar cerrado-abierto (\AA^2) ^a	Δ ASA polar cerrado-abierto (\AA^2) ^a	Contribución del solvente ($\text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$) ^d	ΔC_p (cal mol ⁻¹ K ⁻¹) BE ^{c,d}	ΔC_p (cal mol ⁻¹ K ⁻¹) ITC
LAO silvestre	LAO arg	-689	-80	9	-303 ± 74	-299 ± 41
	LAO his	-626	-86	9	-270 ± 65	-264 ± 41
Grupo de unión a cadena principal	D161A arg ^b	-458	-36	0	-212 ± 51	-198 ± 20
	D161A his	ND	ND	ND	ND	ND
	S72A arg ^b	-508	-21	9	-232 ± 59	-197 ± 30
	S72A his	ND	ND	ND	ND	-312 ± 48
	R77A arg	-575	-199	-18	-241 ± 46	-220 ± 35
	R77A his	-747	-219	-27	-328 ± 64	-365 ± 37
Grupo de unión a cadena lateral	Y14A arg	-317	-149	-9	-121 ± 21	-121 ± 18
	Y14A his	-367	-176	-9	-137 ± 24	-110 ± 60
	F52A arg	ND	ND	ND	ND	-270 ± 14
	F52A his	ND	ND	ND	ND	ND
Grupo de unión a grupo guanidino	D11A arg ^b	-649	-57	9	-298 ± 72	-298 ± 19
	D11A his ^b	-597	-72	0	-269 ± 64	-271 ± 50
	S69A arg	ND	ND	ND	ND	-290 ± 23
	S69A his	ND	ND	ND	ND	-281 ± 21
Grupo de unión mediado por moléculas de agua	D30A arg ^b	-768	-41	9	-352 ± 89	-370 ± 20
	D30 his	ND	ND	ND	ND	ND
	S70A arg ^b	-663	-18	9	-307 ± 79	-295 ± 35
	S70A his	ND	ND	ND	ND	-280 ± 41

^a Los valores de Δ ASA se obtuvieron restando el ASA calculado para la estructura cerrada al ASA calculado para la estructura abierta .

^b La estructura abierta de LAO wt fue utilizada para calcular del ASA en ausencia de ligando de aquellas mutantes para las cuales no se obtuvo una estructura cristalográfica en dicho estado. Para ello se realizaron las mutaciones correspondientes mutada *in silico*.

^c Los valores de ΔC_p basados en estructura reportados en la tabla son el promedio ± desviación estándar de aquellos que se obtuvieron de las ecuaciones 5-8.

^d La contribución al ΔC_p de las moléculas de agua incorporadas o removidas del sitio de unión como parte del proceso de asociación del ligando fueron agregadas al valor basado en estructura ($\pm 9 \text{ cal}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ por molécula de agua de acuerdo a). El número de aguas que contribuyen al ΔC_p se obtuvo al restar el número de moléculas presentes en el sitio de unión en estado cerrado al de aquellas presentes en el estado nativo.

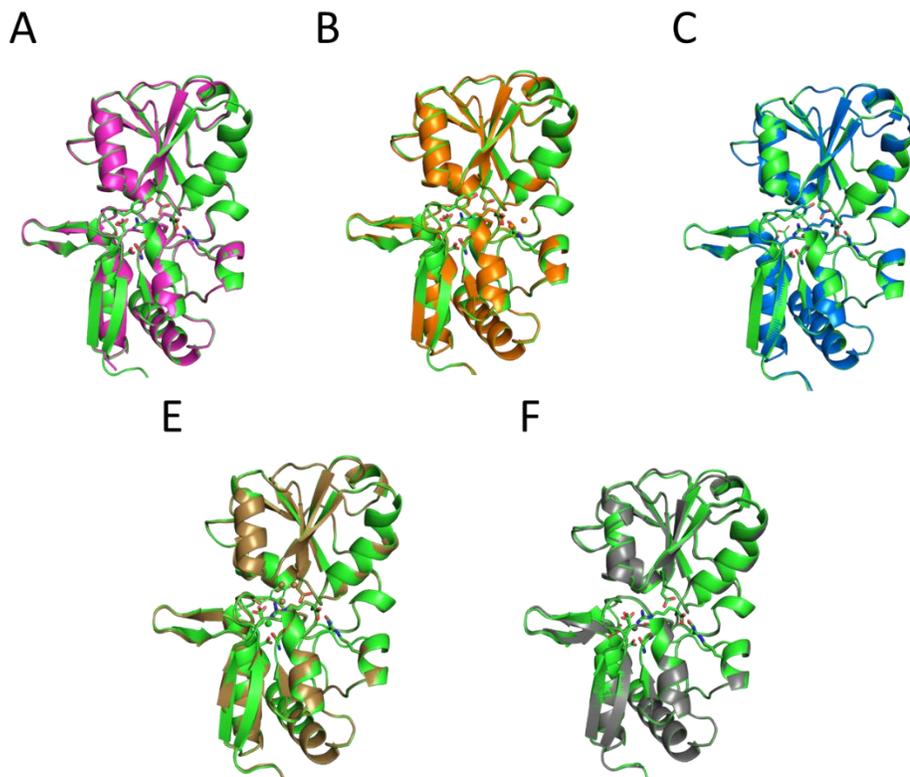


Figura 19. Las mutantes en presencia de ligando adoptan el mismo estado conformacional observado en LAO wt. Alineamiento de la estructura LAO wt-arg (verde en todos los paneles) con las estructuras S72A-arg (panel A, RMSD = 0.34 Å), R77A-arg (panel B, RMSD = 0.37 Å), D11A-arg (panel C, RMSD = 0.14 Å), Y14A-arg (panel D, RMSD = 0.22 Å) y D30A-arg (panel E, RMSD = 0.36 Å).

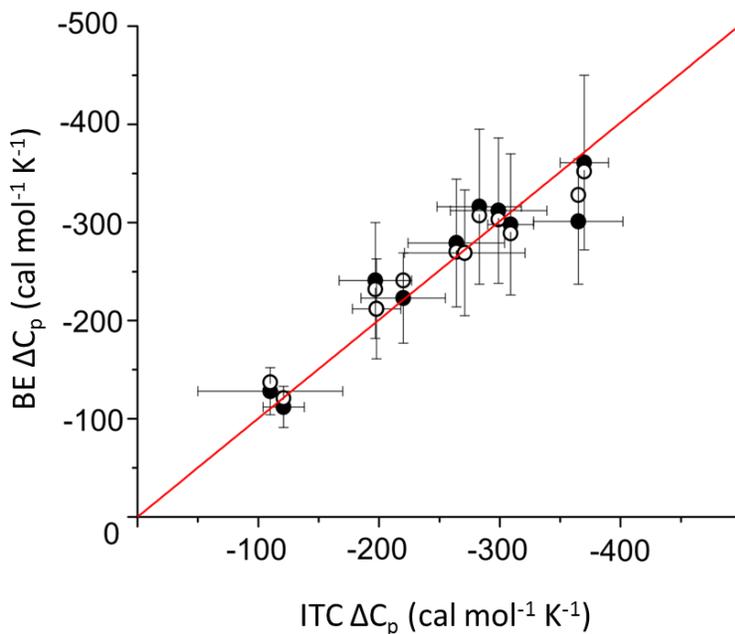


Figura 20. Los valores de ΔC_p basados en la estructura (BE) correlacionan adecuadamente con los valores experimentales (ITC). Los valores de BE ΔC_p con y sin la contribución de las moléculas de agua incorporadas al sitio de unión como parte de la asociación del ligando se muestran en círculos abiertos y cerrados, respectivamente. El ajuste lineal de los datos se muestra como una línea roja.

Estado conformacional semi-abierto

El alineamiento de las estructuras cristalográficas de R77A y F52A con LAO wt, todas en ausencia de ligando, muestra que dichas mutantes adquieren una conformación distinta a la que presenta la proteína silvestre (figura 21 A). Como se puede ver en la figura 21 B, la conformación adoptada por R77A y F52A tiene un grado de apertura menor al del estado abierto adquirido por LAO wt, lo cual resulta evidente al observar la posición de los residuos D161 y Y14 (figura 21 C). Por esta razón denominamos a dicha conformación como semi-abierta. De manera interesante, la cadena lateral de S72 en las estructuras semi-abiertas adopta la misma conformación observada en la estructura de LAO wt en complejo con arginina. En el estado abierto de la proteína silvestre, S72 interactúa con R77, sin embargo, en ambas mutantes, tal contacto se pierde y en su lugar S72 interactúa con una molécula de solvente.

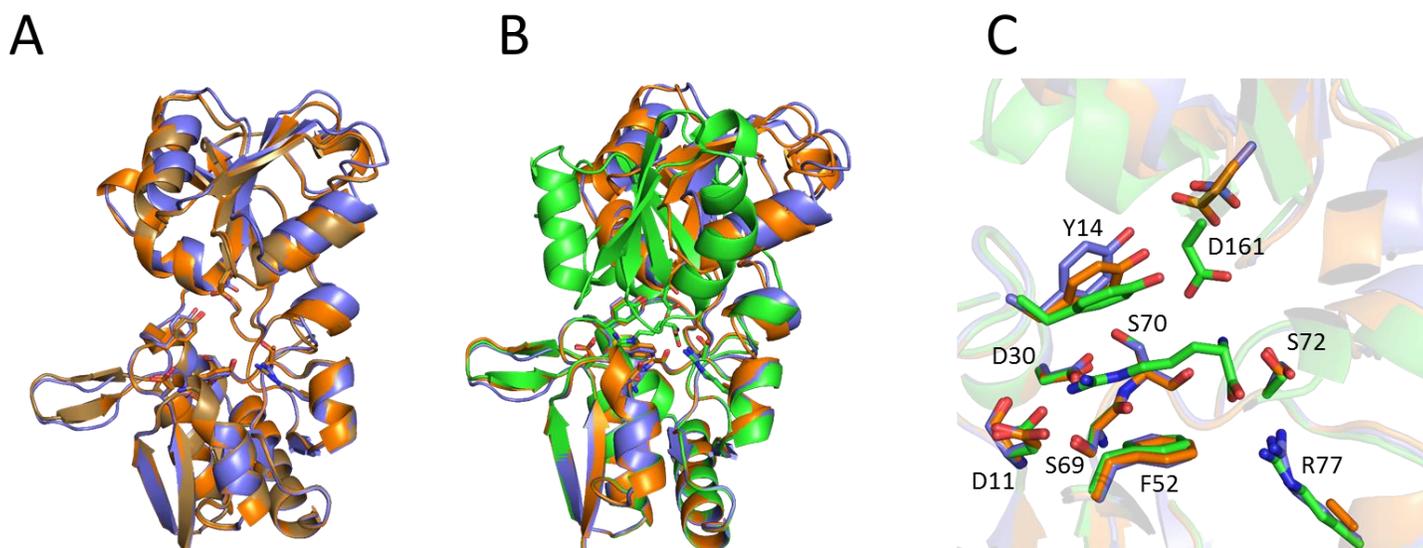


Figura 21. Las estructuras de las mutantes R77A y F52A en ausencia del ligando presentan un estado conformacional semi-abierto. A) Alineamiento de las estructuras R77A-vacia (naranja) y F52A-vacia (café) con LAO wt-vacia (morado); (RMSD = 1 Å) . B) Alineamiento de las estructuras R77A-vacia (naranja), LAO wt-vacia (morado) y LAO wt-arg (verde). C) Acercamiento al sitio de unión del alineamiento mostrado en el panel B.

DISCUSIÓN

Como parte de este trabajo hemos logrado dilucidar la contribución relativa de todos los residuos del sitio de unión de LAO a la afinidad y selectividad por dos ligandos que difieren en $4.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ en su energía de unión. Para varios casos se propuso una explicación estructural de los efectos termodinámicos causados por las mutantes sencillas de alanina. Los resultados estructurales permitieron observar que los contactos solvente-ligando y proteína-solvente-ligando juegan un papel crucial en la afinidad y selectividad de LAO.

Participación de los residuos de sitio de unión de LAO en la afinidad y selectividad

Las mutantes sencillas D161A y R77A redujeron el valor de ΔG para la unión de arginina e histidina a aproximadamente la mitad de su valor original. Estos resultados indican que los contactos formados entre la proteína y los grupos amino y carboxilo de dichos ligandos son cruciales para la unión. De manera sorprendente, D161 y R77 contribuyen a la selectividad, este resultado es completamente inesperado ya que tales residuos interactúan de forma similar con ambos ligandos (figura 3). La presencia de una molécula de agua contactando a la cadena lateral de la histidina en R77A-his, la cual no se observa en LAO wt, ofrece una posible explicación. Si la interacción entre R77 y el grupo carboxilo de la histidina propicia la salida de esta molécula del sitio de unión, el valor de ΔG podría verse afectado negativamente debido a la pérdida del contacto solvente-ligando. De este modo, la contribución de R77 a la afinidad por histidina disminuiría como resultado del efecto desfavorable que conlleva la salida del solvente. Es probable que el motivo por el cual R77 y D161 contribuyen a la selectividad sea más complejo, por ello es necesario realizar otro tipo de estudios, como dinámica molecular, para obtener mayor información.

Por su parte, los resultados termodinámicos para las mutantes D11A y S69A mostraron que el residuo D11 contribuye a la afinidad de ambos ligandos a pesar de interactuar exclusivamente con la cadena lateral de la arginina. De manera

interesante, dicha contribución es completamente entrópica y no entálpica como se esperaba. Estas observaciones, en conjunto con los datos estructurales, sugieren que la contribución de D11 a la energía de unión se debe a una reorganización del solvente y no precisamente a su interacción con el ligando. En contraste, S69 no contribuye a la unión de ninguno de los ligandos estudiados debido a que su impacto en la entalpia de asociación se compensa con un efecto entrópico opuesto y de la misma magnitud. Este resultado indica que no todas las interacciones formadas entre la proteína y el ligando contribuyen a la afinidad y nos lleva a cuestionar cuál es la función, si es que la hay, de S69 en el proceso de unión.

En lo que respecta a las interacciones catión-pi, F52 juega el papel más importante en la unión de arginina y presenta una de las mayores contribuciones a la unión de histidina, tal y como habían propuesto Silva y colaboradores. Adicionalmente, F52 es el residuo de mayor relevancia para la discriminación de ambos ligandos ($\Delta\Delta G_{\text{arg-his}} = 2.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ en F52A). Por su parte, la mutación de Y14 mostró que dicho residuo también contribuye de manera importante a la afinidad. Además, los resultados termodinámicos sugieren que Y14 contribuye a la selectividad de forma similar a D161, R77 y D11 ($\Delta\Delta G_{\text{arg-his}} = 3.2 \text{ kcal mol}^{-1}$).

Finalmente, los resultados termodinámicos obtenidos para las mutantes D30A y S70A mostraron, una vez más, lo importante que son los residuos que no interactúan directamente con el ligando. De manera interesante, la remoción del contacto D30-Wat1 tuvo un impacto muy alto en la afinidad de ambos ligandos mientras que la remoción del contacto S70-Wat1 afectó principalmente a la selectividad ($\Delta\Delta G_{\text{arg-his}} = 2.8 \text{ kcal mol}^{-1}$). Estos resultados muestran que las interacciones realizadas por Wat1 en el sitio de unión son de crucial importancia, tanto en la afinidad como en la discriminación de ligandos, tal y como fue propuesto tiempo atrás por el grupo de Ames [31].

Participación del solvente en la termodinámica de unión

Como hemos podido observar, la mayoría de las mutantes presentan efectos estructurales que involucran la incorporación de nuevas moléculas de solvente al sitio de unión y/o alteraciones en la organización del solvente que ya estaba presente. Una clara excepción es S72A-arg cuya estructura no presenta modificaciones importantes además de la mutación. De este modo, los efectos termodinámicos observados para esta mutante pueden ser atribuidos directamente a la remoción del contacto entre S72 y el grupo amino del ligando. Por el contrario, R77A incorpora nuevas moléculas de agua al sitio de unión, varias de ellas remplazando las interacciones proteína-ligando que fueron removidas. Tales moléculas parecen estar contribuyendo de manera favorable a la entalpía de unión, compensando en cierta medida el efecto desfavorable de la mutación a costa de un efecto entrópico desfavorable. La mutante Y14A es otro caso en el cual se observa la incorporación de moléculas de agua al sitio de unión. No obstante, estas moléculas interactúan de manera distinta con ambos ligandos por lo cual parecen influir de forma diferente en la termodinámica de unión.

Como se mencionó anteriormente, resulta sorprendente observar que la remoción de las interacciones formadas entre D30 y S70 con la molécula Wat1 tuvo efectos muy importantes en la afinidad y selectividad. Estos resultados muestran de manera clara que los contactos formados con el solvente son relevantes para la unión de ligandos. Es interesante resaltar que la cadena lateral de S18 rompe su interacción con el residuo T10 para formar un nuevo contacto con Wat1, el cual no reemplaza la contribución del contacto D30-Wat1. Esta observación sugiere que las interacciones formadas en el sitio de unión de LAO han sido optimizadas a lo largo de la evolución para la unión de aminoácidos básicos con alta afinidad.

Capacidad calorífica de unión

La obtención del valor de ΔC_p de unión es muy importante en la caracterización termodinámica de los procesos de interacción proteína-ligando ya que dicho parámetro describe la dependencia de la afinidad con la temperatura. Estructuralmente, el ΔC_p se ha relacionado con el cambio en el área accesible al solvente asociado a la unión del ligando y en LAO wt cerca del 80% de su valor proviene del cierre de la proteína. Por ello, supusimos que los efectos de hasta $100 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ observados en el ΔC_p para ciertas mutantes debían ser resultado de la modificación del estado cerrado de la proteína. Sin embargo, todas las estructuras en presencia de ligando mostraron la misma conformación cerrada encontrada en LAO wt. A pesar de que algunas mutantes presentaron modificaciones en la conformación abierta de la proteína, no existe una correlación clara de dicho efecto estructural con los cambios en ΔC_p . De esta manera podemos afirmar que el efecto de algunas mutantes en el cambio en la capacidad calorífica de unión no es causado por un impacto en las conformaciones abierta y cerrada de la proteína. No obstante, los valores de ΔC_p obtenidos de manera experimental fueron reproducidos adecuadamente a partir de ecuaciones paramétricas basadas en el ΔASA . Con base en estas observaciones es posible concluir que la contribución del cambio conformacional al ΔC_p depende en gran medida de las características estructurales locales y no exclusivamente del grado de apertura de la proteína.

Conformaciones semi-abiertas y el complejo de encuentro

La conformación cerrada adoptada por LAO es estabilizada por la formación de las interacciones proteína-ligando, por ello, se esperaba que alguna mutación afectara dicha conformación. Sin embargo, la proteína se cierra completamente sin importar el residuo del sitio de unión que fue removido y el cambio en la afinidad que esto conlleva. En contraste y de manera inesperada, encontramos que las estructuras vacías de las mutantes F52A y R77A adoptan una conformación abierta con un grado de apertura menor al adquirido por LAO wt, al cual hemos denominado estado semi-abierto. Estas observaciones indican que algunos de los residuos del sitio de unión también estabilizan la conformación totalmente abierta presente en la proteína

silvestre. Anteriormente, Silva y colaboradores encontraron por dinámica molecular la presencia de un estado semi-abierto como parte del mecanismo de unión del ligando de LAO [34,41]. Tal estado fue denominado complejo de encuentro. Aunque no podemos afirmar que la estructura que obtuvimos por cristalografía corresponda al complejo de encuentro, hemos demostrado la presencia de estados conformacionales distintos al abierto y al cerrado.

Comparación entre PBPs relacionadas

El estudio termodinámico y estructural de las interacciones proteína-ligando se ha llevado a cabo en diversas PBPs [6,17,55–59,24,26–32]. La figura 24 muestra los valores de ΔH y $-T\Delta S$ de unión obtenidos para varios miembros de esta familia de proteínas, incluyendo a LAO (hexágonos negros) y a las mutantes del sitio de unión (hexágonos blancos). Como es posible observar, existe una relación entre la polaridad de los ligandos y la firma termodinámica. En general, la unión de ligandos polares (símbolos negros) está guiada por entalpía (cuadrantes I y III, ΔH negativo), en algunos casos con una contribución entrópica favorable (cuadrante III, $-T\Delta S$ negativo) y en otros desfavorable (cuadrante III, $-T\Delta S$ positivo). En contraste, los ligandos no polares (símbolos color vino) están guiados por entropía (cuadrante IV, $-T\Delta S$ negativo, símbolos color vino), con una contribución entálpica desfavorable en la mayor parte de los casos. Adicionalmente, hay una dependencia lineal, inversamente proporcional, entre ambos parámetros termodinámicos, indicando que existe una compensación entre la entalpía y la entropía de unión asociada a la interacciones PBP-ligando, tal y como se ha observado en otros grupos de proteínas [60–66]. No obstante, los valores para la unión de ligandos polares y no polares se ajustan a dos líneas rectas distintas, las cuales comparten la misma pendiente (-0.85) pero presentan valores diferentes de ordenada al origen (-7.5 y -10, respectivamente). De este modo, es posible afirmar que la dependencia entre el ΔH y el $-T\Delta S$ para la unión de ligandos polares y no polares es la misma, sin embargo, parten de un balance entalpía-entropía distinto, en el cual, la contribución entrópica a la unión de ligandos no polares es mayor ($-T\Delta S$ de 2.5 kcal mol⁻¹ más negativo). Por su parte, la pendiente de -0.85 indica que un cambio de 1 kcal mol⁻¹ en el valor

de ΔH está asociado a un cambio de $\approx -0.85 \text{ kcal mol}^{-1}$ en el $-T\Delta S$, de modo que las contribuciones entálpicas tienen un peso ligeramente mayor que las entrópicas. Si la compensación entalpía-entropía fuera perfecta, todas las PBPs presentarían la misma afinidad por sus ligando. Esto indica que las diferencias en la magnitud de los cambios entrópicos y entálpicos son la base de la diversidad de valores de K_d observados en las PBPs. De manera interesante, los valores termodinámicos obtenidos para las mutantes del sitio de unión de LAO se ajustan adecuadamente a la misma correlación. Estas observaciones indican que cualquier modificación estructural que tenga un efecto sobre el valor de ΔH también lo tendrá sobre el ΔS (o viceversa), aunque de manera opuesta, tal y como se ha señalado previamente [60–66]. Cabe mencionar que la mutantes que afectaron la afinidad presentaron un efecto entálpico y entrópico desigual, sin embargo, S69A, quien tuvo un efecto neutral en el ΔG de unión, mostró una compensación entalpía-entropía cercana a cero. De este modo, es claro que para modificar la afinidad de una PBP se requiere propiciar un desbalance en la compensación entalpía-entropía lo cual aún resulta complicado.

Una pregunta importante que surge a partir de este análisis es la siguiente: ¿cuál es el origen de la correlación entre la entalpía y la entropía de unión? Como hemos visto, tal comportamiento se observa en todas las PBPs analizadas sin importar la polaridad de los ligando, las diferencias estructurales de los sitios de unión, o los residuos mutados. Estas observaciones concuerdan con los resultados obtenidos al analizar otros complejos proteína-ligando a partir de los cuales se ha propuesto que la compensación entalpía-entropía está asociada en gran medida al solvente [60,63–66].

A pesar de la correlación que existe entre los datos termodinámicos de unión y la polaridad de los ligandos, es posible observar que ciertas PBPs se comportan de manera distinta, tal como STM4351. STM4351 es una PBP completamente específica para la unión de arginina, ligando por el cual presenta una K_d de $5.7 \mu\text{M}$ [29]. La estructura del sitio de unión de LAO es notablemente similar a la estructura observada en STM4351, no obstante, esta última no presenta moléculas de agua

interactuando con el ligando. En su lugar, los contactos solvente-arginina que se observan en LAO son remplazados por interacciones proteína-ligando en STM4351. De manera interesante, la unión de arginina por parte de STM4351 es un proceso endotérmico, el cual presenta una contribución entálpica ligeramente desfavorable ($\Delta H = 1.4 \text{ kcal mol}^{-1}$) y una contribución entrópica altamente favorable ($-T\Delta S = -8.9 \text{ kcal mol}^{-1}$).

Por otra parte, AncQR es un ancestro reconstruido de las proteínas periplásmicas de unión a arginina y glutamina [67]. Esta proteína une arginina con una K_d de $2.9 \mu\text{M}$ (similar a STM4351) como resultado de una contribución entálpica altamente favorable ($\Delta H = -11.2 \text{ kcal mol}^{-1}$, similar al observado en LAO) y una contribución entrópica muy desfavorable ($-T\Delta S = 4.1 \text{ kcal mol}^{-1}$, mucho mayor al que LAO presenta). En contraste a STM4351, AncQR presenta moléculas de agua en el sitio de unión.

Como se puede observar, la unión de arginina en LAO y AncQR es un proceso exotérmico, mientras que en STM4351 es endotérmico. Estas características termodinámicas correlacionan con la presencia y ausencia de moléculas de solvente en el sitio de unión. Por su parte, Stamp y colaboradores propusieron que STM4351 solo interactúa con arginina debido a la ausencia de moléculas de agua en el sitio de unión de dicha PBP [29], lo cual reafirma el papel del solvente en la selectividad. Adicionalmente, estas observaciones muestran que la presencia de un mayor número de contactos proteína-ligando no necesariamente implica una contribución más favorable a la afinidad.

Otra PBP que está altamente relacionada con LAO es HisJ. Como mencionamos en la introducción, LAO y HisJ son proteínas homologas que interactúan con los mismos ligandos pero con distinta afinidad (K_d de $3.0 \mu\text{M}$ y de 64 nM en HisJ para la unión de arginina e histidina, respectivamente). Interesantemente, Paul y colaboradores mostraron que la unión de arginina por parte de HisJ es un proceso endotérmico (similar a STM4351), mientras que la unión de histidina es exotérmica [27]. Por esta razón, el estudio termodinámico y estructural detallado de la unión de

ligandos en HisJ podría arrojar información importante para comprender a fondo la relación energética-estructura en las PBPs.

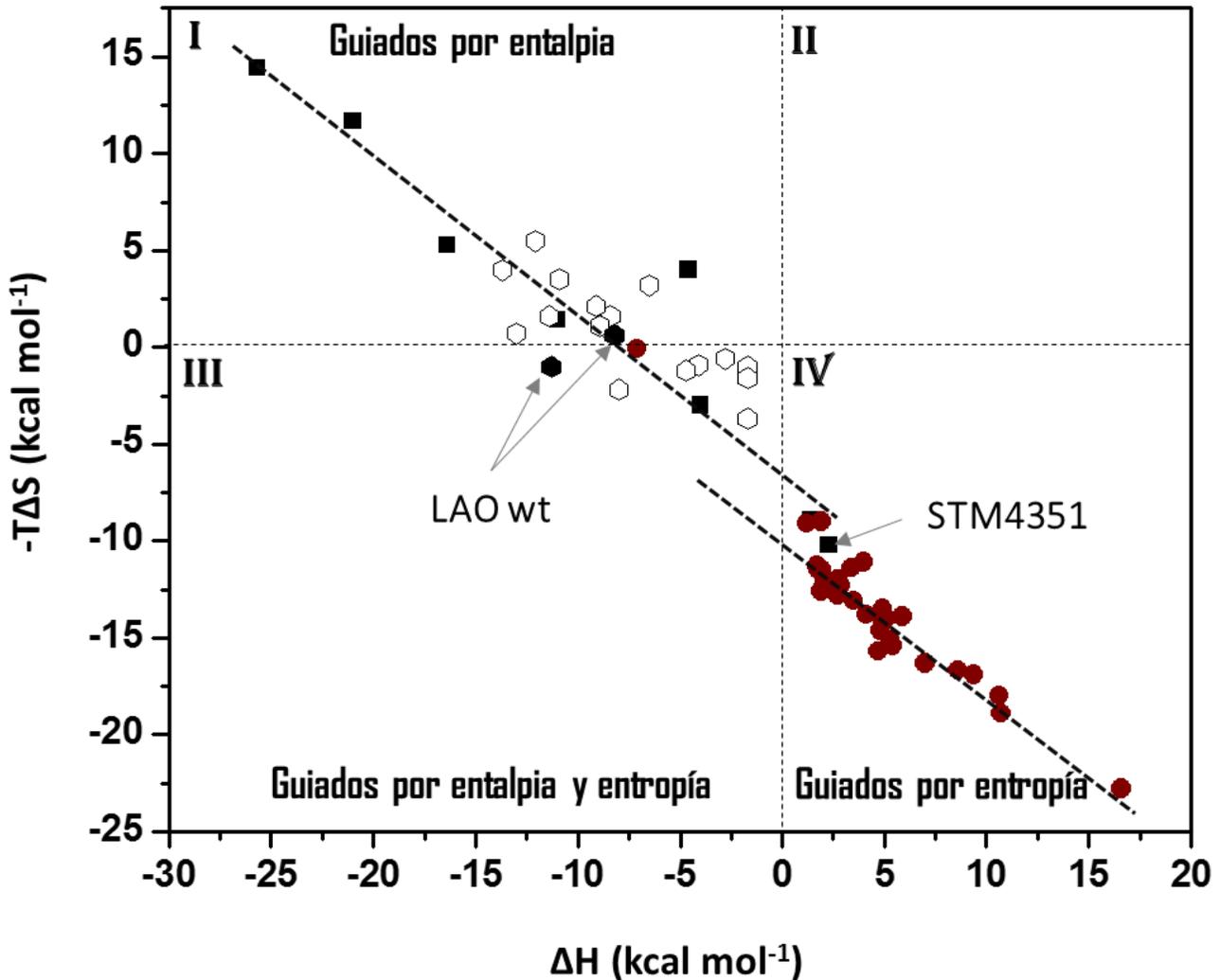
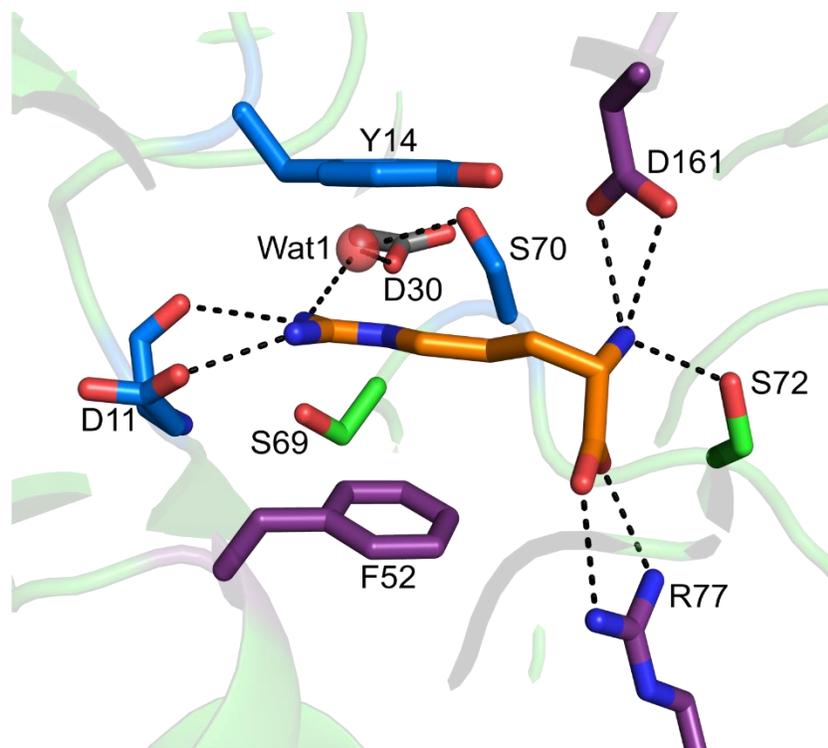


Figura 24. Los valores de ΔH y $-T\Delta S$ para distintas PBPs muestran una correlación lineal. Los símbolos negros muestran los valores de ΔH y $-T\Delta S$ para la unión de ligandos polares por parte de diversas PBPs, entre las cuales se encuentran LAO, HisJ, STM4351, la proteína de unión a maltosa (MBP), la proteína de unión a arabinosa (ABP), la proteína de unión a putresina (PotF), entre otras. Por su parte, los símbolos color vino representan valores para la unión de moléculas no polares para varias PBPs, como son la proteína de unión a leucina e isoleucina (LBP y LIVBP, respectivamente), la proteína de unión a oligopéptidos (OppA), entre otras. Finalmente, los símbolos abiertos pertenecen a las mutantes sencillas de LAO

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Como resultado de este trabajo hemos logrado dilucidar la contribución de los residuos del sitio de unión de LAO en la asociación de los ligandos arginina e histidina (figura 25). El mayor aporte a la afinidad y selectividad está dada por la interacción catión-pi realizada por la fenilalanina 52. De igual forma, los residuos D161 y R77 contribuyen de manera importante a la afinidad y, opuesto a lo que se esperaba, participan en la discriminación de arginina e histidina. El residuo D30 también presenta un efecto notable en la energética de unión de ambos ligandos a pesar de no interactuar directamente con ellos; en este caso no hay una contribución a la selectividad. Por su parte, los residuos Y14, D11 y S70 contribuyen a la afinidad en menor medida que los residuos antes mencionados, no obstante, juegan un papel importante en la selectividad. Dado que la contribución de los residuos D30 y S70 está dada a partir de su interacción con las moléculas de agua Wat1 y Wat2, podemos concluir que la presencia de solvente en el sitio de unión es de suma importancia. Finalmente, S69 no contribuye a la afinidad de unión de ninguno de los ligandos estudiados, por lo cual no queda claro si dicho residuo presenta alguna función relevante en el proceso de asociación LAO-ligando. Este último caso deja claro que no todos los contactos realizados entre la proteína y los ligandos tienen un efecto favorable en la energética de asociación, de modo que un mayor número de interacciones no siempre conlleva una mayor afinidad. En conclusión, podemos afirmar que la afinidad y selectividad en LAO son el resultado de la integración de interacciones proteína-ligando, proteína-solvente y ligando-solvente. Aun es necesario realizar otro tipo de estudios, como dinámica molecular o resonancia magnética nuclear, para obtener mayor información sobre la relación estructura-termodinámica en las mutantes de LAO. Además, el estudio termodinámico, cinético y estructural en otras PBPs (ej. HisJ) y complejos proteína-ligando es indispensable para mejorar nuestro conocimiento de los procesos de unión.



- Gran contribución a la afinidad, importante para la selectividad
- Gran contribución a la afinidad
- Importante para la selectividad
- Contribución menor o nula a la afinidad

Figura 25. Contribución de los residuos del sitio de unión de LAO a la afinidad y selectividad.

REFERENCIAS

- 1 Davies TG, Hubbard RE & Tame JRH (1999) Relating structure to thermodynamics: The crystal structures and binding affinity of eight OppA-peptide complexes. *Protein Sci.* **8**, 1432–1444.
- 2 Fisher HF (2015) Protein–Ligand Interactions: Thermodynamic Basis and Mechanistic Consequences. *eLS*, 1–13.
- 3 Olsson TSG, Williams MA, Pitt WR & Ladbury JE (2008) The Thermodynamics of Protein-Ligand Interaction and Solvation: Insights for Ligand Design. *J. Mol. Biol.* **384**, 1002–1017.
- 4 Reynolds CH & Holloway MK (2011) Thermodynamics of ligand binding and efficiency. *ACS Med. Chem. Lett.* **2**, 433–437.
- 5 Baum B, Muley L, Smolinski M, Heine A, Hangauer D & Klebe G (2010) Non-additivity of functional group contributions in protein-ligand binding: A comprehensive study by crystallography and isothermal titration calorimetry. *J. Mol. Biol.* **397**, 1042–1054.
- 6 Quioco FA, Wilson DK & Vyas NK (1989) Substrate specificity and affinity of a protein modulated by bound water molecules. *Nature* **340**, 404–407.
- 7 Biela A, Khayat M, Tan H, Kong J, Heine A, Hangauer D & Klebe G (2012) Impact of ligand and protein desolvation on ligand binding to the S1 pocket of thrombin. *J. Mol. Biol.* **418**, 350–366.
- 8 Allison B, Combs S, DeLuca S, Lemmon G, Mizoue L & Meiler J (2014) Computational design of protein-small molecule interfaces. *J. Struct. Biol.* **185**, 193–202.
- 9 Feldmeier K & Höcker B (2013) Computational protein design of ligand binding and catalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **17**, 929–933.

- 10 Schreier B, Stumpp C, Wiesner S & Höcker B (2009) Computational design of ligand binding is not a solved problem. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 18491–18496.
- 11 Yang W & Lai L (2017) Computational design of ligand-binding proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **45**, 67–68.
- 12 Berntsson RP, Smits SHJ, Schmitt L, Slotboom D-J & Poolman B (2010) A structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS Lett.* **584**, 2606–17.
- 13 Felder CB, Graul RC, Lee AY, 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**, 7–26.
- 14 Dwyer MA & Hellinga HW (2004) Periplasmic binding proteins: A versatile superfamily for protein engineering. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 495–504.
- 15 Quijcho FA & Ledvina PS (1996) Micro Review Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis : variation of common themes. *Mol. Microbiol.* **20**, 17–25.
- 16 Grünewald FS (2013) Periplasmic Binding Proteins in Biosensing Applications BT - Advances in Chemical Bioanalysis. In (Matysik F-M, ed), pp. 205–235. Springer International Publishing, Cham.
- 17 Medintz IL & Deschamps JR (2006) Maltose-binding protein : a versatile platform for prototyping biosensing. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**, 17–27.
- 18 Steffen V, Otten J, Engelmann S, Radek A, Limberg M, Koenig BW, Noack S, Wiechert W & Pohl M (2016) A toolbox of genetically encoded FRET-based biosensors for rapid L-lysine analysis. *Sensors* **16**, 1–14.

- 19 Whitfield JH, Zhang WH, Herde MK, Clifton BE, Radziejewski J, Janovjak H, Henneberger C & Jackson CJ (2015) Construction of a robust and sensitive arginine biosensor through ancestral protein reconstruction. *Protein Sci.* **24**, 1412–1422.
- 20 Zhang F & Keasling J (2011) Biosensors and their applications in microbial metabolic engineering. *Trends Microbiol.* **19**, 323–329.
- 21 Putman M, van Veen HW & Konings WN (2000) Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 672–93.
- 22 Kos V & Ford RC (2009) The ATP-binding cassette family: A structural perspective. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 3111–3126.
- 23 Higgins CF & Linton KJ (2004) The ATP switch model for ABC transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 918–926.
- 24 H Fukada JMS and FAQ (1983) Thermodynamics of the Binding of L-Arabinose and of D-Galactose to the L-Arabinose-binding Protein of Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **258**, 13193–1319.
- 25 Vassilyev DG, Tomitori H, Kashiwagi K, Morikawa K & Igarashi K (1998) Crystal structure and mutational analysis of the Escherichia coli putrescine receptor. Structural basis for substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **273**, 17604–17609.
- 26 Hu Y, Fan CP, Fu G, Zhu D, Jin Q & Wang DC (2008) Crystal Structure of a Glutamate/Aspartate Binding Protein Complexed with a Glutamate Molecule: Structural Basis of Ligand Specificity at Atomic Resolution. *J. Mol. Biol.* **382**, 99–111.
- 27 Paul S, Banerjee S & Vogel HJ (2017) Ligand binding specificity of the *Escherichia coli* periplasmic histidine binding protein, HisJ. *Protein Sci.* **26**, 268–279.

- 28 Pulido NO, Silva D-A, Tellez L a, Pérez-Hernández G, García-Hernández E, Sosa-Peinado A & Fernández-Velasco DA (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**, 108–16.
- 29 Stamp AL, Owen P, El Omari K, Lockyer M, Lamb HK, Charles IG, Hawkins AR & Stammers DK (2011) Crystallographic and microcalorimetric analyses reveal the structural basis for high arginine specificity in the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium periplasmic binding protein STM4351. *Proteins* **79**, 2352–2357.
- 30 Vigouroux A, El Sahili A, Lang J, Aumont-Nicaise M, Dessaux Y, Faure D & Moréra S (2017) Structural basis for high specificity of octopine binding in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. *Sci. Rep.* **7**, 1–13.
- 31 Oh BH, Ames GFL & Kim SH (1994) Structural basis for multiple ligand specificity of the periplasmic lysine-, arginine-, ornithine-binding protein. *J. Biol. Chem.* **269**, 26323–26330.
- 32 Elias M, Wellner A, Goldin-Azulay K, Chabriere E, Vorholt JA, Erb TJ & Tawfik DS (2012) The molecular basis of phosphate discrimination in arsenate-rich environments. *Nature* **491**, 134–137.
- 33 Scheib U, Shanmugaratnam S, Farías-Rico JA & Höcker B (2014) Change in protein-ligand specificity through binding pocket grafting. *J. Struct. Biol.* **185**, 186–192.
- 34 Silva DA, Domínguez-Ramírez L, Rojo-Domínguez A & Sosa-Peinado A (2011) Conformational dynamics of L-lysine, L-arginine, L-ornithine binding protein reveals ligand-dependent plasticity. *Proteins* **79**, 2097–2108.
- 35 Ortega G, Diercks T & Millet O (2012) Carbohydrate Affinity for the Glucose – Galactose Binding Protein Is Regulated by Allosteric Domain Motions. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 19869–19876.

- 36 Banda-Vázquez J, Shanmugaratnam S, Rodríguez-Sotres R, Torres-Larios A, Höcker B & Sosa-Peinado A (2018) Redesign of LAOBP to bind novel l-amino acid ligands. *Protein Sci.* **27**, 957–968.
- 37 Nikaido K & Ames GFL (1992) Purification and characterization of the periplasmic lysine-, arginine-, ornithine-binding protein (LAO) from *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **267**, 20706–20712.
- 38 Oh BH, Pandit J, Kang CH, Nikaido K, Gokcen S, Ames GF & Kim SH (1993) Three-dimensional Structures of the Periplasmic Lysine/Arginine/Ornithine-binding Protein with and without a Ligand. *J. Biol. Chem.* **268**, 11348–11355.
- 39 Higgins CF & Ames GFL (1981) Two periplasmic transport proteins which interact with a common membrane receptor show extensive homology: complete nucleotide sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 6038–6042.
- 40 Petronilli V & Ames GF-L (1991) Binding Protein-independent Histidine Permease Mutants 16293. *J. Biol. Chem.* **266**, 16293–16296.
- 41 Silva D-A, Bowman GR, Sosa-Peinado A & Huang X (2011) A role for both conformational selection and induced fit in ligand binding by the LAO protein. *PLoS Comput. Biol.* **7**, e1002054.
- 42 Piñeiro Á, Muñoz E, Sabín J, Costas M, Bastos M, Velázquez-Campoy A, Garrido PF, Dumas P, Ennifar E, García-Río L, Rial J, Pérez D, Fraga P, Rodríguez A & Coteló C (2019) AFFINImeter: A software to analyze molecular recognition processes from experimental data. *Anal. Biochem.* **577**, 117–134.
- 43 Turnbull WB & Daranas AH (2003) On the Value of *c*: Can Low Affinity Systems Be Studied by Isothermal Titration Calorimetry? *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 14859–14866.

- 44 Minor W, Cymborowski M, Otwinowski Z & Chruszcz M (2006) HKL-3000: The integration of data reduction and structure solution - From diffraction images to an initial model in minutes. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **62**, 859–866.
- 45 Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, Keegan RM, Krissinel EB, Leslie AGW, McCoy A, McNicholas SJ, Murshudov GN, Pannu NS, Potterton EA, Powell HR, Read RJ, Vagin A & Wilson KS (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **67**, 235–242.
- 46 Adams PD, Afonine P V., Bunkóczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, Headd JJ, Hung LW, Kapral GJ, Grosse-Kunstleve RW, McCoy AJ, Moriarty NW, Oeffner R, Read RJ, Richardson DC, Richardson JS, Terwilliger TC & Zwart PH (2010) PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221.
- 47 Emsley P & Cowtan K (2004) Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132.
- 48 Davis IW, Leaver-Fay A, Chen VB, Block JN, Kapral GJ, Wang X, Murray LW, Arendall WB, Snoeyink J, Richardson JS & Richardson DC (2007) MolProbity: All-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* **35**, 375–383.
- 49 Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN & Bourne PE (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242.
- 50 Makhatadze GI & Privalov PL (1995) Energetics of Protein Structure. *Adv. Protein Chem.* **47**, 307–425.

- 51 Murphy K & Freire E (1992) Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behaviour in proteins. *Adv Protein Chem.* **43**, 313–361.
- 52 Robertson AD & Murphy KP (1997) Protein Structure and the Energetics of Protein Stability. *Chem. Rev.* **97**, 1251–1268.
- 53 Spolar RS, Livingstone JR & Thomas Record4'8 M (1992) Use of Liquid Hydrocarbon and Amide Transfer Data to Estimate Contributions to Thermodynamic Functions of Protein Folding from the Removal of Nonpolar and Polar Surface from Water. *Biochemistry* **31**, 3947–3955.
- 54 Willard L, Ranjan A, Zhang H, Monzavi H, Boyko RF, Sykes BD & Wishart DS (2003) VADAR: A web server for quantitative evaluation of protein structure quality. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3316–3319.
- 55 Miller DM, Olson JS, Pflugrath JW & Quioco F a (1983) Rates of ligand binding to periplasmic proteins involved in bacterial transport and chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **258**, 13665–72.
- 56 Mattle D, Zeltina A, Woo JS, Goetz BA & Locher KP (2010) Two Stacked Heme Molecules in the Binding Pocket of the Periplasmic Heme-Binding Protein HmuT from *Yersinia pestis*. *J. Mol. Biol.* **404**, 220–231.
- 57 Bevers LE, Hagedoorn PL, Krijger GC & Hagen WR (2006) Tungsten transport protein A (WtpA) in *Pyrococcus furiosus*: The first member of a new class of tungstate and molybdate transporters. *J. Bacteriol.* **188**, 6498–6505.
- 58 Abbott DW & Boraston AB (2007) Specific Recognition of Saturated and 4,5-Unsaturated Hexuronate Sugars by a Periplasmic Binding Protein Involved in Pectin Catabolism. *J. Mol. Biol.* **369**, 759–770.
- 59 Sleigh SH, Seavers PR, Wilkinson AJ, Ladbury JE & Tame JRH (1999) Crystallographic and calorimetric analysis of peptide binding to OppA protein. *J. Mol. Biol.* **291**, 393–415.

- 60 Fox JM, Zhao M, Fink MJ, Kang K & Whitesides GM (2018) The Molecular Origin of Enthalpy/Entropy Compensation in Biomolecular Recognition. *Annu. Rev. Biophys.* **47**, 223–250.
- 61 Dragan AI, Liu Y, Mekeyeva EN & Privalov PL (2004) DNA-binding domain of GCN4 induces bending of both the ATF-CREB and AP-1 binding sites of DNA. *Nucleic Acids Res.* **32**, 5192–5197.
- 62 Edwards AA, Mason JM, Clinch K, Tyler PC, Evans GB & Schramm VL (2009) Altered Enthalpy–Entropy Compensation in Picomolar Transition State Analogues of Human Purine Nucleoside Phosphorylase. *Biochemistry* **48**, 5226–5238.
- 63 Dragan AI, Read CM & Crane-Robinson C (2017) Enthalpy–entropy compensation: the role of solvation. *Eur. Biophys. J.* **46**, 301–308.
- 64 Dragan AI, Frank L, Liu Y, Makeyeva EN, Crane-Robinson C & Privalov PL (2004) Thermodynamic signature of GCN4-bZIP binding to DNA indicates the role of water in discriminating between the AP-1 and ATF/CREB sites. *J. Mol. Biol.* **343**, 865–878.
- 65 Breiten B, Lockett MR, Sherman W, Fujita S, Al-Sayah M, Lange H, Bowers CM, Heroux A, Krilov G & Whitesides GM (2013) Water networks contribute to enthalpy/entropy compensation in protein-ligand binding. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 15579–15584.
- 66 Lumry R & Rajender S (1970) Enthalpy–entropy compensation phenomena in water solutions of proteins and small molecules: A ubiquitous property of water. *Biopolymers* **9**, 1125–1227.
- 67 Clifton BE & Jackson CJ (2016) Ancestral Protein Reconstruction Yields Insights into Adaptive Evolution of Binding Specificity in Solute-Binding Proteins. *Cell Chem. Biol.* **23**, 236–245.