



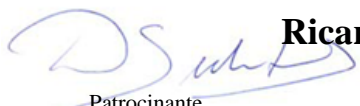
UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

“Análisis de la heterodimerización entre el dominio de unión a ADN de los factores de transcripción humanos FoxP1 y FoxP2”

Memoria para optar al Título de Bioquímico

Ricardo Hernán Coñuecar Jara


Patrocinante
Dra. Daniela Seelenfreund H.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Director
Dr. Jorge Babul C
Co-director
Dr. Exequiel Medina G.
Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular
Departamento de Biología
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

Santiago, Chile

2021

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Exequiel Medina, cotutor de esta tesis por su incansable apoyo, paciencia y compañerismo para la realización de esta tesis y por mantener siempre la visión de este trabajo como un momento de aprendizaje y de desarrollo como profesional.

Al Profesor Dr. Jorge Babul por recibirme en su laboratorio y por su constante consideración y apoyo no solo en lo académico sino también en lo personal.

A la Profesora Dra. Daniela Seelenfreund, por su apoyo y guía en este proceso y por mi desarrollo como Bioquímico.

A mi amiga Stephanie Tamarín, por su compañía, amistad y buena voluntad en todo momento, siempre dispuesta a cooperar y compartir.

Al grupo de laboratorio; Pablo, Isa y Vicky por su compañía y apoyo en las diferentes instancias de este trabajo.

Al laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular en general por su cooperación, suministros y grata compañía en el día a día.

A mis padres por su tremendo esfuerzo por salir adelante, educarme y brindarme las herramientas para desarrollarme como persona.

A mi pareja, por su amor y apoyo incondicional y por trabajar juntos por el sostenimiento de nuestro hogar.

A mis amigos de carrera Carla, Yareni, Carolina, Andrea, y Matías los cuales hemos vivido un sinnúmero de experiencias bellas, que atesoraré por siempre.

A mis familiares, amigos y colegas de trabajo que me han apoyado, motivado a seguir adelante y brindar una grata compañía.

A Conicyt, Proyecto Fondecyt 1170701.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	I
ÍNDICE DE CONTENIDOS	II
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	V
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT	VII
INTRODUCCIÓN	1
Plegamiento y asociación de proteínas.....	1
Dimerización vía intercambio de segmentos (IdS).	2
Dominio de unión a ADN de la subfamilia FoxP como modelo de la dimerización vía intercambio de segmentos (IdS).....	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	6
HIPÓTESIS.....	9
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
Materiales	10
Reactivos Químicos.....	10
Amortiguadores.....	11
Medios de cultivo	11
Columnas.....	11
Equipos.....	11
Sistemas comerciales.....	11
Métodos.....	13
Inducción y purificación de las proteínas FoxP1 y FoxP2 y mutantes a partir de <i>E. coli</i> BI21(DE3)-C41	13
Derivatización de muestras con fluoróforos.....	14
Mediciones de anisotropía de fluorescencia.....	14
Ensayos de cinéticas de asociación por anisotropía de fluorescencia	15
Ensayos de cinéticas de asociación en presencia de ADN.....	16
Análisis cinético y termodinámico de los ensayos de cinéticas de asociación.....	16

RESULTADOS	19
Asociación entre los dominios de unión a ADN de la subfamilia FoxP.	19
Caracterización del homodímero de FoxP1 y el heterodímero entre FoxP1-FoxP2.	23
Cinética de asociación del homodímero de FoxP1 en presencia de ADN.	30
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	37
BIBLIOGRAFÍA.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Dimerización vía intercambio de segmentos en FoxP.....	3
Figura 2. Análisis de la estructura y de la secuencia del dominio de unión a ADN de la subfamilia FoxP.....	5
Figura 3.- Cinética de asociación para el homodímero de FoxP1 y su mutante A39P.....	19
Figura 4.- Efecto de la concentración de FoxP1 en la cinética de asociación.....	21
Figura 5.- Efecto de la concentración de FoxP2 en la cinética de asociación.....	23
Figura 6.- Efecto de la temperatura en la cinética de asociación para el homodímero de FoxP1.....	25
Figura 7.- Efecto de la temperatura en la cinética de asociación para el heterodímero.....	26
Figura 8.-Análisis de Eyring para la asociación y disociación del homodímero de FoxP1 y el heterodímero.....	29
Figura 9.-Interacción entre ADN y monómero de FoxP silvestre.....	31
Figura 10.- Efecto del ADN en la cinética de asociación del homodímero a 37°C.....	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Materiales Biológicos.....	12
Tabla 2. Fluoróforos.....	12
Tabla 3. Oligonucleótidos.....	12
Tabla 4. Efecto de la temperatura en la cinética de asociación para el homodímero de FoxP1 y el heterodímero FoxP1-FoxP2.....	27

RESUMEN

El intercambio de segmentos (IdS) es un mecanismo de asociación y plegamiento de proteínas que conlleva al intercambio de contenido de estructura secundaria, cuyo equilibrio se alcanza en tiempos de días-años y requiere una alta concentración de proteína. Un modelo de estudio que realiza IdS es el dominio de unión a ADN de la subfamilia FoxP, donde la asociación de algunos de sus miembros está favorecida, tanto cinética como termodinámicamente con respecto a los modelos de estudio clásicos de IdS. Sin embargo, antecedentes de la literatura solo evalúan la homodimerización *in vitro* de la subfamilia FoxP, conduciendo al planteamiento de la hipótesis de este trabajo que postula que es posible la heterodimerización entre los dominios de unión a ADN de FoxP1 y FoxP2 y que el ADN favorece tal asociación *in vitro*. De acuerdo con esto, se evaluó la heterodimerización mediante estudios cinéticos monitoreados por anisotropía de fluorescencia, observándose que, aunque la formación del homodímero de FoxP1 está favorecida con respecto a la del heterodímero, la constante de disociación (K_D) del heterodímero es de ~ 3 órdenes de magnitud inferior a la del homodímero de FoxP2. Esto no sólo da cuenta de que la formación del heterodímero ocurre *in vitro* corroborando la hipótesis planteada, sino que además está favorecida respecto al homodímero de FoxP2 y a concentraciones fisiológicas. Adicionalmente, se procedió a la determinación de los parámetros energéticos de las reacciones de asociación y disociación utilizando la aproximación de Eyring, obteniendo información sobre la contribución entálpica y entrópica del heterodímero. Se observó que la barrera energética para alcanzar el estado de transición (ET) en la heterodimerización, es mayor respecto a la homodimerización de FoxP1 en $\sim 4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, dando cuenta de las diferencias a nivel entálpico entre ambos dímeros. Finalmente, la presencia de ADN disminuye la constante de velocidad observada para la asociación del homodímero de FoxP1, sugiriendo que el complejo monómero-ADN es menos susceptible a la unión de un segundo monómero. Estos resultados dan cuenta del rol de las propiedades de dimerización en la actividad de regulación transcripcional de estas proteínas y su importancia en un contexto biológico, dado que las condiciones de dimerización de las proteínas FoxP son extrapolables a las condiciones de pH y temperatura fisiológicas.

ABSTRACT

Analysis of the heterodimerization between DNA-binding domain of the human transcription factors FoxP1 and FoxP2

Three-dimensional domain swapping (DS) is a unique folding and association mechanism which involves the exchange of identical structural segments between two monomers to form an intertwined dimer, although for a typical DS protein model, the association equilibrium takes between several days to years to be reached. The DNA-binding domain from human FoxP transcription factors is a model of a group of proteins that undergo DS. This association of some of its members is both kinetically and thermodynamically favored compared to classic DS study models. However, most investigations have evaluated only the homodimerization *in vitro*, leading to the hypothesis of this work which suggests that the heterodimerization between FoxP1 and FoxP2 is feasible and favored via binding to the cognate DNA. To test the hypothesis, both homodimerization of FoxP1 and its heterodimerization with FoxP2 were evaluated through kinetic assays by fluorescence anisotropy experiments. Our results show that FoxP1 dimerization is favored compared to the heterodimer association, whereas the heterodimer dissociation is favored with respect to the homodimer dissociation, with both events occurring at a physiological concentration. Interestingly, the dissociation constant (K_D) for the heterodimer is ~ 3 orders magnitude lower than that of the FoxP2 homodimer. In addition, the Eyring approach was used to provide information about the enthalpic and entropic contribution of the kinetic reactions from homo- and heterodimers, indicating that the energy barrier that separates the monomers and the transition state (ET) during the heterodimerization process is ~ 4 kJ·mol⁻¹ higher than for FoxP1 homodimerization. In notable contrast, the dissociation energy barrier of the homodimer is ~ 2 kJ·mol⁻¹ higher than for the heterodimer, suggesting that enthalpic differences between both kinds of dimers explain most of their properties. Finally, incubation of the FoxP1 monomer with its cognate DNA decreases the homodimer association rate constant, suggesting that the monomer-DNA complex is less prone to bind a second monomer. These results give clues about the relationship between the dimerization properties of the proteins and their transcriptional regulation activity in a context that is close to conditions found in a biological environment.

INTRODUCCIÓN

Plegamiento y asociación de proteínas.

Las proteínas son macromoléculas esenciales para el funcionamiento de la célula. Estas ejecutan una amplia gama de roles que van desde lo estructural, enzimático, hasta inmunológico (Alberts, 2015). Tales funciones se deben a dos fenómenos importantes: el proceso de plegamiento, y la asociación en complejos de proteínas y también con otras moléculas, siendo ambos fundamentales para describir la vida a nivel molecular.

El plegamiento de proteínas es un mecanismo dirigido principalmente por la secuencia de aminoácidos y sus interacciones (Anfinsen, 1973). Estas interacciones permiten la formación de una estructura tridimensional estable, de mínima energía denominado “estado nativo”. Por su parte, la formación de complejos da origen a estructuras cuaternarias que aumentan la diversidad funcional y regulatoria de estas moléculas. Particularmente, la formación de dímeros es una de las asociaciones más frecuentes en las células (Mei y cols., 2005) y es fundamental en procesos tales como la catálisis enzimática, transducción de señales y expresión génica. Para dichas funciones, la especificidad de unión y la estabilidad de las interacciones intermoleculares son fundamentales. Bajo este contexto, los dímeros se pueden clasificar como obligados y no obligados. Estos últimos específicamente, son biológicamente más dinámicos, ya que, al ser transitorias sus interacciones intermoleculares pueden asociarse y disociarse *in vitro* e *in vivo*. Algunos dímeros no obligados pueden formar tanto homodímeros como heterodímeros, añadiendo un mayor nivel de complejidad funcional y de regulación.

La dimerización puede ocurrir simultáneamente con el plegamiento de sus monómeros, como es el caso de los dímeros obligados (Nooren, 2003), a diferencia de los no obligados donde cada monómero puede adquirir una estructura estable de forma independiente. En ambos casos, la dimerización se genera tras la formación de nuevos contactos intermoleculares por medio de interacciones no covalentes (Woodbury, 2008). Sin embargo, existe un tipo de asociación particular que escapa de esta definición, la cual se conoce como dimerización vía intercambio de segmentos (IdS).

Dimerización vía intercambio de segmentos (IdS).

La dimerización vía intercambio de segmentos o IdS ocurre cuando dos o más monómeros intercambian parte de su contenido de estructura secundaria. Este particular mecanismo de asociación involucra el intercambio de estructura secundaria tipo α -hélice, estructura beta o incluso, un dominio completo— formando un dímero entrelazado. Para llevar a cabo tal dimerización los contactos intramoleculares de los monómeros son reemplazados de manera intermolecular, manteniendo el mismo contenido de estructura secundaria. Aunque una porción de la proteína que no experimenta este intercambio es la denominada “región bisagra”, es la encargada de conectar las unidades entrelazadas (**Figura 1a**).

A diferencia los mecanismos más comunes de dimerización, en el IdS, el monómero y dímero están separados por una amplia barrera energética definida por el desplegamiento de cada cadena (Rousseau y cols., 1998). Esto conlleva a que la interconversión monómero-dímero pueda tardar días e incluso meses, como es el caso de la proteína reguladora del ciclo celular p13suc1, donde el proceso mencionado tarda tres meses a 25°C bajo condiciones fisiológicas *in vitro* (Rousseau y cols., 2001). Lo anterior sugiere que hay una relación directa entre la perturbación de la estructura nativa del monómero y la cinética de asociación vía intercambio de segmentos, ya sea por cambios de pH, temperatura, uso de agentes desnaturantes, e incluso mutaciones que perturban el estado nativo monomérico (Liu y Eisenberg, 2002).

En concordancia con lo anterior, la gran mayoría de las proteínas estudiadas muestran cinéticas y afinidades dramáticamente diferentes a los tiempos biológicos y concentraciones de proteína al interior celular (Newcomer, 2002). En este contexto, la subfamilia P de la familia de factores de transcripción humano Fox es un modelo de proteínas biológicamente interesante que forma dímeros vía intercambio de segmentos. Se ha descrito que estos factores forman dímeros vía IdS (**Figura 1b**). Las características cinéticas de este proceso específico los convierten en una excepción con respecto a los modelos de estudio clásicos de IdS mencionados anteriormente.

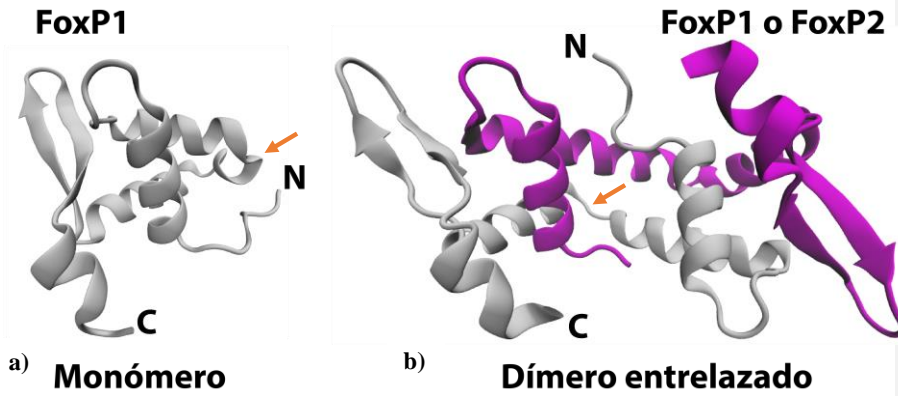


Figura 1. Dimerización vía intercambio de segmentos en FoxP.

- a) Elementos de estructura del monómero del dominio de unión a ADN de FoxP1.
- b) Elementos de estructura secundaria tras el intercambio de segmentos formando el dímero entrelazado entre FoxP1 con su homólogo o posiblemente con el monómero de unión a ADN de FoxP2. Las flechas color naranja indican la ubicación de la “región bisagra” tanto en el monómero como dímero entrelazado.

Comentado [c1]: figura no puede ir antes de que la menciones en el texto. Vuelve a colocarla donde estaba.... Cambié las leyendas a tamaño 11 porque el 10 es demasiado chico e incómodo para leer.

Dominio de unión a ADN de la subfamilia FoxP como modelo de la dimerización vía intercambio de segmentos (IdS).

El dominio de unión a ADN de la subfamilia FoxP (**Figura 2a**) posee adaptaciones estructurales únicas en comparación a otros miembros de la familia Fox que le permiten generar dímeros vía IdS. La región bisagra posee una adaptación clave que es la sustitución de un residuo de alanina por prolina en la secuencia “FP(A)FY” (**Figura 2b**) altamente conservada dentro de la familia. Adicionalmente, las proteínas FoxP humanas, comparadas con otros modelos cuya asociación es vía IdS, pueden alcanzar el equilibrio monómero-dímero entrelazado en horas, a bajas concentraciones de proteína (orden micromolar), sin perturbaciones y en ausencia de ligandos (Medina y cols., 2016; Stroud y cols., 2006). Este comportamiento de los monómeros de FoxP1 se ha explicado en base a su alta flexibilidad y desorden a nivel local, otorgándole las propiedades descritas (Medina y cols., 2020).

En humanos, se han descrito cuatro miembros (FoxP 1-4) con roles en la organogénesis cardíaca y pulmonar, diferenciación neuronal y regulación del sistema inmune (Li y cols., 2004). Estas proteínas requieren de una expresión génica espacio-temporal específica, sugiriendo que interacciones como la homo- y la heterodimerización podrían ser relevantes al momento de ejercer funciones diferenciales.

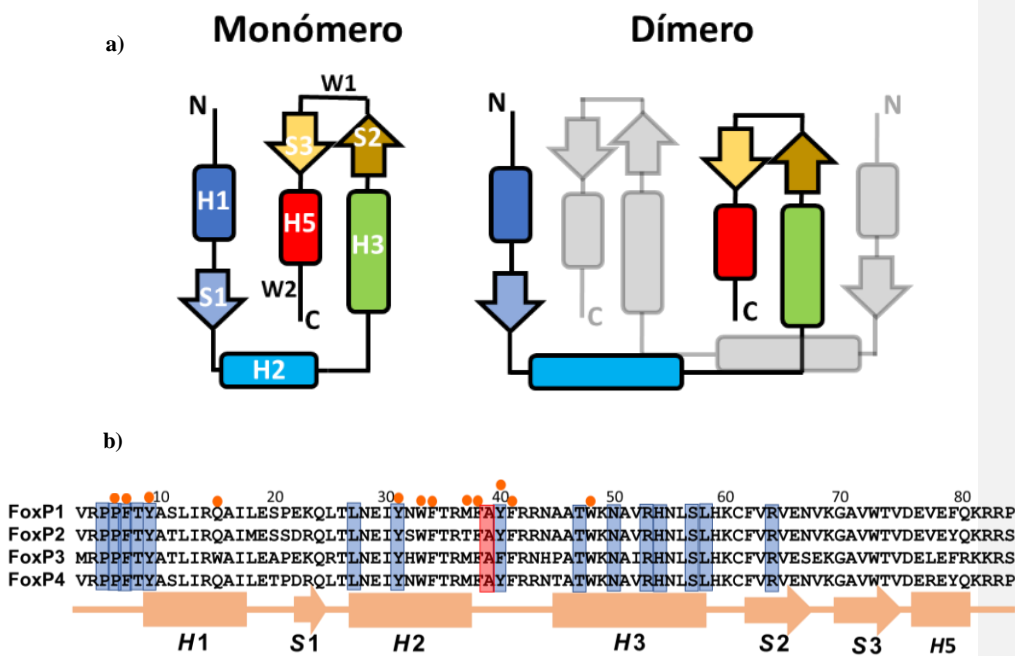


Figura 2. Análisis de la estructura y de la secuencia del dominio de unión a ADN de la subfamilia FoxP.

a) Diagrama de representación del monómero y homo- o heterodímero entrelazado del dominio Forkhead de FoxP1. (Modificado de Medina y cols., 2016). El contenido estructural intercambiado para la formación del dímero corresponde a las hélices 3 y 5, hebras 2 y 3 y lazos 1 y 2 (Stroud y cols., 2006).

b) Análisis de secuencia del dominio de unión a ADN (modificado de Stroud y cols., 2006). Se detallan los residuos involucrados en la unión ADN (sombreado azul), en las interacciones intermoleculares (círculos naranjos) y el residuo de alanina (sombreado rojo). El contenido de estructura secundaria se indica bajo la secuencia.

Comentado [c2]: Lo mismo, cambiar la posición de la figura de acuerdo al texto

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de la alta identidad de secuencia del dominio de unión a ADN (**Figura 2b**) dentro de los miembros de la subfamilia P, la estabilidad de sus dímeros vía IdS es muy diferente; FoxP3 es el dímero entrelazado más estable, apreciándose solo como dímero en solución (Bandukwala y cols., 2011). En el caso de FoxP2, estudios *in vitro* demuestran que posee una constante de disociación (K_D) de 2,4 mM a 4°C, observándose como monómero en solución hasta una concentración de 100 μ M (Perumal 2015). El comportamiento de FoxP1 es notablemente diferente a FoxP2, ya que existe como una mezcla de monómero-dímero con una constante de disociación de $\sim 1 \mu$ M a 37°C (Medina y cols., 2019), lo que equivalente a ~ 3 órdenes de magnitud inferior a FoxP2 y a la mayoría de las proteínas caracterizadas que se asocian por IdS. Lo anterior refuerza la idea que las propiedades de heteroasociación entre monómeros y el tiempo de vida del dímero formado podrían ejercer funciones transcripcionales más complejas.

Dado estos antecedentes, la diferencia entre los dominios de unión a ADN de FoxP1 y FoxP2 es la más interesante debido a su alta homología y sus funciones celulares solapantes. Ambos dominios de unión a ADN comparten un 88% de identidad de secuencia (64% de la secuencia completa de proteína), pero poseen drásticas diferencias al comparar su afinidad por la dimerización. Lo anterior es paradójico ya que estudios celulares reportan que tanto los homodímeros de FoxP1 y FoxP2 y el heterodímero FoxP1-FoxP2 participan en la regulación de genes blancos (Li y cols., 2004) relacionados al desarrollo esofágico y pulmonar (Shu y cols., 2007) y se co-expresan en áreas cerebrales específicas durante el desarrollo (Ferland y cols., 2003). Además se han descrito mutaciones en sus dominios de unión a ADN asociados a desórdenes cognitivos como por ejemplo a trastornos del lenguaje expresivo (Bacon y Rappold, 2012).

A pesar de estas propiedades en común, no hay estudios que especifiquen la interacción proteína-proteína que conlleva a la formación de heterodímeros y tampoco si el ADN estaría modulando esa interacción (Mendoza y Scharff, 2017), por lo que se desconoce cómo los heterodímeros de FoxP interaccionarían con las regiones regulatorias de sus genes blancos y el rol que tendría la dimerización por IdS en ello.

Con respecto a la caracterización biofísica *in vitro* de ambos dominios de unión a ADN, sólo se ha evaluado la estabilidad de los monómeros y la homodimerización vía IdS de FoxP1 (Chu y cols., 2011; Medina y cols., 2016) y FoxP2 (Perumal y cols., 2015). Esto deja abierta la posibilidad de explorar las propiedades de asociación vía intercambio de segmentos para la heterodimerización entre ambas proteínas. Aunque gran parte de la literatura respecto al IdS *in vitro* es sobre homodímeros, hay estudios que han demostrado que existe la heterodimerización mediada por IdS, como es el caso de la asociación de las proteínas ZO1-PDZ2 y ZO2-PDZ2. Estas proteínas participan en las uniones estrechas y forman dímeros entrelazados tanto *in vitro* como *in vivo*, formando homo- y heterodímeros debido a la alta conservación del dominio PDZ2 (68%) (Wu y cols., 2007). Esto permitiría sugerir –dado el porcentaje de identidad de secuencia y una estructura conservada– que la heterodimerización entre los dominios de FoxP1 y FoxP2 sería posible, al menos, *in vitro* (**Figura 1b**).

La mayoría de las proteínas FOX interacciona con su ADN blanco como monómeros, a través del dominio de unión a ADN “*forkhead*”, estructuralmente conservado entre sus miembros. En cuanto al rol del ADN en el IdS de FoxP, ensayos *in vitro* previos sólo han evaluado la estabilidad y afinidad de los monómeros de FoxP1 (Chu y cols., 2011) y FoxP2 por ADN (Morris y Fanucchi, 2016). Sin embargo, no se ha estudiado el potencial rol de este dominio en modular la interacción entre FoxP1 y FoxP2 considerando la gran diferencia en las propiedades de dimerización de ambas proteínas.

Diferentes estudios *in vitro* con otros modelos de heterodimerización han mostrado la relevancia del ADN. Tal es el caso de los factores de transcripción Fos y Jun, donde la presencia de ADN favorece la formación de heterodímeros (Kohler y Schepartz, 2001). Similar es el caso de la familia de factores de transcripción c-Myc, Max y Mad, donde el heterodímero Mac-c-Myc es el complejo con mayor afinidad de unión y velocidad de asociación, pero es el homodímero Max-Max el que se asocia con una mayor velocidad a ADN. Finalmente, se ha observado que la unión del primer monómero a ADN disminuye la afinidad por el segundo monómero en un orden de magnitud, independiente de si el dímero formado es homo- o heterodímero (Hu y cols., 2005).

Estos datos indican que la presencia de ADN puede tanto favorecer como desfavorecer la asociación y que este ligando podría generar un patrón de asociación diferencial en el contexto de formación de dímeros. Por lo tanto, la interacción con ADN podría modular la asociación vía intercambio de segmentos para la formación de heterodímeros entre los monómeros de FoxP1 y FoxP2 de la subfamilia FoxP.

HIPÓTESIS

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, se plantea la siguiente hipótesis:

“Los dominios *forkhead* de unión a ADN de los factores de transcripción FoxP1 y FoxP2 dimerizan *in vitro* formando heterodímeros, los cuales se ven favorecidos por la presencia de ADN”.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la heterodimerización entre el dominio de unión a ADN de FoxP1 y FoxP2, evaluando el efecto del ADN en el proceso de asociación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar biofísicamente el heterodímero por medio de estudios cinéticos para la obtención de los parámetros termodinámicos de activación.
- 2) Evaluar el efecto del ADN en la formación del heterodímero para determinar el rol del ligando en la modulación del IdS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Reactivos Químicos

- 2-mercaptoetanol, Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, EE. UU.)
- Ácido etilendiaminotetraacético, Merck (Darmstadt, Alemania)
- Clorhidrato de tris (hidroximetil) aminometano (Tris-HCl), Merck (Darmstadt, Alemania)
- Cloruro de guanidinio, Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EE. UU.)
- Cloruro de Sodio, Merck (Darmstadt, Alemania)
- Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, EE. UU.)
- Extracto de levadura, Merck (Darmstadt, Alemania)
- Fosfato dipotásico, Merck (Darmstadt, Alemania)
- Fosfato mono potásico, Merck (Darmstadt, Alemania)
- Glicerol, Merck (Darmstadt, Alemania)
- HEPES, Merck (Darmstadt, Alemania)
- Imidazol, Merck (Darmstadt, Alemania)
- Isopropil-b-D-tiogalactopiranosido (IPTG), Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, EE. UU.)
- Kanamicina Merck (Darmstadt, Alemania)
- Peptona de caseína (Tripton) Merck (Darmstadt, Alemania)
- Proteasa del virus del tabaco (TEV), Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile (Santiago, Chile).
- Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP), Merck (Darmstadt, Alemania)

Amortiguadores

- Amortiguador A (Tris-HCl pH 7,8 50 mM; NaCl 500 mM; β -mercaptoetanol 2 mM suplementado con imidazol 30 mM o 40 mM)
- Amortiguador B (Tris-HCl pH 7,8 50 mM; NaCl 500 mM; β -mercaptoetanol 2 mM, imidazol 500 mM)
- Amortiguador de trabajo (HEPES pH 7,8 20 mM, NaCl 150 mM, β -mercaptoetanol 2 mM)
- Amortiguador de ensayo (HEPES pH 7,8 20 mM; NaCl 20 mM; glicerol 5% v/v; β -Me 2 mM).

Medios de cultivo

- Luria-Bertani (LB) (Tryptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 170 mM)
- Terrific (TB) (Tryptona 12 g/L, extracto de levadura 24 g/L, KH₂PO₄/K₂HPO₄ 90 mM pH 7,8 y glicerol al 0,4 % v/v)

Columnas

- His-trapHP, GE Healthcare Bio-Sciences (Pittsburgh, Pensilvania, EE. UU.)
- Micro Bio-Spin V, Bio-Rad (Hercules, Pensilvania, EE. UU.)
- Superdex 75 Increase 10/300 GL, GE Healthcare Bio-Sciences (Pittsburgh, Pensilvania, EE.UU.)

Equipos

- Fluorímetro Jasco FP-8300, Jasco Inc (Easton, Pensilvania, EE. UU.)
- HPLC Waters 1525-2487, Waters Corporation (Milford, Massachusetts, EE. UU.)
- Centrifuga Eppendor 5810R, Eppendor (Hamburgo, Alemania)
- Centrifuga Sorval RC6+, Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EE. UU.)

Sistemas comerciales

- E.Z.N.A® Plasmid DNA mini kit I, OMEGA bio-teck (Norcross, Georgia, EE. UU.)

Tabla 1. Materiales Biológicos

Cepa y plásmidos usados en este trabajo.

Cepa y plásmidos	Descripción	Origen
<i>E. coli</i> BI21(DE3)-C41	Células de <i>E. coli</i> químicamente competentes usadas para expresión de proteínas. Presenta el gen que codifica la ARN polimerasa del fago T7 bajo el control de un promotor inducible por IPTG.	Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile (Santiago, Chile).
pET-TEV-sFoxP1 pET-TEV-sFoxP1-A39P pET-TEV-sFoxP1-N32C pET-TEV-sFoxP2	Plásmidos que contienen en su extremo N-terminal una etiqueta de polihistidina y el sitio de reconocimiento de la proteasa del virus del tabaco (TEV), junto con el dominio S de la RNasa A.	Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile (Santiago, Chile).

Tabla 2. Fluoróforos

Fluoróforos usados en este trabajo.

Fluoróforo	Descripción	Origen
Oregon Green 488	Sonda reactiva que posee un grupo maleimida que reacciona con las cisteínas de las proteínas.	Thermo Fisher Scientific, (Waltham, Massachusetts, EE. UU.)
Alexa 488	Sonda unida covalente en el extremo 3' con el oligonucleótido; 5'- CAAGGTAAACAA GACAACGTAAACAA-3'	Integrated DNA Technologies (Coralville, California, EE. UU.)

Tabla 3. Oligonucleótidos

Oligonucleótido usado en este trabajo

Oligonucleótidos	Descripción	Origen
5'- CAAGGTAAACAA GACAACGTAAACAA- 3'	ADN de doble hebra con la secuencia de consenso específica para la interacción con el dominio de unión a ADN de FoxP1 humano.	Integrated DNA Technologies (Coralville, California, EE. UU.)

Métodos

Inducción y purificación de las proteínas FoxP1 y FoxP2 y mutantes a partir de *E. coli* BI21(DE3)-C41

Para el cultivo de bacterias, se usaron 50 ml de medio Luria-Bertani suplementado con kanamicina 35 µg/mL, dejándose en agitación a 37°C durante toda la noche (12-16 h) para al día siguiente, inocular 25 o 50 ml en 1 o 2 L en medio Terrific respectivamente suplementado con kanamicina a la misma concentración. El medio inoculado se incubó a 37°C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de ~0,8 (para FoxP1 y las mutantes) o ~1,2 (para FoxP2) a 600 nm. Luego, se indujo la expresión agregando isopropil-b-D-tiogalactopiranosido (IPTG) para alcanzar una concentración 0,5 mM, continuando la incubación a 25°C durante toda la noche en agitación.

Tras la incubación, las bacterias fueron recolectadas por centrifugación a 6112.2 x g durante 15 min a 4°C. El sedimento obtenido, se resuspendió y homogeneizó en amortiguador A (suplementado con imidazol 30 mM [FoxP1 y sus mutantes] o 40 mM [FoxP2]). Luego, el contenido se lisó por sonicación y se centrifugó a 38465 x g a 4°C durante 20 min, recuperándose la fracción soluble, la cual fue cargada en una columna de afinidad a níquel His-trapHP (previamente equilibrada con el amortiguador antes mencionado. El contenido de la columna se lavó con 10 volúmenes de amortiguador A, y finalmente se eluyó el contenido aún unido a la columna usando una gradiente entre el amortiguador A y B.

A la fracción de eluido, que contiene la proteína de interés se añadió EDTA a una concentración final 1 mM y proteasa TEV a una relación 1:20 (mg TEV: mg de proteína total) para posteriormente incubarla toda la noche a 4°C en agitación. Esto último se realizó con el objetivo de remover la etiqueta de polihistidinas. El contenido finalmente fue centrifugado durante 15 min a 38465 x g a 4°C y el líquido sobrenadante se dializó contra amortiguador A durante 3 h para ser cargado en la columna Histrap previamente equilibrada para la obtención de la proteína de interés, colectándose en el frente de columna (fracción no unida a la matriz de la columna) y enriquecida con la proteína de interés.

Derivatización de muestras con fluoróforos

La mutante N32C del dominio de unión a ADN de FoxP1 posee un residuo de cisteína que permite su conjugación con la sonda Oregon Green 488. En primera instancia, para evitar la agregación durante la realización del protocolo, la solución de proteínas se suplementó con cloruro de guanidinio a una concentración final de 4M. Luego, se concentró hasta ~3mg/ml para ser incubada con 10 mM de agente reductor tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) a temperatura ambiente por 30 min, removiéndose posteriormente por columnas de exclusión molecular micro Bio-SpinV acorde a las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se procedió a concentrarla hasta ~100 μ M y se añadió la sonda disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 500 μ M, incubándose por 16 h en agitación a 4°C y protegida de la luz. La reacción de conjugación se detuvo con β -mercaptoetanol a una concentración de ~30 mM. El exceso de sonda no conjugada se removió por cromatografía de exclusión molecular usando la columna Superdex 75 Increase 10/300 GL (previamente equilibrada con amortiguador de trabajo (recuperando la fracción monomérica de la proteína. Finalmente, la concentración de proteína unida covalentemente a la sonda fluorescente se calculó de acuerdo con lo descrito por el proveedor del “Oregon Green 488 Protein labelling kit”.

La secuencia de ADN utilizada para los ensayos de asociación proteína-ADN contiene en el extremo 3' la sonda Alexa 488, previamente derivatizada por Integrated DNA Technologies, Inc.

Mediciones de anisotropía de fluorescencia

Para la medición de anisotropía de fluorescencia, se utilizó el fluorímetro Jasco FP-8300 equipado con una fuente de luz de Xenón y un *set* de polarizadores de excitación y de emisión. Para la recolección de datos, se usó el *software* provisto por el equipo que realiza el cálculo automático de la anisotropía observada (r), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$r = \frac{I_{\parallel} - GI_{\perp}}{I_{\parallel} + 2GI_{\perp}} \quad (1)$$

Donde I_{\parallel} e I_{\perp} corresponden a las intensidades de fluorescencia de emisión en los planos paralelo y perpendicular respectivamente, y G al factor de dispersión que permite corregir la distorsión en la emisión en cada plano dependiente de la longitud de onda. Para la sonda Oregon Green 488 (OG), las muestras se excitaron a 485 nm, registrándose la emisión a 525 nm y para la sonda Alexa 488 usada con ADN, las muestras se excitaron a 495 nm, registrándose la emisión a 520 nm.

Los resultados se analizaron usando el software ©GraphPad (San Diego, California, EE. UU.). Los datos de anisotropía fueron normalizados para ser posteriormente analizados en términos de la ecuación 2:

$$r = r_0 + (r_{max} - r_0)(1 - e^{-k_{obs}t}) \quad (2)$$

Donde r_0 es la anisotropía inicial y r_{max} es la anisotropía máxima alcanzada respectivamente a tiempo t infinito, y k_{obs} corresponde a la constante de velocidad observada.

Ensayos de cinéticas de asociación por anisotropía de fluorescencia

Para los ensayos de asociación entre proteínas se utilizó la mutante FoxP1-N32C derivatizada con OG (FoxP1-OG) a una concentración constante de ~200 nM, pre-incubada a 37°C durante 30 min en amortiguador de ensayo. Los ensayos se realizaron en duplicado a diferentes temperaturas (30, 33, 37, 40 y 42°C, $\pm 0,5^\circ\text{C}$), añadiéndose a la solución inicial de FoxP1-OG diferentes diluciones de proteína no derivatizada (FoxP1 o FoxP2) en un intervalo de ~1 a 50 veces la K_D de FoxP1 (~1 μM), procediendo de inmediato a su mezcla y al registro automático de la anisotropía observada (r) en intervalos de tiempo fijo (10 s) hasta alcanzar el equilibrio de cada reacción.

Para cada ensayo realizado se asumió que cualquier imprecisión al medir la concentración de proteína añadida, es pequeña con respecto a la variabilidad del eje Y, correspondiente a la anisotropía. Además, las réplicas de cada condición de ensayo se analizaron de forma independiente para la obtención de la constante de velocidad observada.

k_{obs} .

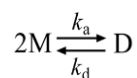
Ensayos de cinéticas de asociación en presencia de ADN

Previo a los ensayos de cinéticas de asociación en presencia de ADN es necesario evaluar la interacción de los monómeros con ADN bajo las condiciones de ensayo. Para ello se utilizó una secuencia de ADN ya derivatizada con el fluoróforo Alexa 488 en su extremo 3'). La unión proteína-ADN se evaluó por medio de titulación, ya que la reacción alcanza el equilibrio más rápido que el tiempo mínimo de medición del equipo (cada 10 s). Para ello, se dispuso en la cubeta de medición, una solución de ~400 nM de la secuencia de ADN derivatizada en amortiguador de ensayo, a la cual se le adicionaron alícuotas de proteína (FoxP1) hasta una razón proteína: ADN de 1:20 registrándose la anisotropía (r) observada tras cada adición hasta alcanzar el equilibrio.

Para evaluar el efecto del ADN en la asociación se utilizó el mismo procedimiento de los ensayos de cinéticas de asociación descritos previamente, pero con las siguientes diferencias: Primero, se procedió a pre-incubar FoxP1-OG con diferentes diluciones de ADN, en una razón proteína: ADN de 0 a 20 veces. Segundo, se añadió una concentración de 5 μ M de FoxP1 silvestre por cada ensayo, registrándose la anisotropía observada (r) en intervalos de tiempo fijo (10 s) hasta alcanzar el equilibrio para cada reacción.

Análisis cinético y termodinámico de los ensayos de cinéticas de asociación

Acorde a los principios de la ley de velocidad que permite relacionar la velocidad de una reacción con las concentraciones iniciales de reactivos presentes, los ensayos se realizaron con un exceso de concentración de proteína silvestre (FoxP1 o FoxP2) respecto a la concentración de proteína derivatizada FoxP1-OG, con el objetivo de asegurar que la reacción bimolecular fuera de pseudo-primer orden. El mecanismo de unión a seguir corresponde a un modelo simple de disociación de dos estados, acorde a la siguiente ecuación de velocidad:



donde M es el monómero y D es el dímero, representados por medio de una reacción reversible, donde k_a corresponde a la constante de velocidad de asociación y k_d corresponde a la constante de velocidad de disociación.

La razón entre las dos constantes de velocidad da como resultado la constante de disociación al equilibrio (K_D):

$$K_D = \frac{k_d}{k_a}$$

Bajo condiciones de pseudo-primer orden, existe una constante de velocidad observada, la cual se predice que como una función lineal de la concentración de proteína silvestre añadida, como se describe en (4):

$$k_{obs} = k_a \cdot [P] + k_d$$

Donde k_{obs} corresponde a la constante de velocidad observada y $[P]$, a la concentración de proteína no derivatizada añadida. Por ende, la regresión lineal simple de k_{obs} versus $[P]$ permite obtener la constante de velocidad de asociación k_a , y la constante de velocidad de disociación k_d . El análisis de regresión lineal asume que resultados dentro dos desviaciones estándar de la media se consideran significativos.

Al evaluar la cinética descrita en función de la temperatura, se obtienen los parámetros termodinámicos del complejo en el estado de transición. Esto es posible al evaluar la dependencia de la constante de velocidad con la temperatura utilizando la ecuación de Eyring (5), derivada de la ecuación de Arrhenius y la teoría del estado de transición (Gutfreund, 1995):

$$\ln \left(\frac{k}{T} \right) = \ln \left(\frac{k_B}{h} \right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} + \frac{\Delta H^\ddagger}{R}$$

donde k es la constante de velocidad determinada experimentalmente, T , es la temperatura en Kelvin, k_B , es la constante de Boltzman ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$), h , es la constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$) y R , es la constante de los gases ($8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$). Finalmente, ΔS^\ddagger y ΔH^\ddagger corresponden a la entropía de activación y entalpía de activación respectivamente, obtenidas tras el análisis gráfico de la ecuación de Eyring, permitiendo así, el cálculo de la energía libre de Gibbs (ΔG^\ddagger) del estado de transición:

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$$

RESULTADOS

Asociación entre los dominios de unión a ADN de la subfamilia FoxP

Del conjunto de proteínas que dimerizan vía IdS no existe una relación clara entre las funciones que ejecutan y el mecanismo por el cual intercambian segmentos. (Huang y cols., 2012). Por lo tanto, para abordar las características de dimerización de las proteínas FoxP es necesario entender cómo la asociación y disociación modulan la estabilidad del dímero y así, predecir la posible heterodimerización entre sus miembros.

Para estudiar las propiedades de dimerización, se evaluó la cinética de asociación usando FoxP1 derivatizada con el fluoróforo Oregon Green 488 (OG) en presencia de FoxP1 silvestre acorde a *Materiales y Métodos*. Para determinar si los cambios de anisotropía de fluorescencia permiten monitorizar la dimerización, se realizó un control con la mutante A39P de FoxP1, la cual se ha descrito como monómero obligado (**Figura 3**) (Chu y cols., 2011).

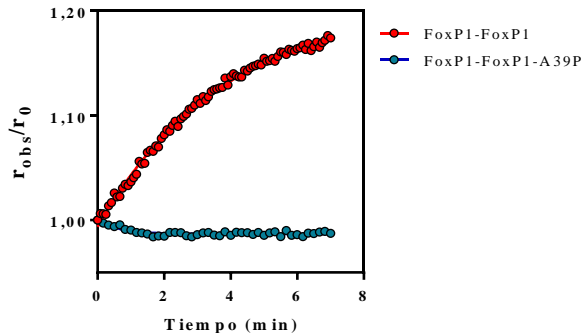


Figura 3.- Cinética de asociación para el homodímero de FoxP1 y su mutante A39P.

Anisotropía observada (r_{obs}) normalizada por la señal inicial (r_0) en función del tiempo (min). Se registró automáticamente la anisotropía de fluorescencia a intervalos de tiempo fijo tras la mezcla de FoxP1-OG (200 nM) con exceso de monómero FoxP1 silvestre (círculos rojos) o FoxP1-A39P (20 μ M) (círculos azules) a 37°C ($\pm 0,5$). Se presentan los datos acumulados para ambos ensayos en duplicados, en presencia de amortiguador de ensayo.

Los resultados de la indican la anisotropía en el tiempo de cada ensayo a 37°C (**Figura 3**). El ensayo realizado con la proteína FoxP1-A39P presentó valores de anisotropía en el tiempo que no dan cuenta de una reacción de unión (aumento esperado), indicando así que la proteína derivatizada y esta mutante no estarían formando dímeros bajo las condiciones ensayadas. Esto refleja el impedimento de FoxP1-A39P por dimerizar, incluso en presencia de la proteína silvestre. Adicionalmente, con el monómero de FoxP1 silvestre se observó un cambio de la anisotropía que sigue una tendencia de una exponencial simple, indicando así la asociación de las proteínas formando homodímeros. Acorde a estos primeros resultados, el seguimiento de los cambios temporales de anisotropía permite evaluar la dimerización de FoxP1 de manera específica bajo las condiciones de ensayo.

Considerando las condiciones de pseudo-primer orden del ensayo descrito previamente (*Materiales y Métodos*), se procedió a la caracterización cinética de la homodimerización de FoxP1 bajo las condiciones de ensayo. Para ello, es necesario determinar las constantes cinéticas de asociación (k_a) y de disociación (k_d) de este evento de dimerización. En primera instancia, se evaluó la dependencia de la cinética con la concentración de proteína silvestre añadida a la reacción, permitiendo así, la obtención de una constante de velocidad observada (k_{obs}).

Considerando la K_D reportada para la homodimerización de FoxP1 (Medina y cols., 2016 y 2019), se realizaron tres diluciones de FoxP1 silvestre en el intervalo de concentración de 2 hasta 7,5 μM (**Figura 4**). En cada uno de estos ensayos, la concentración de FoxP1-OG se mantuvo constante en 0,2 μM . Los valores de anisotropía obtenidos a intervalos de tiempo fijo fueron ajustados a una ecuación exponencial simple (*Materiales y Métodos*), permitiendo la obtención de las constantes de velocidad observadas (k_{obs}) por cada dilución (**Figura 4a**). El gráfico indica el cambio de magnitud de la k_{obs} en función de la concentración de FoxP1 a 37°C (**Figura 4b**), el cual se ajustó a un modelo de regresión lineal, obteniéndose las constantes cinéticas de asociación $k_a = 4,15 \pm 0,08 \times 10^4 \text{ (M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}\text{)}$ y la constante de disociación $k_d = 98 \pm 1 \times 10^{-3} \text{ (min}^{-1}\text{)}$.

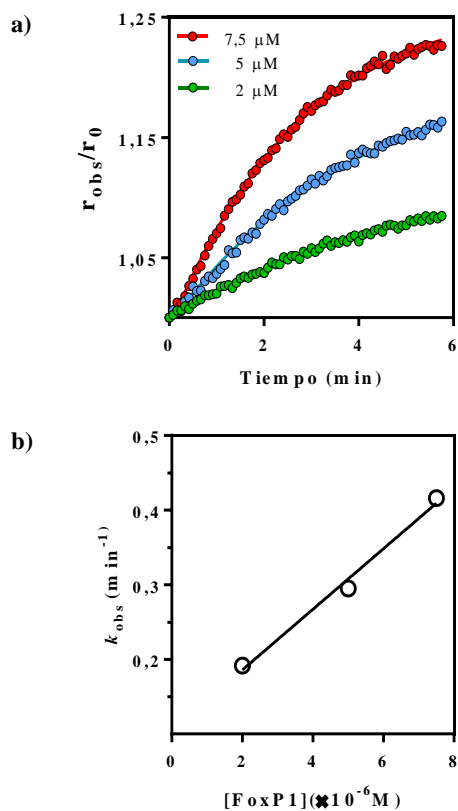


Figura 4.- Efecto de la concentración de FoxP1 en la cinética de asociación.

a) Cinética de asociación para el homodímero de FoxP1 a 37°. Anisotropía normalizada en función del tiempo (min). Se registró la anisotropía automáticamente en intervalos de tiempo fijo tras la mezcla de FoxP1-OG (200 nM) con un exceso de monómero de FoxP1 silvestre con tres diluciones: 2 μM (círculos verdes), 5 μM (círculos azules) y 7,5 μM (círculos rojos) en presencia de amortiguador de ensayo. Todos los ensayos se realizaron en duplicado. La línea continua representa el ajuste no lineal de los datos a un modelo de una exponencial simple.

b) Dependencia de la k_{obs} con FoxP1 silvestre. Constantes de velocidad observada k_{obs} en función de la concentración de monómero de FoxP1. La línea continua que conecta los datos representa al ajuste por regresión lineal, con un valor de pendiente correspondiente a $4,15 \pm 0,08 \times 10^4$ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) e intercepto de $98 \pm 1 \times 10^3$ (min^{-1}) con un $R^2=0,99$.

Dada la diferencia entre los valores de K_D para la homodimerización de FoxP1 (rango micromolar), en comparación con la homodimerización de FoxP2 (rango milimolar) (Medina y cols, 2016, 2019), se desconoce si la heterodimerización es posible y de ser así, cuáles serían sus características cinéticas y la afinidad de unión. Como primera aproximación para determinar la formación de heterodímeros, se evaluó su eventual formación en el orden de magnitud de concentración respecto a la homodimerización de FoxP1 (en el rango micromolar). La identidad de secuencia entre ambas proteínas permitiría inferir la posibilidad de la formación de heterodímeros.

Para la evaluar esta asociación se realizaron tres ensayos con diluciones de monómero de FoxP2 silvestre en un intervalo de concentración entre 10-25 μM a 37°C (**Figura 5a**). El cambio de anisotropía indica que la heterodimerización con FoxP1-OG ocurre bajo las condiciones ensayadas, similar a la homodimerización de FoxP1 (**Figura 4a**). En este caso, el valor de la constante cinética observada (k_{obs}) para cada concentración se grafica en la obteniendo por análisis de regresión lineal los valores de $k_a=0,38\pm0,02\times 10^4 (M^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$ y $k_d=193\pm8\times 10^{-3} (\text{min}^{-1})$ (**Figura 5b**). Estos resultados indican que a 37°C el heterodímero presenta una menor velocidad de asociación y una mayor velocidad de disociación respecto a los ensayos de homodimerización de FoxP1 (**Figura 4**), que permiten sugerir que la formación del homodímero de FoxP1 está más favorecida que la formación del heterodímero.

La obtención de las constantes de velocidad permite estimar la afinidad de unión de los monómeros mediante la constante de disociación (K_D). En el caso de la homodimerización de FoxP1 el valor de K_D es $2\pm0,2\times 10^{-6} \text{ M}$ y para la heterodimerización es $51\pm3\times 10^{-6} \text{ M}$. Al comparar el orden de magnitud de este valor para ambos tipos de dímeros, se observa que, a pesar de que la afinidad por la formación del heterodímero es menor a lo observado para el homodímero, es al menos dos órdenes de magnitud mayor a lo descrito para el homodímero de FoxP2 (Perumal, 2015).

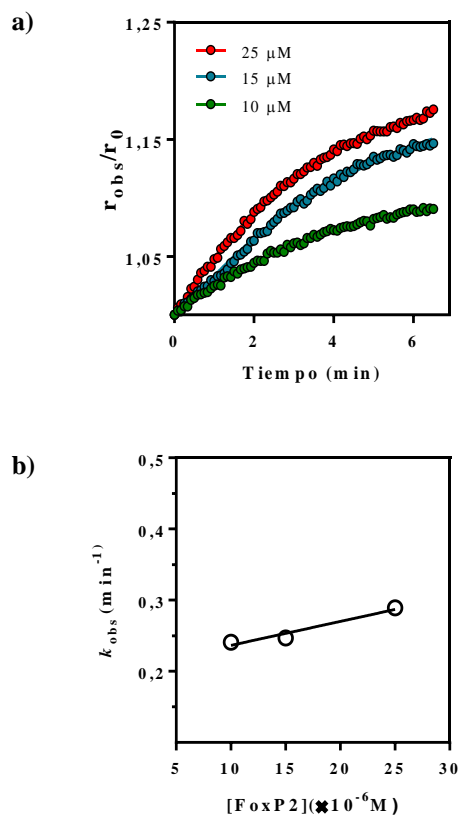


Figura 5.- Efecto de la concentración de FoxP2 en la cinética de asociación.

a) Cinética de asociación para el heterodímero (FoxP1-FoxP2) a 37°. Anisotropía normalizada en función del tiempo (min). Se registró la anisotropía automáticamente en intervalos de tiempo fijo tras la mezcla de FoxP1-OG (200 nM) con exceso de monómero de FoxP2 silvestre con tres diluciones; 10 μM (círculos verdes), 15 μM (círculos azules) y 25 μM (círculos rojos) en presencia de amortiguador de ensayo. Todos los ensayos se realizaron en duplicado. La línea continua representa el ajuste no lineal de los datos a un modelo de una exponencial simple.

b) Dependencia de la k_{obs} con FoxP2 silvestre. Constantes de velocidad observada k_{obs} (círculos blancos) en función de la concentración de monómero de FoxP2. La línea continua que conecta los datos representa al ajuste por regresión lineal, con un valor de pendiente correspondiente a $0,38 \pm 0,02 \times 10^4 (M^{-1} \cdot min^{-1})$ e intercepto de $193 \pm 0,8 \times 10^3 (min^{-1})$ con un $R^2=0,96$.

Caracterización del homodímero de FoxP1 y el heterodímero entre FoxP1-FoxP2.

Tras la obtención de los parámetros cinéticos se procedió a profundizar en la caracterización energética de las reacciones de asociación y disociación de ambos dímeros (FoxP1-FoxP1 y FoxP1-FoxP2), considerando que la heterodimerización (FoxP1-FoxP2) ocurre bajo las condiciones de ensayo descritas, y que existen diferencias cinéticas y de afinidad con respecto a la homodimerización de FoxP1. Para ello, es necesario obtener tanto la contribución entálpica como entrópica de estos eventos que permitan dilucidar los aspectos moleculares y energéticos que expliquen las diferencias observadas.

Se evaluó, por lo tanto, la dependencia de las constantes de velocidad con la temperatura, realizando ensayos de asociación a 30, 33, 37, 40 y 42°C. En el caso de la homodimerización (**Figura 6**), se evaluó la asociación con tres diluciones en duplicado de proteína silvestre FoxP1 por cada temperatura en el rango de 9 hasta 13µM. A su vez en la heterodimerización (**Figura 7**) se evaluó la asociación usando tres diluciones en duplicado de cada proteína silvestre FoxP2 por temperatura en el rango de 10 hasta 40 µM. De estos ensayos, se obtuvieron las constantes de velocidad de asociación (k_a) y la constante de velocidad de disociación (k_d) detalladas en la **Tabla 4**. Acorde a esto, se aprecia que la constante cinética de asociación (k_a) para la heterodimerización en el intervalo de temperaturas ensayado es menor respecto a la k_a de la homodimerización de FoxP1, a diferencia de la constante de disociación (k_d) que es mayor para la heterodimerización.

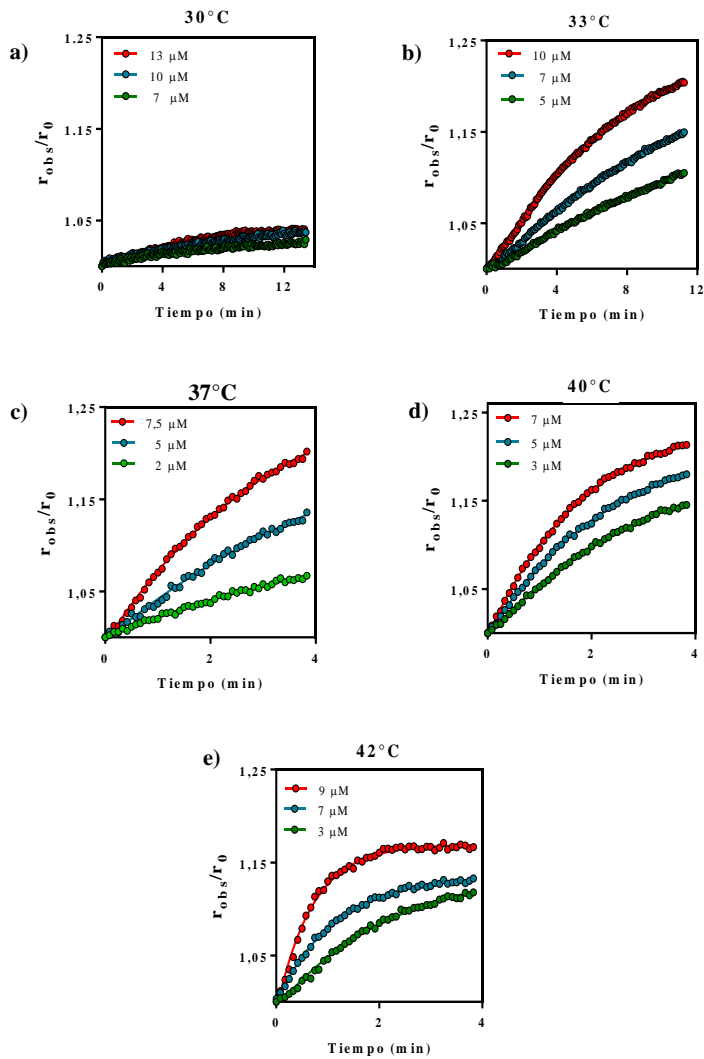


Figura 6- Efecto de la temperatura en la cinética de asociación para el homodímero de FoxP1. Cinéticas de asociación a diferentes temperaturas. Anisotropía normalizada en función del tiempo (min). Se registró la anisotropía automáticamente tras la mezcla de FoxP1-OG (200nM) con exceso de monómero de FoxP1 silvestre en un intervalo de diluciones de 1 μM hasta 13 μM . Los ensayos se realizaron a cinco temperaturas 30°C (a), 33°C(b), 37°C(c), 40°C(d) y 42°C(e) en presencia de amortiguador de ensayo. Todos los ensayos se realizaron en duplicado. La línea continua representa el ajuste no lineal de los datos al modelo de una curva exponencial simple.

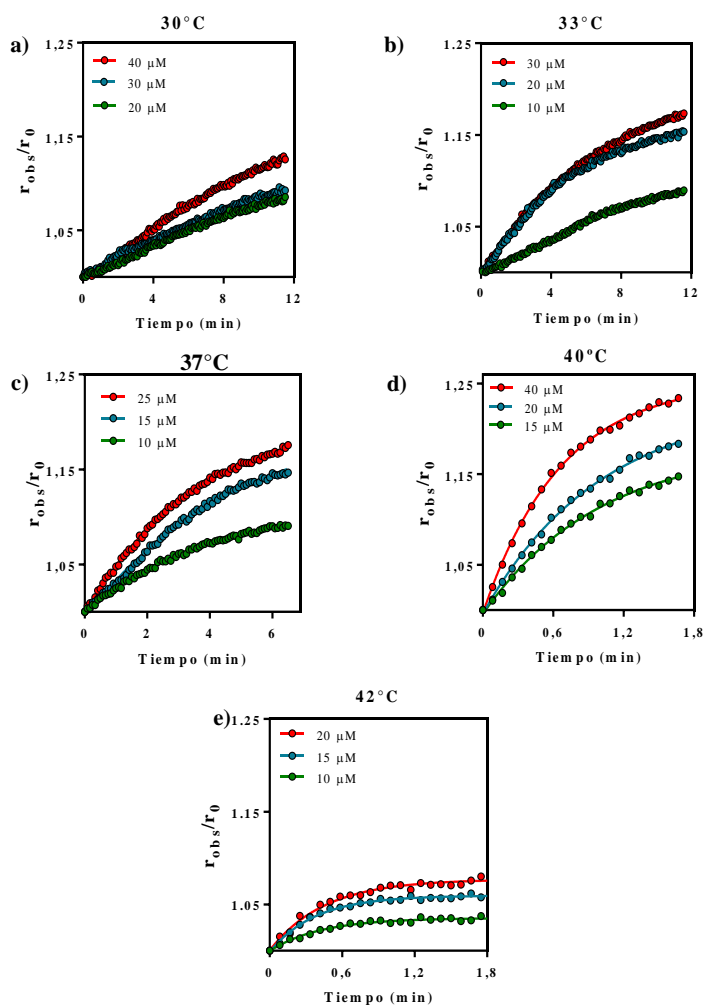


Figura 7.- Efecto de la temperatura en la cinética de asociación para el heterodímero.

Cinéticas de asociación a diferentes temperaturas. Anisotropía normalizada en función del tiempo (min). Se registró la anisotropía automáticamente tras la mezcla de FoxP1-OG (200nM) con exceso de FoxP2 silvestre en un intervalo de diluciones de 10 μ M hasta 40 μ M en presencia de amortiguador de ensayo. Los ensayos se realizaron a cinco temperaturas **30°C (a)**, **33°C (b)**, **37°C (c)**, **40°C (d)** y **42°C (e)** en presencia de amortiguador de ensayo. Todos los ensayos se realizaron en duplicado. La línea continua representa el ajuste no lineal de los datos al modelo de una curva exponencial simple.

Tabla 4. Efecto de la temperatura en la cinética de asociación para el homodímero de FoxP1 y el heterodímero FoxP1-FoxP2.

<i>T</i>[•] (±0,5°C)	<i>k_a</i>^a (M ⁻¹ · min ⁻¹) × 10 ⁴		<i>k_d</i>^a (min ⁻¹) × 10 ⁻³		<i>K_D</i>^b (× 10 ⁻⁶ M)	
	<i>Homodímero</i>	<i>Heterodímero</i>	<i>Homodímero</i>	<i>Heterodímero</i>	<i>Homodímero</i>	<i>Heterodímero</i>
	30	0,8±0,04	0,15±0,02	3,1±0,1	30±5,6	0,4 0,02
33	1,09±0,23	0,25±0,05	16±0,5	69,45±4,4	1,5±3,1	27,8±5,8
37	4,15±0,08	0,38±0,02	98 ±1,0	193,6±0,8	2,4±0,5	51±2,7
40	5,77±0,24	1,20±0,14	135±10	987±3	2,3±0,2	82.3±9,6
42	7,70±0,57	1,64±0,22	248±34	2288±22	3,2±0,5	140±19

^a Constantes cinéticas de asociación (*k_a*) y de disociación (*k_d*) resultantes de la regresión lineal de las constantes observadas (*k_{obs}*) obtenidas a partir de las cinéticas de asociación del homodímero (**Figura 5**) y del heterodímero (**Figura 6**) a cada temperatura.

^b Constantes de disociación al equilibrio (*K_D*) determinada por ecuación 4 en *materiales y métodos*.

Teniendo en cuentas las diferencias descritas, se procedió a la caracterización energética de ambos procesos (de asociación y disociación), utilizando la aproximación de Eyring. Este análisis permite determinar la dependencia de la velocidad de ambas reacciones con respecto a la temperatura y por tanto obtener los parámetros termodinámicos de activación (entalpía y entropía) que definen los aspectos energéticos de ambas reacciones respecto al estado de transición (ET). Para ello, se evaluaron las constantes cinéticas en función de la ecuación 6 de *materiales y métodos*.

A partir del análisis gráfico de la ecuación de Eyring se pueden obtener los parámetros termodinámicos de entalpía (ΔH^\ddagger) y entropía (ΔS^\ddagger) de activación para las reacciones de asociación y disociación (**Figura 8**). Según los resultados, la entalpía de activación de asociación (ΔH_a^\ddagger) para el homodímero es $33 \pm 4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, mientras que para el heterodímero es $37 \pm 4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, a diferencia del cambio de entalpía de disociación (ΔH_d^\ddagger), que para el homodímero corresponde a $69 \pm 7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ y para el heterodímero corresponde a $67 \pm 6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Estos resultados indican que la entalpía de activación para la heterodimerización es aproximadamente $4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ mayor que la homodimerización, mientras que, para la disociación, la entalpía del homodímero es aproximadamente $2 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ mayor a la entalpía del heterodímero. Por lo tanto, la heterodimerización requiere mayor energía para alcanzar el ET respecto a la homodimerización FoxP1, a diferencia de la disociación, donde el requerimiento energético es mayor para el homodímero de FoxP1.

Con respecto al cambio en la entropía de activación, las entropías de asociación (ΔS_a^\ddagger) son $0,06 \pm 0,01 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ y $0,07 \pm 0,01 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ para la homo- y heterodimerización, respectivamente, a diferencia del cambio de entropía de disociación (ΔS_d^\ddagger), que para ambos dímeros corresponde a $0,15 \pm 0,02 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$. Acorde a estos resultados, no se aprecian cambios significativos que permitan distinguir la reacción de dimerización, ni la reacción de disociación entre el heterodímero y la homodimerización de FoxP1 en términos entrópicos.

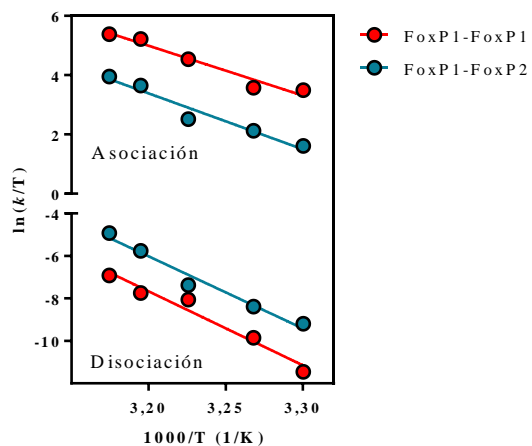


Figura 8.-Análisis de Eyring para la asociación y disociación del homodímero de FoxP1 y el heterodímero.

Gráficos de Eyring que expresan la dependencia de $\ln(k/T)$ con el inverso de la temperatura ($1/K$) para la asociación (sección superior del gráfico) y disociación (sección inferior del gráfico) para el homodímero de FoxP1 (círculos rojos) y el heterodímero FoxP1-FoxP2 (círculos azules). La línea continua que conecta los datos representa al ajuste por regresión lineal para la determinación de los parámetros termodinámicos de activación acorde a lo descrito en *Materiales y Métodos*. Para el homodímero: $\Delta H_a^\ddagger = 33 \pm 4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$; $\Delta S_a^\ddagger = 0,06 \pm 0,01 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ y $R^2 = 0,96$ (asociación) y $\Delta H_d^\ddagger = 69 \pm 7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$; $\Delta S_d^\ddagger = 0,15 \pm 0,02 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ y $R^2 = 0,97$ (disociación). Para el heterodímero: $\Delta H_a^\ddagger = 37 \pm 4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$; $\Delta S_a^\ddagger = 0,07 \pm 0,01 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ y $R^2 = 0,95$ (asociación) y $\Delta H_d^\ddagger = 67 \pm 6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$; $\Delta S_d^\ddagger = 0,16 \pm 0,02 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ y $R^2 = 0,97$ (disociación).

Cinética de asociación del homodímero de FoxP1 en presencia de ADN.

Tal como se ha manifestado anteriormente, la interacción con el(los) ligando(s) puede ser fundamental en el proceso de formación de dímeros entrelazados. En el caso de la subfamilia FoxP, la interacción con ADN podría modular la asociación entre FoxP1 y FoxP2. Para determinar la influencia del ADN en la asociación, se procedió en primera instancia a evaluar la asociación entre FoxP1 y un oligonucleótido que interactúa específicamente con el dominio de unión a ADN de esta proteína (Koh y cols., 2009). Para ello, se realizó un ensayo de titulación entre el monómero de FoxP1 silvestre y ADN de doble hebra correspondiente a la secuencia específica de unión para FoxP1 (*materiales y métodos*), el cual está derivatizado con fluoróforo. La **Figura 9** muestra el cambio de anisotropía para el ADN en función de la adición de FoxP1, que en el ensayo está a una concentración de 400 nM. La tendencia de los valores obtenidos indica una estabilización de la anisotropía a los ~400 nM de concentración total de FoxP1 silvestre, dando cuenta de una interacción estequiométrica entre la proteína y el ADN en razón 1:1.

Como segunda aproximación, se procedió a evaluar la cinética de asociación del homodímero de FoxP1 en presencia de ADN de diferentes concentraciones de ADN no derivatizado. En la **Figura 10a** se muestran los ensayos de asociación para el homodímero sin ADN y a diferentes razones ADN: proteína, mientras que en la **Figura 10b** se muestra la variación de k_{obs} con la razón ADN: proteína.

Acorde a lo anterior, a medida que aumenta la concentración de ADN se observa una disminución en la anisotropía al alcanzar el equilibrio, lo cual indica que la presencia de ADN disminuye la fracción de dímero de FoxP1. Al evaluar el cambio en la k_{obs} (**Figura 10b**), se observa que disminuye en aproximadamente 1,5 veces cuando la razón ADN: proteína es 1 en comparación a la reacción de asociación sin la presencia de ADN, no observando ni fracción de dímero (y, por tanto, k_{obs}) cuando la razón de ADN: proteína es superior a 1. De acuerdo con lo observado se podría sugerir que el ADN disminuye la capacidad de unión entre los monómeros de FoxP1 en las condiciones ensayadas.

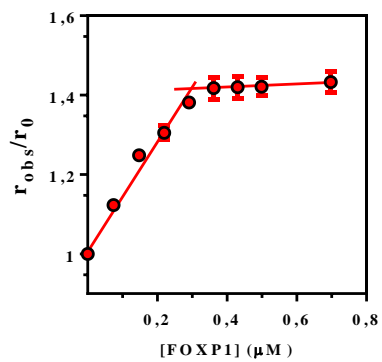


Figura 9.-Interacción entre ADN y monómero de FoxP1 silvestre.

Anisotropía observada (r_{obs}) normalizada por la señal inicial (r_0) en función de la concentración de monómero FoxP1 silvestre. Se dispuso de ~ 400 nM de ADN derivatizado en amortiguador de ensayo, al cual, se le adicionaron alícuotas de FoxP1 silvestre. Las líneas rectas que conectan los datos (círculos rojos) representan la relación estequiométrica entre proteína: ADN.

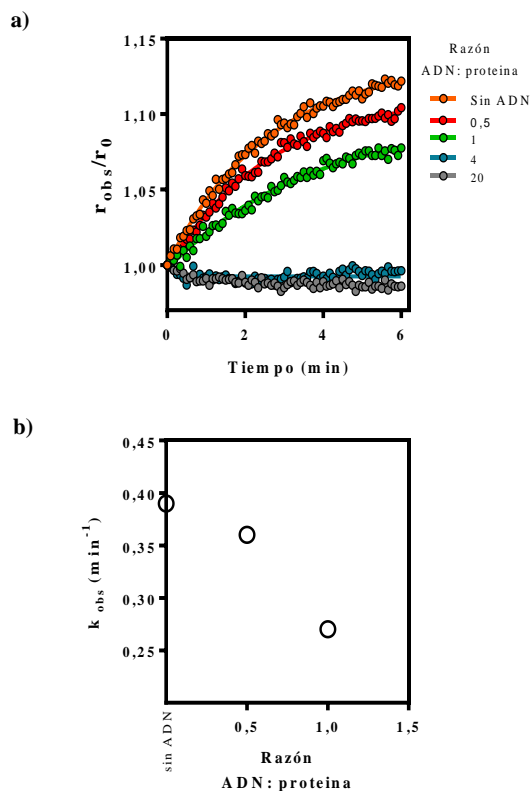


Figura 10.- Efecto del ADN en la cinética de asociación del homodímero a 37°C.

a) Anisotropía observada (r_{obs}) normalizada por la señal inicial (r_0) en función del tiempo (min). Se registró la anisotropía de fluorescencia a intervalos de tiempo fijo tras la mezcla de FoxP1-OG (200nM) pre incubado con diferentes concentraciones ADN con $5 \mu\text{M}$ de monómero FoxP1 silvestre. De menor a mayor razón ADN: proteína; Sin ADN (círculos naranjos); ADN: proteína= 0,5 (círculos rojos); ADN: proteína= 1 (círculos verdes); ADN: proteína= 4 (círculos azules); ADN: proteína= 20 (círculos grises).

b) Dependencia de la k_{obs} en presencia de ADN. Constantes de velocidad observada k_{obs} (círculos blancos) de la asociación del homodímero en función de la razón ADN: proteína.

DISCUSIÓN

Considerando que la asociación entre FoxP1 y FoxP2 no ha sido caracterizada *in vitro*, en este trabajo de tesis se evaluó la asociación entre los dominios de unión a ADN de FoxP1 y FoxP2. Para ello, se abordaron los aspectos cinéticos y termodinámicos que diferencian el evento de homodimerización de FoxP1 con la heterodimerización. Junto con esto, se estudió el rol de la interacción con ADN en el evento de asociación de estas proteínas.

Mediante ensayos de anisotropía de fluorescencia fue posible evaluar la formación de dímero entre los dominios de unión a ADN entre FoxP1 y FoxP2. A partir de los resultados obtenidos se pudo observar la formación de heterodímeros *in vitro* y en condiciones notablemente diferentes comparadas con la homodimerización de FoxP2 (Perumal, 2015). Esto, debido a que los parámetros obtenidos tras los ensayos realizados a 37°C (**Figuras 4 y 5**) están en el mismo orden de magnitud que los de la homodimerización de FoxP1, por lo que dan cuenta de un valor de K_D de cerca ~ 3 órdenes de magnitud menor a lo obtenido para FoxP2. A pesar de que en primera instancia el comportamiento del heterodímero podría no ser el esperado (ya que las propiedades de FoxP1 y FoxP2 son muy diferentes), es la dinámica estructural del dominio de unión a ADN de FoxP1 la que podría tener un fuerte impacto sobre FoxP2, ya que, de acuerdo a reportes de nuestro laboratorio, la presencia de regiones intrínsecamente desordenadas que facilitan el intercambio de segmentos (Medina y cols, 2020) en FoxP1 podrían cumplir un rol preponderante en la heterodimerización. Esto indica que diferencias en la identidad de secuencia promueven cambios en la dinámica de interacción entre ambas proteínas, que podrían reflejarse en las propiedades de asociación (cinética y termodinámica).

Con el objetivo de obtener los parámetros cinéticos y, por tanto, termodinámicos del proceso de heterodimerización, se procedió a evaluar la asociación en función de la temperatura (**Figuras 6 y 7**). Acorde a los resultados obtenidos, se aprecian diferencias en las constantes cinéticas k_{on} y k_{off} (**Tabla 4**). En estos, la homodimerización presenta valores de k_{on} entre 4 a 10 veces superior a la heterodimerización, indicando que la asociación está favorecida para el homodímero de FoxP1 en el intervalo de temperaturas. Por otro lado, el

evento de disociación está favorecido de 2 hasta 10 veces más en la heterodimerización con respecto a la homodimerización. Este fenómeno podría relacionarse, con las interacciones no covalentes que estarían optimizadas en el homodímero de FoxP1 a diferencia de lo que ocurriría en el heterodímero donde las diferencias en ciertos residuos de aminoácidos podrían impactar en la optimización de estas interacciones. Por su parte, que el heterodímero posea una menor k_{on} se podría atribuir además a una mayor energía requerida para desestabilizar los contactos propios del monómero de FoxP2, así como posibles cambios conformacionales que debe experimentar para dimerizar (Schreiber y cols., 2009). Lo anterior puede ser fundamentado tras el análisis de los parámetros cinéticos bajo la aproximación del pseudo equilibrio de Eyring para determinar (a partir de las barreras energéticas) cuáles son las propiedades del estado de transición (ET) en el homodímero de FoxP1 y heterodímero.

Las entalpías de activación de los dímeros (**Figura 8**) indican una diferencia en la entalpía de disociación (ΔH_d^\ddagger) de $\sim 2 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ mayor para el homodímero, lo que se puede relacionar con la mayor cantidad de contactos que deben romperse en relación con el heterodímero para alcanzar el ET. Por otro lado, la diferencia en la entalpía de asociación (ΔH_a^\ddagger) observada ($\sim 4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) mayor para el heterodímero sugieren que FoxP2 requiere romper aquellas interacciones que estabilizan su monómero para alcanzar el ET. Por lo tanto, los resultados entálpicos obtenidos permiten dilucidar los requerimientos energéticos de la heterodimerización en comparación a la homodimerización de FoxP1.

Al comparar la asociación de FoxP1 con modelos clásicos de IdS, se aprecian diferencias significativas. En el caso de la proteína cianovirina-N, se reportó un valor de $k_{d=}$ $8.2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ a 52°C y $K_D=15,3\text{mM}$ a 19°C por lo que su entalpía de activación para la asociación es de $\sim 600 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, mientras que para la disociación es de $\sim 650 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, siendo estas barreras unas 16 veces mayor respecto al homo- y heterodímero estudiados en este trabajo (Liu y cols., 2012). Esto da cuenta de la optimización en la dinámica de asociación de FoxP1 (y disociación) y su potencial rol en la regulación transcripcional en un contexto celular donde se requieren complejos transitorios y/o que se vean estabilizados por la asociación con otras proteínas.

Considerando la caracterización energética de este trabajo, sería importante evaluar aquellos residuos que podrían ser preponderantes en la estabilidad del dímero FoxP1-FoxP2 y en su energía de interacción. Acorde a esto, se han reportado “*hot spot residues*” que corresponden a residuos ubicados en o cerca de sitios de interacción y que pueden cambiar los valores de k_{on} y k_{off} de forma específica (Schreiber, 2002), pudiendo influir en la formación del ET.

Respeto a la contribución entrópica, es complejo otorgar una interpretación molecular certera que justifique los cambios observados en ambas dimerizaciones, ya que, eventos como cambios estructurales, flexibilidad de las proteínas y reordenamiento del solvente deben tenerse en consideración (Fox y cols., 2018). Acorde a esto, los cambios de entropía tanto para la reacción de asociación como la de disociación se podrían relacionar con la libertad conformacional de FoxP1 (sin descartar otros factores) ya que al ser similares los valores de entropía entre ambas dimerizaciones no se puede diferenciar la contribución del monómero FoxP2 al proceso.

Entre los factores que controlan la velocidad de las reacciones se encuentran la interacción con ligandos. En este trabajo se evaluó el efecto del ADN en la homodimerización de FoxP1. Los resultados observados en las **figuras 10a** y **10b** indican que la velocidad de asociación del monómero de FoxP1 disminuye progresivamente en función del aumento de la concentración de ADN. Esto permite sugerir la estabilización de la fracción monomérica, a través de un complejo monómero-ADN en desmedro de la dimerización. En esta ocasión solo se pudo evaluar la homodimerización en presencia de ADN, pero es posible extrapolar este resultado en el contexto del heterodímero, ya que acorde a esta premisa, la estabilización monómero-ADN no facilitaría la unión de un segundo monómero, independiente si es FoxP1 o FoxP2. Una de las causas que permitirían explicar la estabilización de la proteína tras la unión a ADN son los cambios a nivel estructural tanto de los sitios de reconocimiento y unión a ADN como también del resto del monómero de FoxP1 tras la interacción con ADN, considerando además la estabilización producto de las interacciones electrostáticas que se forman (Van Der Vaart, 2015).

Estudios en FoxP2 indican que la unión del monómero a ADN implica un reordenamiento de estructura terciaria acompañado por una disminución en la flexibilidad de la proteína, aunque, la extensión de este cambio estructural dependería de la afinidad de unión a la secuencia (Webb y cols., 2017). Por lo tanto, sería relevante evaluar si el ADN estabilizará el heterodímero ya formado, permitiendo así, dilucidar el mecanismo de unión entre ambas proteínas en presencia de ADN.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis afirman que la cinética de estas proteínas ocurre en tiempos y condiciones biológicamente relevantes. Acorde a esto se pueden formar homodímeros de FoxP1 y heterodímeros FoxP1-FoxP2 con una dinámica que permite su rápida asociación y disociación. Las características obtenidas en este trabajo dan cuenta del potencial rol del IdS en la regulación transcripcional de estas proteínas. Junto con esto, la interacción con ADN añadiría otro nivel de complejidad en esta regulación a nivel celular, por lo que la relación entre la dinámica estructural, el mecanismo de asociación y la interacción con ligandos son fenómenos concertados que reflejan la complejidad del mecanismo de acción de estos factores de transcripción.

CONCLUSIONES

- FoxP1 y FoxP2 forman heterodímeros *in vitro* con una afinidad 1.000 veces mayor al homodímero de FoxP2, y cerca de 15 veces menor al homodímero de FoxP1.
- Las diferencias entre la heterodimerización y la homodimerización de FoxP1 obedecen a una mayor entalpía de activación en la asociación y una menor entalpía de activación de la disociación.
- El ADN disminuye la velocidad de homodimerización de FoxP1 tras la formación del complejo monómero-ADN, por lo que este ligando favorece la estabilidad de la fracción monomérica y no facilita la interconversión hacia el estado dimérico, a diferencia de lo planteado inicialmente en la hipótesis de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, Bruce. (2015). *Journal of Chemical Information and Modeling Molecular Biology of the Cell*. Sixth. New York, NY.
- Anfinsen, C. B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, *181*(4096), 223-230.
- Bacon, C., & Rappold, G. A. (2012). The distinct and overlapping phenotypic spectra of FOXP1 and FOXP2 in cognitive disorders. *Human Genetics*, *131*(11), 1687-1698.
- Bandukwala, H. S., Wu, Y., Feuerer, M., Chen, Y., Barboza, B., Ghosh, S., & Chen, L. (2011). Structure of a domain-swapped FOXP3 dimer on DNA and its function in regulatory T cells. *Immunity*, *34*(4), 479-491.
- Chu, Y. P., Chang, C. H., Shiu, J. H., Chang, Y. T., Chen, C. Y., & Chuang, W. J. (2011). Solution structure and backbone dynamics of the DNA-binding domain of FOXP1: Insight into its domain swapping and DNA binding. *Protein Science*, *20*(5), 908-924.
- Ferland, R. J., Cherry, T. J., Preware, P. O., Morrisey, E. E., & Walsh, C. A. (2003). Characterization of Foxp2 and Foxp1 mRNA and protein in the developing and mature brain. *Journal of Comparative Neurology (JCN)*, *460*(2), 266-279.
- Gutfreund, H. (1995). *Kinetics for the Life Sciences*. Cambridge University Press.
- Hu, J., Banerjee, A., & Goss, D. J. (2005). Assembly of b/HLH/z Proteins c-Myc, Max, and Mad1 with Cognate DNA: Importance of Protein-Protein and Protein-DNA Interactions. *Biochemistry*, *44*(35), 11855-11863.
- Huang, Y., Cao, H., & Liu, Z. (2012). Three-dimensional domain swapping in the protein structure space. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *80*(6), 1610-1619.
- Koh, K. P., Sundrud, M. S., & Rao, A. (2009). Domain requirements and sequence specificity of DNA binding for the forkhead transcription factor FOXP3. *PLoS One*, *4*(12), e8109.
- Kohler, J. J., & Schepartz, A. (2001). Kinetic studies of fos-jun-DNA complex formation: DNA binding prior to dimerization. *Biochemistry*, *40*(1), 130-142.
- Li, S., Weidenfeld, J., & Morrisey, E. E. (2004). Transcriptional and DNA binding activity of the Foxp1/2/4 family is modulated by heterotypic and homotypic protein interactions. *Molecular and Cellular Biology (MCB)*, *24*(2), 809-822.
- Liu, L., Byeon, I. J. L., Bahar, I., & Gronenborn, A. M. (2012). Domain swapping proceeds via complete unfolding: a 19F- and 1H-NMR study of the Cyanovirin-N protein. *Journal of the American Chemical Society (JACS)*, *134*(9), 4229-4235.
- Liu, Y., & Eisenberg, D. (2002). 3D domain swapping: as domains continue to swap. *Protein Science*, *11*(6), 1285-1299.
- Medina, E., Córdova, C., Villalobos, P., Reyes, J., Komives, E. A., Ramírez-Sarmiento, C. A., & Babul, J. (2016). Three-Dimensional domain swapping changes the Folding mechanism of the Forkhead domain of FoxP1. *Biophysical Journal*, *110*(11), 2349-2360.
- Medina, E., Villalobos, P., Coñuecar, R., Ramírez-Sarmiento, C. A., & Babul, J. (2019). The protonation state of an evolutionarily conserved histidine modulates domain swapping stability of FoxP1. *Scientific Reports*, *9*(1), 1-11.
- Medina, E., Villalobos, P., Hamilton, G. L., Komives, E. A., Sanabria, H., Ramírez-Sarmiento, C. A., & Babul, J. (2020). Intrinsically Disordered Regions of the DNA-Binding Domain of Human FoxP1 Facilitate Domain Swapping. *Journal of Molecular Biology (JMB)*, *432*(19), 5411-5429.

- Mei, G., Di Venere, A., Rosato, N., & Finazzi-Agrò, A. (2005). The importance of being dimeric. *The FEBS Journal*, 272(1), 16-27.
- Mendoza, E., & Scharff, C. (2017). Protein-Protein interaction among the FoxP family members and their regulation of two target genes, VLDLR and CNTNAP2 in the Zebra Finch Song System. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, 112.
- Morris, G., & Fanucchi, S. (2016). A key evolutionary mutation enhances DNA binding of the FOXP2 forkhead domain. *Biochemistry*, 55(13), 1959-1967.
- Newcomer, M. E. (2002). Protein folding and three-dimensional domain swapping: a strained relationship?. *Current Opinion in Structural Biology*, 12(1), 48-53.
- Nooren, I. M., & Thornton, J. M. (2003). Diversity of protein-protein interactions. *The EMBO journal*, 22(14), 3486-3492.
- Panca, R., Raimondi, D., Cilia, E., & Vranken, W. F. (2016). Early folding events, local interactions, and conservation of protein backbone rigidity. *Biophysical Journal*, 110(3), 572-583.
- Perumal, K., Dirr, H. W., & Fanucchi, S. (2015). A single amino acid in the hinge loop region of the FOXP forkhead domain is significant for dimerisation. *The Protein Journal*, 34(2), 111-121.
- Rousseau, F., Schymkowitz, J. W. H., del Pino, M. S., & Itzhaki, L. S. (1998). Stability and folding of the cell cycle regulatory protein, p13suc1. *Journal of Molecular Biology (JMB)*, 284(2), 503-519.
- Rousseau, F., Schymkowitz, J. W. H., Wilkinson, H. R., & Itzhaki, L. S. (2001). Three-dimensional domain swapping in p13suc1 occurs in the unfolded state and is controlled by conserved proline residues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(10), 5596-5601.
- Schreiber, G., Haran, G., & Zhou, H. X. (2009). Fundamental aspects of protein-protein association kinetics. *Chemical Reviews*, 109(3), 839-860.
- Schreiber, G. (2002). Kinetic studies of protein-protein interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, 12(1), 41-47.
- Shu, W., Lu, M. M., Zhang, Y., Tucker, P. W., Zhou, D., & Morrisey, E. E. (2007). Foxp2 and Foxp1 cooperatively regulate lung and esophagus development. *Development*, 134(10), 1991-2000.
- Stroud, J. C., Wu, Y., Bates, D. L., Han, A., Nowick, K., Paabo, S., ... & Chen, L. (2006). Structure of the forkhead domain of FOXP2 bound to DNA. *Structure*, 14(1), 159-166.
- Van der Avert, A. (2015). Coupled binding-bending-folding: The complex conformational dynamics of protein-DNA binding studied by atomistic molecular dynamics simulations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1850(5), 1091-1098.
- Webb, H., Steeb, O., Blane, A., Rotherham, L., Aron, S., Machanick, P. & Fanucchi, S. (2017). The FOXP2 forkhead domain binds to a variety of DNA sequences with different rates and affinities. *The Journal of Biochemistry*, 162(1), 45-54.
- Woodbury, C. P. (2007). Introduction to macromolecular binding equilibria. *CRC Press*.
- Wu, J., Yang, Y., Zhang, J., Ji, P., Du, W., Jiang, P., & Shi, Y. (2007). Domain-swapped dimerization of the second PDZ domain of ZO2 may provide a structural basis for the polymerization of claudins. *Journal of Biological Chemistry (JBC)*, 282(49), 35988-35999.