

Tesis Doctoral

Estudio del plegado proteico: la β -lactamasa

Santos, Javier

2004

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Santos, Javier. (2004). Estudio del plegado proteico: la β -lactamasa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3745_Santos

Cita tipo Chicago:

Santos, Javier. "Estudio del plegado proteico: la β -lactamasa". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2004.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3745_Santos

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y
Naturales

Universidad Nacional de Quilmes

TESIS DOCTORAL

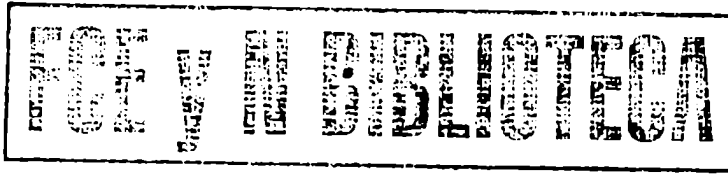
LIC. JAVIER SANTOS

**Estudio del plegado proteico:
la β -lactamasa**

Director Dr. Mario R. Ermácora

Consejero Dr. Alberto R. Kornblihtt

2004



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y
Naturales

Departamento de Ciencia y Tecnología
Universidad Nacional de Quilmes

Estudio del plegado proteico: la β -lactamasa

3745'

Javier Santos

2004

TITULO:

Estudio del plegado proteico: la β -lactamasa

Protein folding study: β -lactamase

Palabras Clave:

Folding. protein. truncated. information. partialy folded state. β -lactamase. fragment

Plegado, proteína, fragmento, información, estados parcialmente plegados, β -lactamasa

SUMMARY

The biological properties of proteins rest upon their specific native three-dimensional structure, and it is known that protein native structure is the result of a folding process by which sequential information is spontaneously converted into three-dimensional information. However, it is unknown how the three-dimensional information is encoded by the sequence. Moreover, although the native, biologically active, conformation can be characterized in atomic detail, a clear understanding of the structure of unfolded and partially folded states is also lacking.

There are evidences suggesting that the information content is not homogenously distributed in the protein sequence: there exist particular fragments or blocks of sequence that can be eliminated without producing major alterations in the native structure, whereas other fragments, or even single residues, cannot be removed without impeding the folding process. In this work, β -lactamase of *Bacillus licheniformis* (ES- β L) was used as an experimental model to study the conversion of sequential information into three-dimensional information, and to investigate the existence of information modules embedded in the polypeptide chain.

ES- β L was chosen as a protein folding model because: a) even traces of its native state can be detected by measuring enzymatic activity; b) its crystal structure is known with high resolution; c) it does not have disulfide bridges that would additionally complicate the folding reaction; d) it is representative of medium-size proteins with two domains and a moderately intricate topology.

In the first part of the work, to characterize the experimental model, native and intermediary states of ES- β L, were studied by kinetics, equilibrium unfolding experiments, and chemical modification of Ser \rightarrow Cys mutants. At least four partially folded states with different spectroscopic properties or thiol accessibility were detected in ES- β L equilibrium unfolding. Unexpectedly, it was found that a

Ser265→Cys265 replacement destabilized selectively ES-βL partially folded intermediates, indicating Ser265 is establishing fixed interactions in these states.

In addition the results showed the presence of partially folded states, no coincident curves when unfolding was monitored by different probes, multiphase transitions, protease resistant cores, and kinetic intermediaries. All these features suggest a modular assembling mechanism for β-lactamase.

In the second part of the work, the sequence of β-lactamase was manipulated to study the interdependence of the hierarchic levels of structure (modules, independent units, topomer, native structure, etc.) in the folding process. Sequential information was eliminated with the expectation of stopping folding at different levels of structural complexity. In particular, the information content encoded by the C-terminal helix of ES-βL was evaluated. Three variants shortened by nine, fourteen and nineteen residues from the C-terminal were prepared and characterized (ES-βL^{CΔ9}, ES-βL^{CΔ14} and ES-βL^{CΔ19}, respectively). For ES-βL^{CΔ9}, ES-βL^{CΔ14}, most of the protein was found forming inclusion bodies (insoluble aggregates) in transformed *E. coli* cells. Neither lysates of untransformed *E. coli* cells nor cells expressing ES-βL^{CΔ19} had detectable lactamase activity. Contrastingly, lysates containing ES-βL^{CΔ9} or ES-βL^{CΔ14} exhibited enzymatic activity, which demonstrated that a fraction of these proteins acquired a properly folded structure *in vivo*.

A thorough characterization of ES-βL^{CΔ9} (hydrodynamics, spectroscopic, and thermodynamic properties, enzymatic activity and resistance to proteolysis) allowed demonstrating that the eliminated sequence does have a role in the folding mechanism, but its absence does not prevent the acquisition of native structure. Also I_p ES-βL^{CΔ9}, a partially folded state, was discovered and characterized. I_p ES-βL^{CΔ9} lacks tertiary structure, but it is compact and possesses residual secondary structure. These features are typical of molten globules, but this one is unusual because it forms a dimer in a concentration dependent process. ES-βL^{CΔ9} folds 10⁴ times more slowly than ES-βL. From a thorough thermodynamic and kinetic study of ES-βL^{CΔ9}, it is concluded that the

eliminated residues (287-295) participate in folding at different levels: (a) encoding secondary structure; (b) encoding tertiary structure indirectly, avoiding kinetic traps and erroneous association of folding units; (c) participating in the folding transition state; (d) stabilizing the native state.

Finally, in this thesis work it is discussed available experimental information on native proteins lacking parts of their sequences, and the relevance of these results to protein folding.

RESUMEN

Las propiedades biológicas de las proteínas dependen de su estructura tridimensional (3D). Hoy sabemos que el plegado proteico permite la conversión de la información existente en la secuencia de aminoácidos en información 3D, pero no sabemos cómo se lleva adelante este proceso. Tampoco se conoce la lógica con que se distribuye la información 3D en la secuencia y no existe una opinión unificada sobre el grado de estructura presente en los estados parcialmente plegados ni sobre el papel de estos últimos en el plegado proteico.

Sí existen algunas pruebas de que la información conformacional no estaría distribuida homogéneamente en la secuencia proteica. En una misma cadena polipeptídica existen fragmentos o bloques que pueden ser eliminados sin producir alteraciones en el plegado final, por lo que no formarían parte del conjunto de residuos determinantes de la estructura 3D nativa. Por el contrario, otros fragmentos aparentemente no pueden ser removidos sin abortar el proceso de plegado.

En este trabajo de tesis se utilizó a la β -lactamasa de *Bacillus licheniformis*, ES- β L como modelo experimental para estudiar el proceso de conversión de información 1D \rightarrow 3D e investigar la existencia de módulos de información para el plegado.

Se eligió a ES- β L como modelo principalmente porque a) la existencia de proteína correctamente plegada (nativa) es fácilmente detectable por actividad enzimática, aún en trazas; b) se conoce su estructura cristalográfica con gran resolución; c) no posee puentes disulfuro que compliquen adicionalmente el plegado; y d) ES- β L no es un modelo excesivamente reduccionista: posee dos dominios y una topología medianamente intrincada.

Para caracterizar el modelo experimental se estudiaron aspectos generales de la estructura, el plegado, y estados intermediarios de ES-βL, tanto desde un punto de vista cinético como en el equilibrio. La estructura de formas parcialmente plegadas también se estudió a partir de experimentos de modificación química de cisteínas introducidas a tal fin en la cadena polipeptídica como sondas conformacionales.

El desplegamiento de ES-βL inducido por urea presentó más complejidad que el desplegamiento por GdmCl. En el primer caso, se detectaron por lo menos cuatro estados parcialmente plegados.

Inesperadamente, el reemplazo de Ser265→Cys265 tuvo consecuencias importantes para el plegado. El efecto desestabilizador de la mutación sobre los estados parcialmente plegados indicó que el residuo formaría parte de un módulo estructurado en dichos estados.

La observación de estados parcialmente plegados, curvas de desnaturalización no coincidentes, transiciones multifásicas, *cores* resistentes e intermediarios cinéticos es compatible con un mecanismo de ensamblado modular o plegado por partes de la β-lactamasa.

Por otra parte, en este trabajo se manipuló la secuencia de la proteína para estudiar la interdependencia de los niveles jerárquicos de estructura en el proceso de plegado.

Se evaluó el contenido de información para el plegado de ES-βL codificado por la hélice α C-terminal. Para estudiar el papel de esta hélice se prepararon y caracterizaron tres variantes de ES-βL acortadas, en nueve, catorce y diecinueve residuos desde el C-terminal, ES-βL^{CΔ9}, ES-βL^{CΔ14} y ES-βL^{CΔ19}, respectivamente. Los lisados de bacterias expresando ES-βL^{CΔ19} no presentaron actividad β-lactamasa. Por el contrario, dicha actividad sí fue detectada en lisados conteniendo tanto ES-βL^{CΔ9} como ES-βL^{CΔ14}.

demonstrando de manera preliminar que una fracción de estas moléculas. puede adquirir estructura nativa.

La caracterización rigurosa de ES- β L^{C Δ 9} permitió demostrar que la secuencia de residuos eliminada tiene un rol en el mecanismo de plegado pero que su ausencia no impide la formación de estructura 3D nativa.

También se caracterizó en detalle I_p ES- β L^{C Δ 9}, un estado parcialmente plegado, que está conectado con la forma nativa de ES- β L^{C Δ 9}. I_p ES- β L^{C Δ 9} sólo posee estructura secundaria residual, pero es muy compacto. Posee las características de un glóbulo fundido y puede estabilizarse formando un dímero.

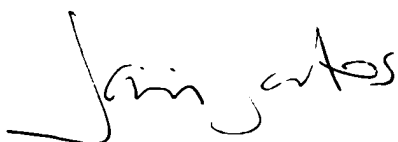
La eliminación de los residuos 287-295 afecta dramáticamente la velocidad de replegado de la β -lactamasa: ES- β L^{C Δ 9} se pliega 10⁴ veces más lentamente que ES- β L.


A partir del estudio termodinámico y cinético de ES- β L^{C Δ 9} se concluyó que los residuos eliminados proveen información para formar estructura secundaria, evitar trampas cinéticas y asociación errónea de unidades de plegado, acelerar el pasaje a través del estado de transición y estabilizar al estado nativo.

Los resultados obtenidos con la β -lactamasa se compararon con otros datos de literatura referidos a proteínas que a pesar de carecer de partes de su secuencia alcanzan un plegado nativo. El conjunto de las evidencias experimentales parece sugerir que la cadena polipeptídica tiende a plegarse guiada principalmente por información local en la secuencia. Las interacciones entre residuos alejados secuencialmente jugarían un papel secundario en el proceso de plegado y aparecerían posteriormente. luego de que la cadena polipeptídica adopte el recorrido espacial apropiado.

AGRADECIMIENTOS

- A Mario Ermácora por su paciencia y por apoyarme siempre. Por transmitirme el valor de las ideas y principios en la vida.
- A Silvana por todo.
- A Mora, mi hija, por permitirme escribir de noche y darme tanta felicidad de día.
- A mi mamá Vero y a mi papá Luis por todo, que es tanto que no puedo ni pensarlo.
- A mi increíble hermano Miguel por todo.
- A Erica, Eugenia, Daniel, Fede, Leopoldo, Noelia, Cristina, Sergio, Anas y Cecílias, porque compartieron conmigo todos estos años (los quiero mucho).
- A mi amigo Mauricio por compartir tantas ideas y por ser tan optimista siempre.
- Especialmente a Valeria por su alegría, su compañía y porque muchos de los experimentos mostrados aquí, los pensamos y los realizamos juntos.
- **A la FUNDACIÓN ANTORCHAS, a la UNQ, al CONICET y a la UBA.**
- A mi Maestro Daniel Goldstein.
- A mi Maestro Otto Feninger.
- A mi querido Amigo Jorge González Bosch.


JAVIER SANTOS


DR. MARIO R. ERMÁCORA
PROFESOR TITULAR DE BIOQUÍMICA

PUBLICACIONES

Los resultados presentados en este trabajo fueron difundidos a través de las siguientes publicaciones:

Folding of an abridged β -lactamase. Santos J, Gebhard LG, Risso VA, Ferreyra RG, Rossi JP, Ermacora MR. *Biochemistry* 2004 Feb 17 43:6 1715-23

Export and folding of signal-sequenceless *Bacillus licheniformis* β -lactamase in *Escherichia coli*. Frate MC, Lietz EJ, Santos J, Rossi JP, Fink AL, Ermacora MR. *Eur. J. Biochem.* 2000 Jun 267:12 3836-47

Se encuentran en preparación los siguientes manuscritos:

Multiple partially-folded states of *Bacillus licheniformis* β -lactamase. Javier Santos, Valeria A Risso and Mario R. Ermácora.

On the three-dimensional information of a protein sequence. Leopoldo G. Gebhard, Valeria A. Risso, Raul G. Ferreyra, Javier Santos and Mario R. Ermácora.

TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|-------------------------------|---|
| Abreviaturas | 6 |
| Residuos de aminoácidos | 9 |

CAPÍTULO I

Marco teórico y objetivos El problema del plegado de proteínas

Introducción

| | |
|---|----|
| Las proteínas y su plegado espontáneo..... | 11 |
| Estados conformacionales de las proteínas | 11 |
| La paradoja de Levinthal | 22 |

Modelos de plegado

| | |
|--|----|
| Nucleación | 22 |
| Difusión, colisión y coalescencia | 23 |
| El modelo jerárquico | 26 |
| Rompecabezas | 27 |
| El colapso hidrofóbico..... | 28 |
| Nucleación-condensación..... | 29 |
| Plasticidad del mecanismo de plegado | 29 |

Una visión nueva del plegado

| | |
|--|----|
| Conceptos nuevos | 30 |
| Frustración energética y topológica..... | 34 |
| Unidades autónomas de plegado y fragmentos | 37 |

El modelo experimental, la β -lactamasa

| | |
|---|----|
| Aspectos generales de las β -lactamasas | 39 |
| β -lactamasas de clase A..... | 42 |
| Estructura general | 42 |
| Actividad enzimática y sitio activo | 43 |
| Experimentos de plegado y caracterización de estados conformacionales | 45 |
| Péptido señal y efecto en el plegado..... | 47 |
| La β -lactamasa de <i>Bacillus licheniformis</i> | 47 |

| | |
|---|----|
| Expresión | 47 |
| Estructura de ES-βL | 48 |
| HIPÓTESIS | 51 |
| OBJETIVOS GENERALES | 52 |
| | |
| CAPÍTULO II | |
| Materiales y Métodos | |
| Generalidades | 54 |
| Electroforesis | 54 |
| Western blotting | 55 |
| Espectrometría de masa | 55 |
| Coefficientes de extinción molar, espectros-UV y concentración de proteína..... | 56 |
| Técnicas computacionales para el análisis de la estructura proteica | 56 |
| Reactividad Química de tioles..... | 57 |
| Modificación química con glutaraldehído | 57 |
| Concentración y almacenamiento de proteínas | 58 |
| Dialisis | 59 |
| Determinación de actividad β-lactamasa..... | 59 |
| Variantes de la β-lactamasa | 59 |
| Ingeniería genética | |
| Mutagénesis..... | 61 |
| Visualización y aislamiento de los productos de PCR | 62 |
| Purificación de fragmentos de DNA | 65 |
| Preparación de bacterias competentes | 66 |
| Transformación de bacterias <i>E. coli</i> JM109 y BL21(DE3)..... | 67 |
| Purificación de proteínas | |
| Purificación de variantes de longitud completa en condiciones nativas | 68 |
| Purificación de variantes truncadas en condiciones desnaturizantes..... | 68 |
| Proteólisis controlada, analítica y preparativa..... | 70 |
| Separación preparativa por tamaño molecular | 71 |

| | |
|--|----|
| Caracterización estructural | |
| Comportamiento hidrodinámico..... | 71 |
| Tratamiento de la dispersión de luz por agregados proteicos..... | 72 |
| Cuarta derivada del espectro UV..... | 73 |
| Modelado de espectros del estado desplegado..... | 73 |
| Dicroísmo circular..... | 74 |
| Espectros de fluorescencia de triptofano..... | 75 |
| Rendimiento cuántico de triptofano..... | 75 |
| Unión de ANS..... | 76 |
| Desplegado seguido por fluorescencia de triptofano..... | 77 |
| Desnaturalización por temperatura..... | 77 |
| Cinética de plegado y desplegado..... | 78 |

CAPÍTULO III

Estructura y plegado de ES-βL

| | |
|---|------------|
| Introducción..... | 81 |
| Resultados y discusión..... | 84 |
| Expresión y purificación de ES-βL..... | 84 |
| Caracterización espectroscópica | |
| Espectroscopia UV..... | 84 |
| Dicroísmo circular..... | 90 |
| Fluorescencia..... | 92 |
| Equilibrio de desplegado en GdmCl..... | 93 |
| Cinética del plegado de ES-βL..... | 98 |
| Gráficos de Chevron..... | 98 |
| Equilibrio de desplegado en urea..... | 102 |
| Variantes de cisteína | |
| Purificación de las variantes S→C..... | 106 |
| Caracterización general de las variantes S→C..... | 106 |
| Desplegado por urea de las variantes S→C..... | 113 |
| Topología y estados parcialmente plegados..... | 120 |

| | |
|--|-----|
| Predicción de módulos estables e interacciones | 121 |
|--|-----|

CAPÍTULO IV

Estudio del código de plegado proteico

Introducción

| | |
|---|-----|
| Conceptos generales y estrategia | 127 |
| Las interacciones de la hélice $\alpha 1$ | 129 |

Resultados y discusión

| | |
|--|-----|
| Expresión, purificación y replegado preliminar | 134 |
| Propiedades hidrodinámicas y resistencia a la tripsinólisis..... | 137 |

Estudio de los estados conformacionales alternativos de ES- β L^{CA9}

| | |
|------------------|-----|
| Aislamiento..... | 141 |
|------------------|-----|

Espectroscopía de ES- β L^{CA9} nativa e I_P ES- β L^{CA9}

| | |
|--|-----|
| Absorción UV..... | 146 |
| Dicroísmo circular | 146 |
| Fluorescencia de triptofano | 150 |
| Unión de ANS | 153 |
| Estabilidad de ES- β L ^{CA9} nativa y de I _P | 153 |
| Variantes truncadas con reemplazo de S→C | 161 |
| Cinética de plegado de ES- β L ^{CA9} | 162 |
| El equilibrio dímero↔monómero de I _P ES- β L ^{CA9} | 166 |
| Gráficos de Chevron..... | 169 |
| Efecto de la escisión sobre el estado de transición..... | 170 |

CAPÍTULO V

Discusión general y conclusiones

| | |
|---|-----|
| La organización modular de la β -lactamasa | 180 |
| Distribución de la información para el plegado | 181 |
| Otros ejemplos en la literatura..... | 183 |
| Un mecanismo general de ensamblado de la matriz proteica..... | 186 |
| Información topológica localmente codificada | 188 |

| | |
|---|-----|
| Inducción de topología por contexto | 190 |
| Nuevos experimentos | 190 |
| RESUMEN | 192 |
| INDICE DE FIGURAS Y TABLAS | 196 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 197 |

ABREVIATURAS

| | |
|----------------------|--|
| ANS | (1,8)-anilinaftalensulfonato |
| BSA | albúmina sérica bobina |
| CD | dicroísmo circular |
| Ci | cuerpos de inclusión (fracción insoluble) |
| C_p | capacidad calorífica a presión constante |
| DNA | ácido desoxirribonucleico |
| dNTP | desoxinucleótidos trifosfato |
| DO | densidad óptica |
| DTNB | 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) ácido |
| DTT | (±)-treo-1,4-dimercapto-2,3-butanediol (ditiotreitól) |
| EDTA | ácido etilendiaminotetracético |
| ES-βL | variante <i>exo-small</i> de la β-lactamasa de <i>Bacillus licheniformis</i> |
| ES-βL ^{CΔn} | variante de ES-βL en la que se han removido <i>n</i> residuos del extremo C-terminal |
| ε | coeficiente de extinción |
| f_N | fracción nativa |
| f_U | fracción desplegada |
| GdmCl | cloruro de guanidinio |
| HPLC | cromatografía líquida de alta performance |

| | |
|---------------------------|--|
| I | estado intermediario |
| IPTG | β -D-isopropil-tiogalactopiranosido. |
| K_d | constante de disociación |
| K | constante de equilibrio |
| K_M | constante de Michaelis-Menten |
| k | constante cinética de velocidad |
| k_F | constante de velocidad de plegado |
| k_U | constante de velocidad de desplegado |
| $K_{U \leftrightarrow N}$ | constante de equilibrio de desplegado |
| LB | medio de cultivo Luria-Bertani |
| N | estado nativo |
| NATA | N-acetilriptofanoamida |
| NAYA | N-acetiltirosinamida |
| RMN | resonancia magnética nuclear |
| PCR | reacción en cadena de la polimerasa |
| PDB | <i>Protein Data Bank</i> |
| PM | peso molecular |
| Q | rendimiento cuántico |
| rpm | revoluciones por minuto |
| RNA | ácido ribonucleico |
| R_S | radio de Stokes |

| | |
|----------------------------------|---|
| SDS | dodecil sulfato de sodio |
| SDS-PAGE | electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS |
| SEC | cromatografía de exclusión molecular. |
| FPLC | cromatografía rápida líquida de proteínas y péptidos |
| τ | tiempo de relajación ($1/k_F$) |
| T_{\ddagger} | estado de transición (TS) |
| TFA | ácido trifluoroacético |
| TCA | ácido tricloroacético |
| U | estado completamente desplegado |
| UV | ultravioleta |
| $\Delta G_{N \leftrightarrow U}$ | variación en la energía libre para el proceso de desplegado |
| λ_{MAX} | máximo de longitud de onda |
| V_{max} | velocidad máxima |

Residuos de aminoácidos

| | | |
|-----|---|-----------------|
| Ala | A | alanina |
| Arg | R | arginina |
| Asn | N | asparagina |
| Asp | D | ácido aspártico |
| Cys | C | cisteína |
| Gln | Q | glutamina |
| Glu | E | ácido glutámico |
| Gly | G | glicina |
| His | H | histidina |
| Ile | I | isoleucina |
| Leu | L | leucina |
| Lys | K | lisina |
| Met | M | metionina |
| Phe | F | fenilalanina |
| Pro | P | prolina |
| Ser | S | serina |
| Thr | T | treonina |
| Trp | W | triptofano |
| Tyr | Y | tirosina |
| Val | V | valina |

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO Y OBJETIVOS

EL PROBLEMA DEL PLEGADO DE PROTEÍNAS

CÓDIGO E INFORMACIÓN PARA EL PLEGADO

INTRODUCCIÓN

Las proteínas y su plegado espontáneo

Uno de los problemas científicos no resueltos es cómo las proteínas alcanzan su estructura tridimensional (3D) nativa. Hace 30 años, Christian B. Anfinsen [1] y sus colegas en el *National Institute of Health*, USA, hicieron un descubrimiento trascendente. Sus experimentos *in vitro* indicaron que, por lo menos para las proteínas pequeñas, las fuerzas que dirigen el plegado derivan de principios básicos de la química y de la física, que el proceso es independiente de la maquinaria celular, y que la secuencia de aminoácidos es suficiente para especificar el plegado espontáneo. Aunque inicialmente parecía simple, después de treinta años de investigaciones aún no fue posible resolver el problema de predecir correctamente la estructura de las proteínas en base a sus secuencias.

Estados conformacionales de las proteínas

El estado nativo y el estado desplegado

El plegado proteico puede entenderse entonces como un proceso físico químico que permite la conversión de la información existente en la secuencia de aminoácidos en información 3D. Las conformaciones alternativas que una proteína puede adoptar difieren en los ángulos de rotación de los enlaces del esqueleto polipeptídico (*phi* y *psi*; ver Figura 1). También debe tenerse en cuenta la presencia de puentes disulfuro, que restringen fuertemente la libertad conformacional. En el proceso de plegado, la conformación final nativa es estable y puede ser caracterizada con detalle atómico por cristalografía de rayos X y por resonancia magnética nuclear (RMN).

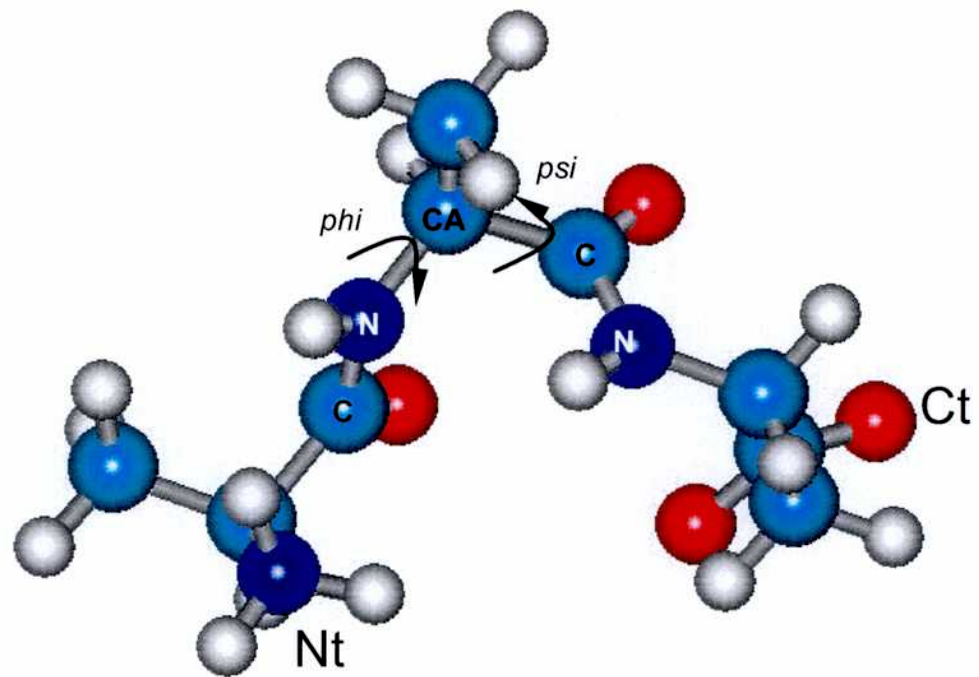


Figura 1. Los ángulos torsionales (diedros), ϕ y ψ , determinan la conformación de la cadena polipeptídica. El ángulo ϕ se define como el ángulo diedro formado por los átomos CN--CAC. ψ está definido por los cuatro átomos NCA--CN. Donde N es nitrógeno amida, CA es carbono alfa y C carbono carbonílico. En casi todos los casos, el ángulo diedro ω CAC--NCA, es 180° ; constituyen una excepción algunos enlaces Xaa-Pro en los que ω es 0° .

La mayor parte de las proteínas se pliegan en formas intrincadas, relativamente rígidas y compactas, con una mínima superficie accesible al solvente, y estableciendo una complicada red de interacciones no covalentes (puentes de hidrógeno, puentes salinos, interacciones hidrofóbicas e interacciones de van der Waals, y en muchos casos uniones de coordinación con metales). Participan de estas interacciones átomos de las cadenas laterales y átomos de la cadena principal (*backbone*) formando elementos de estructura secundaria y estabilizando una estructura terciaria fija. Generalmente el estado nativo es la forma biológicamente activa, lo que transforma el estudio de la relación entre estructura y función en el eje fundamental de la investigación biofísica de las proteínas.

El estado desplegado inicial de la reacción está mucho menos caracterizado que el estado nativo. En cierta medida esto es consecuencia de su naturaleza fluctuante: no se trata de una sino de múltiples conformaciones. El estado desplegado de las proteínas naturales se estabiliza en presencia de agentes caotrópicos. Su estudio podría ser una de las claves para comprender cómo una proteína se pliega espontáneamente. Su volumen es típicamente 5-10 veces el volumen del estado nativo. Inicialmente el estado desplegado se modeló como un ovillo estadístico (*random coil*), un conjunto dinámico de 'infinitos' microestados conformacionales que exponen un máximo de superficie y no contienen interacciones preferenciales entre residuos. En los últimos años, mediante nuevas técnicas de RMN, se ha demostrado que en urea 6-8 M puede existir estructura secundaria residual fluctuante, grupos o *clusters* dinámicos de residuos apolares, interacciones electrostáticas y resabios de topología nativa [2, 3]. El estudio del estado desplegado ha sido abordado también por dinámica computacional, una herramienta importante complementaria al RMN para el estudio de cada uno de los microestados conformacionales [4].

Termodinámica de la reacción de plegado

Las proteínas nativas son sistemas altamente cooperativos y marginalmente estables. Dicha estabilidad está representada por la diferencia de energía libre entre los estados nativo (N) y desplegado (U) ($\Delta G_{N \leftrightarrow U} = \Delta H_{N \leftrightarrow U} - T\Delta S_{N \leftrightarrow U}$). Desde el punto de vista entálpico, en el estado nativo, las interacciones intramoleculares, las interacciones de átomos superficiales con el solvente y las interacciones entre moléculas de solvente tienden a cancelarse. El resultado a temperaturas fisiológicas es una mínima estabilización entálpica del estado nativo. La entropía de la cadena polipeptídica y de las moléculas de solvente ordenadas sobre la superficie expuesta, también se compensan mutuamente. Al plegarse la cadena, la entropía conformacional disminuye y la del solvente aumenta (por liberación de moléculas retenidas sobre la superficie de los residuos que se exponen en el estado desplegado). Dicho de otra manera, la expulsión de moléculas de agua durante el proceso de plegado compensa la pérdida de entropía que se produce como consecuencia de la disminución en los grados de libertad conformacional de la cadena. El balance neto de los términos entálpicos y entrópicos es de unas pocas kcal/mol a favor del estado nativo. Lo que resulta extraordinario teniendo en cuenta los miles de kcal/mol que se cancelan.

La superficie expuesta por el estado desplegado es mucho mayor que la expuesta por el estado nativo. Las moléculas de agua en torno a la superficie molecular forman una cubierta ordenada de solvatación. Si se aumenta la temperatura del sistema, las moléculas que forman parte de esta cubierta ordenada absorben calor hasta que finalmente se disgrega o 'funde'. El calor latente de fusión contribuye significativamente a la capacidad calorífica a presión constante (C_p). En conclusión la variación de C_p para la reacción de desplegado (ΔC_p) toma valores positivos.

Como la entropía y la entalpía no tienen la misma dependencia funcional con la temperatura, ocurre que el $\Delta G_{N \rightarrow U}$ se hace negativo a altas y a bajas temperaturas, llevando al desplegado por calor y frío respectivamente [5-7]. Básicamente puede visualizarse al sistema proteína-solvente como un sofisticado conjunto de interacciones capaces de responder plásticamente a cambios de temperatura [8-12]. A bajas temperaturas la cubierta de hidratación adquiere tal energía de estabilización entálpica que fuerza a la proteína a exponer mayor superficie, venciendo la restricción entrópica del solvente y desplegando la cadena. A altas temperaturas el término entrópico conformacional adquiere tal peso que vence al término entálpico de las interacciones intramoleculares, llevando a la expansión máxima de la cadena. Así, tanto el frío como el calor desestabilizan la estructura nativa.

Estados parcialmente plegados

Las proteínas se pliegan lo suficientemente rápido como para hacer difícil la acumulación de estructuras parcialmente plegadas. Sin embargo, en algunos casos, existen barreras energéticas lo suficientemente altas que permiten la acumulación transitoria de intermediarios cinéticos con estructuras dinámicas y fluctuantes. A veces estos intermediarios son estructuras incorrectamente plegadas, y para que la reacción de plegado prosiga deben volver a desplegarse. Pero también se observan intermediarios cinéticos con estructura nativa parcial, sugiriendo un mecanismo de plegado jerárquico (ver más adelante). Bajo ciertas condiciones experimentales, en presencia de agentes caotrópicos (cloruro de guanidinio, urea o tiocianato de guanidinio) se observan intermediarios en equilibrio. Las razones termodinámicas que permiten la observación de estados intermediarios en el equilibrio se resumen en el modelo mostrado en la Figura 2. Es importante destacar que los agentes caotrópicos aumentan la solubilidad de las cadenas laterales por lo que confieren mayor estabilidad al estado desplegado. Por el contrario, el

agregado de osmolitos como el anión sulfato, algunos disacáridos, glicerol, e incluso algunos aminoácidos se caracterizan por inestabilizar conformaciones con grandes superficies expuestas. Se establece de esta manera una dependencia funcional, cuantificable con relativa facilidad, entre la estabilidad relativa de los distintos estados conformacionales y la concentración del agente caotrópico o del osmolito. Como es de esperar por lo mencionado más arriba, la dependencia está determinada por el área polar y apolar expuesta al solvente que presenta en promedio cada estado.

En el equilibrio, el factor limitante para la caracterización estructural es la heterogeneidad de conformaciones y la velocidad de interconversión entre las mismas [13].

Glóbulos fundidos

Los glóbulos fundidos o *molten globules* son estructuras parcialmente plegadas que se observan en el equilibrio bajo ciertas condiciones moderadamente desestabilizantes (pH bajo, concentraciones bajas de caotrópicos, incrementos en la temperatura, eliminación de interacciones por mutagénesis, etc.). Se trata de conformaciones expandidas con respecto al estado nativo, pero compactas con respecto al estado desplegado. Son sistemas poco cooperativos que suelen contener estructura secundaria, pero no interacciones terciarias fijas ni un buen empaquetamiento de cadenas laterales. Los glóbulos fundidos están estabilizados por factores entrópicos, como el aumento de libertad conformacional de las cadenas laterales. Además, en ellos, el área hidrofóbica es mayor que en el estado nativo.

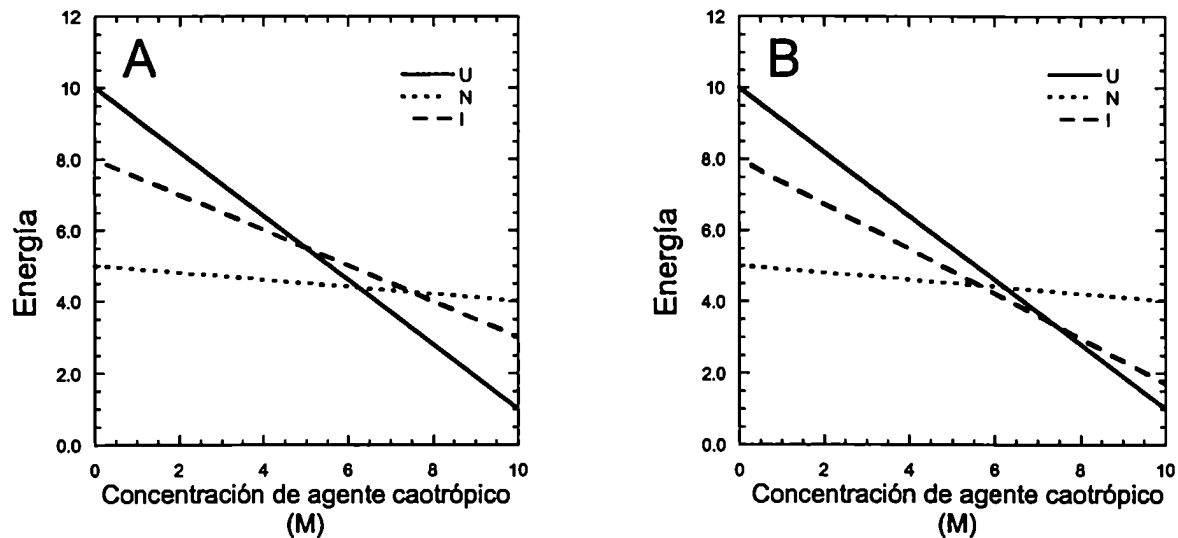


Figura 2. Modelo de la dependencia de $\Delta G_{U \leftrightarrow N}$ con el poder desnaturante. En el panel A se muestra el caso de una proteína en la que los estados parcialmente plegados (I) nunca tienen una energía suficientemente baja como para estabilizarse con respecto al estado nativo (N) y al estado desplegado (U). En cambio en el panel B, I posee mínima energía a concentraciones de caótrolo cercanas a 6 M por lo que I, estabilizado muy probablemente por entropía del solvente y entropía de las cadenas laterales, se observaría en el equilibrio de desplegado. A concentraciones bajas se estabiliza N y a concentraciones altas de caótrolo U. Tanto los valores de energía libre como los de concentración de agente caotrópico son arbitrarios. Cada estado conformacional proteico puede representarse con una recta en este tipo de esquemas. La pendiente de cada recta es proporcional al área expuesta al solvente en cada estado conformacional. El modelo está firmemente fundado en observaciones experimentales [5-9].

Experimentalmente se ha determinado que el (1,8)-anilinaftalenosulfonato (ANS) interacciona con las superficies hidrofóbicas del glóbulo fundido, siendo esta interacción diagnóstica de este estado [14]. La RMN ha mostrado que, en los glóbulos fundidos, la cadena polipeptídica posee mayor flexibilidad que en el estado nativo: la menor dispersión del desplazamiento químico observada indica la desaparición de numerosas interacciones intramoleculares [15, 16].

Es importante destacar que existe una extensa variedad de glóbulos fundidos más o menos estructurados. En general los factores de protección al intercambio hidrógeno-deuterio de los hidrógenos amida indican que su estructura secundaria es inestable [13]. Estudios de RMN, experimentos de intercambio de disulfuros y relevamiento de exposición al solvente mediante radicales libres demuestran que los *molten globules* poseen elementos de topología nativa [17, 18].

Es necesario saber cómo se mantiene la topología nativa de los *molten globules* en ausencia de interacciones terciarias fijas para comprender cómo se genera la estructura terciaria.

El estado de transición en la reacción de plegado

Para descubrir los principios que gobiernan el proceso de adquisición de estructura nativa es necesario, además, comprender la naturaleza de las barreras que lo bloquean y las fuerzas que lo impulsan. Durante el proceso de plegado se generan muchas uniones no covalentes. La formación de estas interacciones limita la velocidad, imponiendo una barrera energética debido a los notables cambios en la entropía conformacional y de hidratación a medida que avanza la reacción de plegado.

El conjunto de estructuras en formación que están en la cima de la barrera energética, y constituyen el máximo de energía en la coordenada de reacción, se conoce como estado de

transición de la reacción de plegado (T_{\ddagger}). El estado de transición está formado por un conjunto de estructuras inestables que, por definición, tienen un 50 % de probabilidad de progresar al estado nativo.

Una de las técnicas más poderosas de la química orgánica para probar la estructura de T_{\ddagger} en una reacción simple consiste en el estudio de la relación 'estructura-reactividad'. Este tipo de estudio comienza con la preparación de una serie de reactivos que poseen pequeñas modificaciones químicas con respecto al reactivo original. Posteriormente se mide el cambio en la constante de equilibrio y en las constantes de velocidad de la reacción. En base a los resultados pueden inferirse aspectos de la estructura de T_{\ddagger} .

Para estudiar el estado T_{\ddagger} del plegado proteico, se desarrolló un procedimiento experimental basado en los mismos conceptos, pero sustentado en la ingeniería de proteínas. Este procedimiento permite medir la magnitud y la importancia de una interacción particular, y cómo esta afecta la cinética, el equilibrio y el mecanismo de plegado [19]. La estrategia, muy sintéticamente, incluye la modificación por ingeniería genética de una interacción. Se reemplaza un residuo por otro eliminando una parte de la cadena lateral. También es necesario establecer el efecto de la modificación sobre los estados nativo y desplegado [20]. De los cambios en la energía libre de activación para distintas mutantes ($\Delta\Delta G_{\ddagger}$) y de los cambios en la energía libre de desplegado en el equilibrio ($\Delta\Delta G_{N\leftrightarrow U}$), realizando el análisis de los valores Φ ($\Phi = \Delta\Delta G_{\ddagger} / \Delta\Delta G_{N\leftrightarrow U}$), puede inferirse la estructura del estado de transición. En efecto, cada mutación actúa como una sonda específica del grado de formación de estructura en el micro entorno del residuo modificado. Un valor de $\Phi = 0$ (cero) para el plegado significaría que la interacción medida no está formada en T_{\ddagger} . Por el contrario, un valor $\Phi = 1$ (uno) denotaría que la interacción

está presente tanto en el estado nativo como en el T_{\ddagger} (ambos estados se desestabilizan de la misma manera en ausencia de la interacción estudiada).

Este tipo de procedimientos es más fácilmente aplicable al proceso de desplegamiento que al proceso de plegamiento, principalmente, porque la reacción de desplegamiento suele ser monofásica mientras que la de plegamiento suele ser multifásica, además, porque la estructura inicial, nativa, es la mejor caracterizada.

La aplicación en forma rigurosa de este tipo de procedimiento experimental está limitada a proteínas que se pliegan en dos estados ($U \leftrightarrow N$) o a 'tramos' del proceso de plegamiento. Por ejemplo, en la reacción de plegamiento $U \rightarrow I_1 \rightarrow N$ se limita al proceso $I_1 \rightarrow N$ que puede considerarse como una reacción de plegamiento de dos estados. Es importante notar que las mutaciones que desestabilicen al estado de transición tendrán un efecto sobre la velocidad de la reacción de plegamiento (ver Figura 3). De esta manera, cuanto más alta es la barrera energética, más lento será el proceso de plegamiento.

Existen evidencias de una fuerte correlación entre la velocidad de plegamiento de proteínas simples (que poseen un único dominio) con parámetros que miden la complejidad topológica del estado nativo. Esta correlación sugiere que la topología podría ser determinante para alcanzar el estado de transición. Por el contrario no hay correlaciones entre el tamaño o la estabilidad y la cinética de repliegamiento. Este tema será abordado nuevamente más adelante. Sin embargo, resulta interesante ver que las barreras energéticas para el plegamiento pueden tener base entálpica (interacciones nativas ausentes o interacciones no nativas presentes) o base entrópica (topologías complicadas). En definitiva ambos términos intervienen en el plegamiento de la cadena polipeptídica en el espacio.

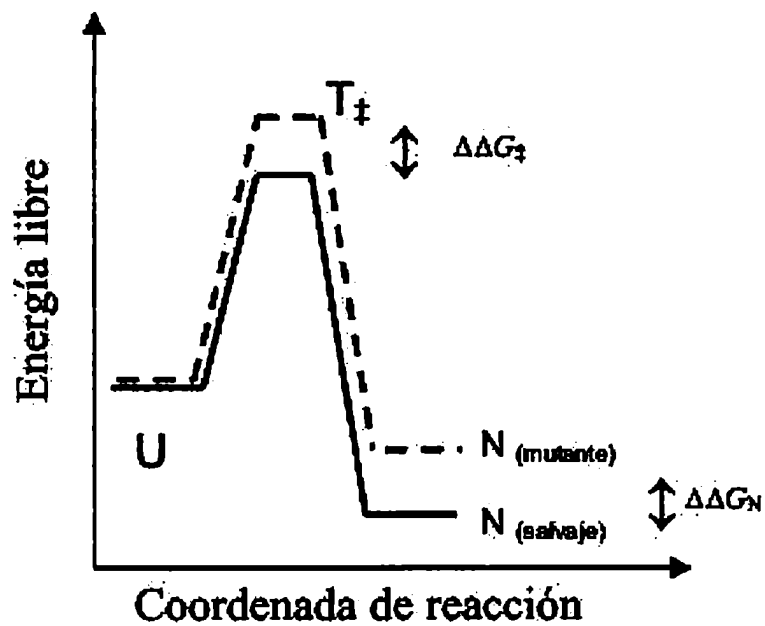


Figura 3. Reacción de plegado hipotética a través del estado de transición (T^\ddagger) para una proteína y para una de sus variantes (mutante). La mutación afectó a T^\ddagger produciendo su desestabilización ($\Delta\Delta G_{T^\ddagger}$). También el reemplazo de la cadena lateral determina la desestabilización del estado nativo ($\Delta\Delta G_{T_N}$). Ambos términos tienen la misma magnitud. Esto es lo esperado si la interacción removida forma parte tanto de la estructura nativa, como del conjunto de conformaciones presentes en el estado de transición ($\Phi = 1$, ver texto). La energía de U, el estado desplegado, no fue alterada por la mutación introducida.

La paradoja de Levinthal

Por mucho tiempo coexistieron dos conceptos muy interrelacionados en torno al estudio del proceso del plegado de las proteínas: la paradoja de Levinthal y la supuesta necesidad de la existencia de intermediarios o vías específicas del plegado.

Levinthal dedujo hace 30 años [21, 22] que si la búsqueda de la conformación nativa desde el estado desplegado fuera un proceso aleatorio, las moléculas deberían cambiar su conformación tantas veces que sería un proceso irrealizable en tiempos razonables. Por ejemplo, si una cadena de cien residuos tiene 10^{100} posibles conformaciones (un promedio de diez conformaciones por residuo), y si una conformación se convierte en otra en el tiempo más corto posible (tal vez 10^{-13} s), el tiempo promedio requerido para explorar todas las posibles conformaciones hasta hallar el mínimo energético sería 10^{77} años. Las observaciones, por el contrario, indican que las proteínas se pliegan en tiempos muy cortos, desde unos pocos microsegundos a minutos u horas.

A partir de este tipo de consideraciones Levinthal propone la existencia de vías discretas de plegado que eviten las conformaciones no productivas.

Modelos de plegado

‘Nucleación’

En el contexto descrito anteriormente surgieron una serie de modelos sobre las rutas de plegado. El estudio de las vías de plegado debía, en teoría, revelar el mecanismo de plegado y ayudar a determinar el código por el cual la secuencia determina la estructura. El propio Levinthal, en el año 1968, sugirió que una parte de la cadena polipéptica podría servir como núcleo para una posterior propagación de la estructura 3D. Este modelo requiere que el núcleo sea suficientemente pequeño para que una búsqueda al azar permitiera encontrar

localmente la estructura nativa. Una vez que el núcleo alcanza la estructura nativa se posibilita el plegado secuencial y esencialmente independiente de cada residuo.

Difusión, colisión y coalescencia

Otros modelos simplificaron la búsqueda conformacional desacoplando la formación de estructura secundaria y terciaria. Así Martín Karplus y David L. Weaver (1976) propusieron el modelo de difusión, colisión y coalescencia. (*Diffusion-Collision Model*) [23, 24]. Este modelo asume que las proteínas están compuestas por una serie de partes fluctuantes (microdominios) suficientemente pequeñas y simples como para que en ellas la búsqueda conformacional sea rápida. Los microdominios no tienen acceso a estructura secundaria estable por búsqueda al azar pero sí a estructura secundaria incipiente y a grupos o *clusters* de interacciones hidrofóbicas.

El proceso de plegado es descrito como una serie de pasos únicos (ver Figura 4), de difusión, colisión y coalescencia, en la que se estabilizan mutuamente los microdominios. Las fuerzas que gobiernan el movimiento de microdominios son las interacciones específicas entre microdominios y las colisiones al azar con el solvente y con otras partes de la cadena polipeptídica. La estabilización final de estructura secundaria está ligada a la formación de estructura terciaria.

El modelo permite postular múltiples vías (paralelas) de secuencias de pasos de difusión y colisión. La información contenida en la secuencia de cada microdominio puede ser usada independientemente. Otra particularidad del modelo es que las colisiones pueden generar intermediarios con interacciones entre microdominios no adyacentes en relación a la secuencia lineal de la proteína. El modelo reduce en definitiva la dinámica del proceso de plegado, ya no considerando cada residuo, sino el análisis de las propiedades de los

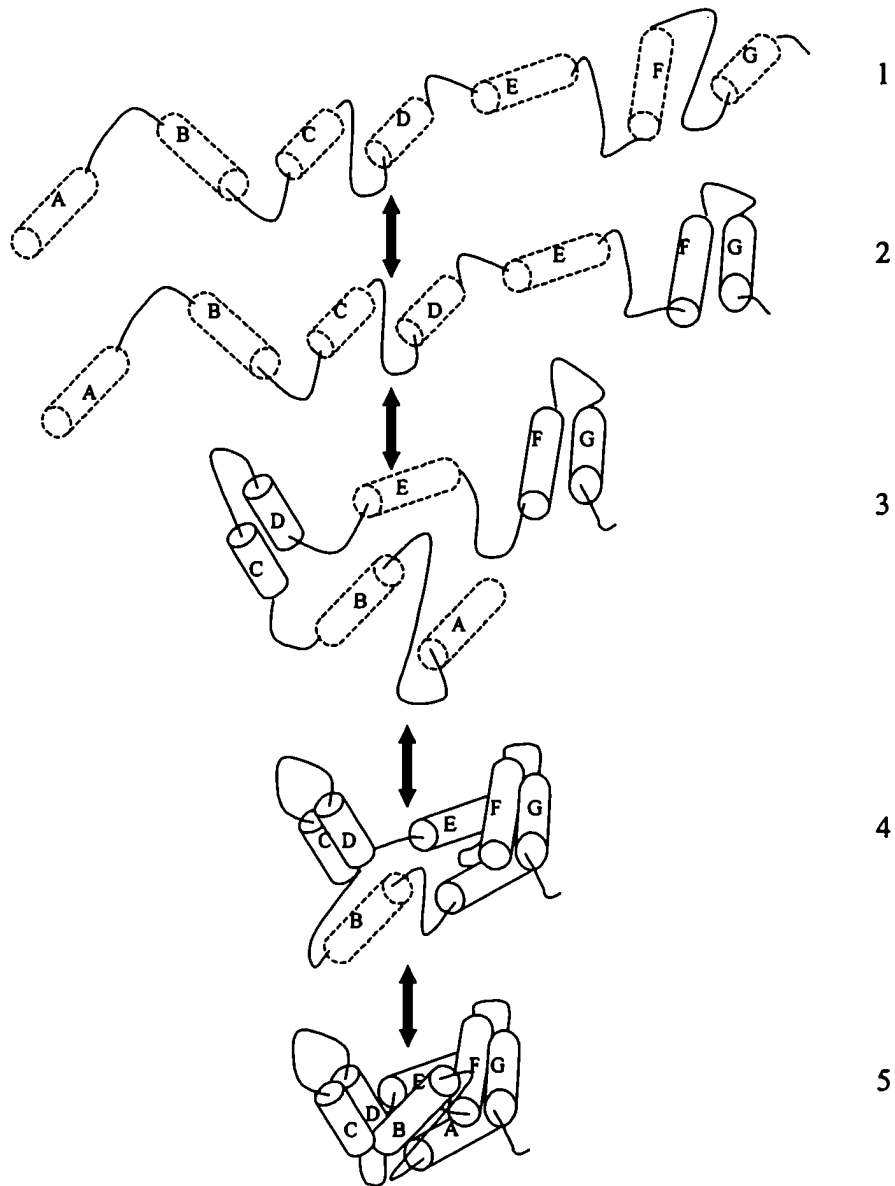


Figura 4. Esquema de la reacción de plegado en cinco instantáneas según el modelo de difusión, colisión y coalescencia (*Diffusion-Collision Model* [23] para una proteína 'multimicrodominio' presentado por Karplus y Weaver [24]. La línea de tiempo de replegado corre desde arriba hacia abajo. El sistema parte de un conjunto formado por infinitas conformaciones (*random coil*) en las que los microdominios (A-G) son individualmente inestables (indicado por líneas en guiones). Posteriormente de manera transitoria y fluctuante se estabilizan estados conformacionales con estructura secundaria (probablemente con estructura nativa o similar a la nativa). Los microdominios F y G en la segunda instantánea logran estabilizarse mediante interacciones hidrofóbicas, (denotado por las líneas llenas). Más adelante se forman intermediarios multimicrodominio, con estructuras más estables como la presentada en la instantánea 4. Finalmente, todos los microdominios forman parte de una estructura compacta y con estructura terciaria bien definida (instantánea 5).

microdominios y sus interacciones. Este modelo predice la dependencia de la velocidad de replegado con respecto a la viscosidad del solvente. La determinación experimental de esta dependencia parece ser un camino directo para probar el modelo. Sin embargo, no lo es. Los cosolventes que modifican la viscosidad, invariablemente alteran la estabilidad del estado nativo y la barrera de energía de la reacción de plegado; haciendo ambigua la interpretación de los resultados.

Algunos resultados experimentales sí pueden revisarse en este marco conceptual. Los experimentos de RMN realizados por Englander y colaboradores [25, 26] incubando el citocromo C a bajo pH y baja fuerza iónica, condiciones en las que esta molécula no es compacta, muestran una estructura helicoidal que los autores atribuyen 'unidades estables submoleculares de plegado'. Estas unidades estarían compuestas por más de un segmento helicoidal con un 'empaquetamiento liviano', (presumiblemente de naturaleza hidrofóbica y no relacionado con el interdigitado de cadenas laterales característico del estado nativo). Por otra parte Fersht y colaboradores encontraron que el plegado de la barnasa es un proceso multifásico en el que la estructura α y la estructura β se forman previamente a la adquisición del plegado global [27]. Además realizando experimentos de competencia entre el replegado y el intercambio de hidrógeno Miranker y col. (1991) [28] han encontrado especies de vida corta en el replegado de la lisozima que poseen características estructurales semejantes al glóbulo fundido de la α -lactalbúmina [29]. Además encontraron que los dominios estructurales de la lisozima son dominios independientes de plegado. El dominio helicoidal se pliega primero y el dominio β se pliega subsecuentemente.

El modelo jerárquico

En la década del 80 Robert L. Baldwin y colaboradores propusieron una serie de ideas inspiradas en los experimentos realizados por los pioneros Ptitsin, Rashin y Richmond, Richards y Cohen [30]. Se trata de un modelo jerárquico conocido como *framework model* en el que inicialmente se forman elementos locales de estructura secundaria nativa, independientes e intrínsecamente estables (con estructura de puentes de hidrógeno nativa), en ausencia de estructura terciaria. Posteriormente estos elementos se empaquetan para formar estructuras más complejas. Este modelo se ve apoyado por la evidencia de que una hélice α se forma, en muchos péptidos y proteínas, en microsegundos [31], mientras que la estructura terciaria tarda en aparecer milisegundos o más.

Existen numerosos ejemplos en los que la estructura terciaria es desensamblada antes que la estructura secundaria. De los experimentos en equilibrio de desplegado inducido por agentes caotrópicos (desnaturalizantes), un caso de particular interés es el de la β -lactamasa. Las señales de dicroísmo circular (CD) en el UV cercano (sonda de estructura terciaria) se desvanecen conjuntamente con las de actividad enzimática y con las de fluorescencia del triptofano, mientras que las señales de CD en el UV lejano (sonda de estructura secundaria) persisten a concentraciones mayores de desnaturalizantes, delatando la presencia de intermediarios sin estructura terciaria fija pero con estructura secundaria y con un volumen menos expandido que el estado desplegado [32-34]. Por otro lado, se pudo deducir de experimentos de CD *stopped-flow* que la estructura secundaria de la anhidrasa carbónica [35, 36] y como se mencionó anteriormente de la α -lactalbúmina [29] se forma rápidamente y antes que se fije la estructura terciaria.

El estudio de las vías del plegado (ej: $U \leftrightarrow I_1 \leftrightarrow I_2 \leftrightarrow \dots \leftrightarrow I_n \leftrightarrow N$) se hace muy complicado o imposible para proteínas pequeñas con un único dominio, porque generalmente no se observan intermediarios. Su ausencia, es explicada en el modelo *framework* por la *existencia de una alta cooperatividad* en el proceso de plegado, que hace muy poco estables a los intermediarios y aproxima el proceso a un sistema de dos estados (N y U). Estos sistemas pueden abordarse con experimentos de cinética del plegado en solventes en los que los intermediarios se estabilizan. Un ejemplo son los experimentos realizados para caracterizar el proceso de plegado de la ribonucleasa A por pulsos de intercambio de hidrógeno (2H-1H) [37]. Los resultados de estos experimentos indicaron la presencia de un intermediario temprano en el que la lámina β está protegida, sugiriendo que ésta se forma antes que el resto de la estructura. Los autores detectaron que el factor de protección de intercambio aumenta con el tiempo de plegado, pudiendo inferir que, si bien su formación es temprana, eventos subsecuentes la estabilizan, y proponen que esta estabilización se alcanza a través de interacciones hidrofóbicas de cadenas laterales. Otro ejemplo es el de la interleukina-1 β , una proteína con estructura β , en la que el 90 % de la estructura β es detectada por CD a los 0.025 segundos de iniciado el replegado. En este caso, los experimentos de intercambio de hidrógeno comienzan a detectar formación de estructura terciaria luego del primer segundo de reacción. Esta discrepancia entre CD e intercambio refleja que, aunque la topología temprana es β , la protección de los hidrógenos amida requiere mayor estabilidad dada por el empaquetamiento posterior [38].

Rompecabezas

En el año 1985, Harrison y Durbin [39] propusieron un modelo cualitativo para el mecanismo de plegado. Por analogía con el juego de el rompecabezas, recibió el nombre de

jigsaw puzzle model. Los autores sugirieron que las proteínas se pliegan por vías alternativas paralelas y no por una secuencia de eventos definida. Incluso para proteínas pequeñas con unos pocos microdominios, estos, por combinatoria, podrían generar un importante número de vías alternativas para alcanzar la estructura nativa. Este modelo podría representar un caso límite de la teoría de difusión y colisiones y su aplicación podría ser dependiente de características específicas de ciertas proteínas en relación a las propiedades de los microdominios y sus interacciones. Llevado al extremo, sería equivalente a armar el 'rompecabezas' comenzando por cualquier pieza. Se generarían así núcleos de plegado y la estructura crecería entorno a estos centros, pero cada molécula elegiría su propia vía hacia el estado nativo.

El colapso hidrofóbico

A fines de la década del 70 surgió la hipótesis de que un 'colapso hidrofóbico' podría tener lugar antes de la formación de estructura secundaria y terciaria. Bajo condiciones de replegado, el polipéptido adoptaría conformaciones compactas, incrementando notablemente la probabilidad de alcanzar la topología nativa. El efecto hidrofóbico es, para este modelo, la fuerza impulsora del plegado y, en definitiva, responsable de la deshidratación del *core*, dando lugar a intermediarios sin estructura terciaria fija, con estructura secundaria parcial y con un volumen muy similar al nativo. Los elementos de estructura secundaria más inestables podrían estabilizarse posteriormente. Dicho de otra forma, la formación de estructura secundaria nativa (fija) podría estar dirigida por interacciones terciarias, existentes en la estructura del intermediario o incluso por la topología global que adopta la cadena polipeptídica restringiendo el espacio conformacional. Hay indicios de que el colapso y la aparición de estructura secundaria podrían darse de manera simultánea [40].

Nucleación-condensación

En el mecanismo de *nucleation-condensation* o *nucleation-collapse* [41, 42] un grupo de residuos adyacentes forma un núcleo, pero a diferencia de la visión clásica de ‘nucleación’, en la que el núcleo es fuertemente localizado, por ejemplo dos o tres vueltas de hélice α , este modelo predice un núcleo local inestable, que se estabiliza o consolida como consecuencia de interacciones de largo alcance y que, en definitiva, a su vez, extienden el núcleo. La formación del núcleo no es el paso limitante porque para que éste se establezca una fracción importante de la cadena polipeptídica debe estar correctamente posicionada para proveer los contactos de largo alcance que estabilizan al núcleo. Debe haber entonces un número crítico de interacciones locales y de largo alcance del que depende el plegado global [42]. Un ejemplo es el inhibidor de proteasas CI2, un polipéptido α/β de 64 residuos. En este caso no hay elementos de estructura secundaria completamente formados en el estado de transición, que por otro lado tiene estructura expandida. La estructura secundaria y la terciaria se forman paralelamente. Este modelo podría proveer el marco teórico para cada unidad de plegamiento en proteínas complejas.

Plasticidad del mecanismo de plegado

Las visiones actualizadas de los modelos del *framework* y *Diffusion-Collision* se solapan. Un elemento de estructura secundaria estable o parcial (microdominio elemental), debería sin duda difundir y colisionar con otro o con un conjunto de microdominios para formar después un dominio mediante un ajuste fino (empaquetamiento). Las estabilidades de los elementos de estructura secundaria en forma aislada podrían ser muy variables. De esta forma ambos modelos coinciden en que el plegado es un proceso jerárquico en el que se forman primero estructuras simples con estabilidad marginal, dada por interacciones locales en la secuencia, que posteriormente se agrupan para formar estructuras más complejas.

¿Existe un único mecanismo de plegado? Esto parece poco probable teniendo en cuenta las evidencias experimentales. Que el plegado sea un proceso concertado, o en pasos sucesivos, podría depender de la estabilidad de las subestructuras individuales, por ejemplo, si son inestables en sus formas aisladas, la estructura final se forma de manera concertada, *nucleation-condensation*. Si las subestructuras individuales fueran suficientemente estables, en forma independiente, podrían alcanzar el estado nativo siguiendo un modelo de *framework* o *Diffussion-Collision*.

Las proteínas estudiadas no siguen un único modelo y aún hoy luego de treinta años de controversia, cada modelo mecanístico tiene sus adeptos y ninguno se impone claramente sobre los otros.

Una visión nueva del plegado

Conceptos nuevos

Hace algunos años se propuso una visión del plegado alternativa que permite sortear la paradoja de Levinthal y generar hipótesis con respecto al mecanismo de plegado. Esta visión surgió de la simulación extensiva en computadoras de los cambios conformacionales posibles para representaciones simplificadas de la cadena polipeptídica. En estas representaciones los residuos son considerados esferas de dos tipos, polares (P) y no polares (NP), y su ubicación en el espacio está limitada por la conectividad de la cadena y la localización en un enrejado cúbico [43]. La energía de las interacciones entre esferas es asignada como favorable o desfavorable, de acuerdo a su carácter en polaridad. Para un número pequeño de residuos pueden ser enumeradas todas las conformaciones y su energía puede ser evaluada. Para estas proteínas conocidas como '*toy proteins*' el estado nativo es aquel que presenta el mayor número de contactos favorables (NP-NP, P-P) y máxima

compactación. Mientras los modelos fenomenológicos anteriores usan símbolos para representar cada conformación (U o D, el estado desplegado; T_{\ddagger} , el estado de transición; I, estados intermediarios), los nuevos modelos teóricos, basados en la mecánica estadística, reconocen que esos estados macroscópicos son en realidad ‘conjuntos moleculares’ de conformaciones. La nueva visión [44] reemplaza el concepto de ‘vía de plegado’ (eventos secuenciales) con conceptos como ‘superficie conformacional’, ‘embudos de energía’ y ‘eventos paralelos’.

En estas superficies conformacionales con forma de embudos (ver Figura 5) se representa en forma gráfica el conjunto de todas las trayectorias conformacionales posibles por las que atraviesa la cadena principal desde el conjunto de estados desplegados (U) hacia la forma nativa. El eje z del esquema representa el descenso de energía interna de la cadena. El área del embudo para cada nivel de energía, una franja determinada de energía, es proporcional a la entropía del conjunto. Las conformaciones que son geoméricamente similares son cercanas en la superficie del embudo. El proceso cinético puede representarse como el trazo producido por una bola al desplazarse por el embudo. La clave del modelo consiste en que cuando la energía interna y la entropía se compensan adecuadamente, el paisaje conformacional adquiere forma de embudo y esencialmente todo cambio conformacional es ‘colina abajo’, acercando la molécula al estado nativo, independientemente de la conformación inicial.

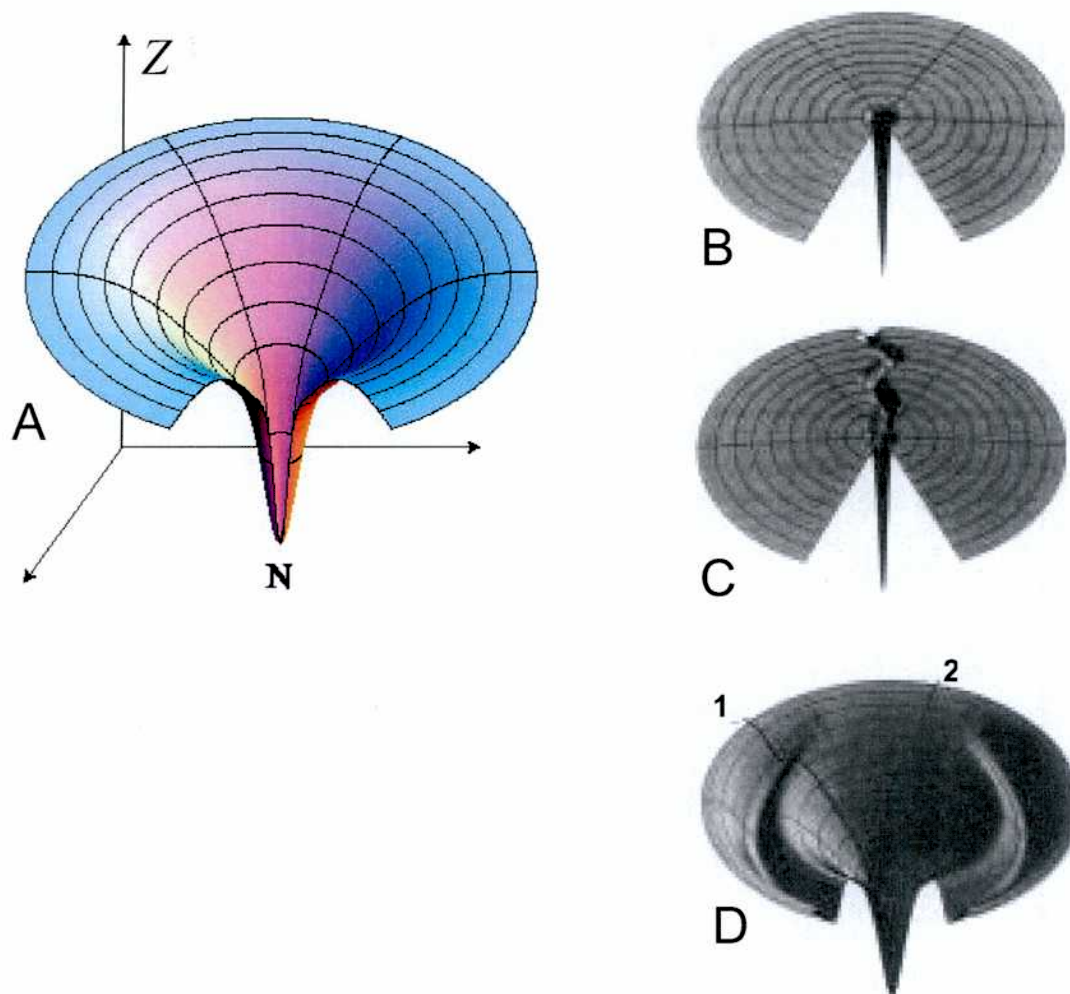


Figura. 5 La 'nueva visión' del problema del plegado. Este tipo de superficies con forma de embudos representan el conjunto de todas las trayectorias posibles que conducen a una proteína desde el conjunto de estados desplegados (U) hacia la forma nativa (N). El eje z representa el descenso de energía interna para una dada configuración de la cadena polipeptídica. Los infinitos puntos en la superficie del embudo enumeran cada una de las conformaciones discretas que puede adquirir la cadena polipeptídica. Nótese que el número de conformaciones (entropía) disminuye a medida que disminuye la energía del sistema. El panel A, muestra un paisaje suave, sin frustración, sin trampas cinéticas, típicamente representa proteínas de plegado rápido y en dos estados. El panel B representa el caso de máxima frustración (paisaje tipo 'campo de golf') de la paradoja de Levinthal. La cadena busca la conformación nativa suponiendo un nivel plano de energía y por esto no llega en un tiempo razonablemente corto al estado nativo. Además, no hay correlación entre la energía de una conformación y la cercanía al estado nativo. El panel C, representa cómo se solucionaba la paradoja con la vieja visión: una vía de plegado. En el panel D, un paisaje algo más complicado que el del panel A, un camino lento (1) y uno rápido (2) con barreras cinéticas y con un estado intermedio.

Las cinéticas de plegado rápido, de dos estados, se corresponden con embudos suaves, sin trampas cinéticas significativas. Las cinéticas multiexponenciales, por el contrario, son representadas con embudos con superficies complejas, accidentadas, rugosas o con valles. En este nuevo contexto la paradoja de Levinthal deja de ser una paradoja. Llegar al mínimo global y hacerlo rápidamente dejan de ser dos aspectos mutuamente excluyentes. La paradoja es simplemente el producto de considerar el problema del plegamiento en términos del paisaje tipo 'campo de golf' (Figura 5B), en el que la cadena busca la conformación nativa suponiendo un paisaje plano de conformaciones. En este caso todas las conformaciones están igualmente alejadas del estado nativo en términos energéticos por lo que la chance de encontrar el estado nativo se desvanece. La búsqueda conformacional que propone la nueva visión del proceso de plegado es más directa, cada conformación alternativa del conjunto de las moléculas desplegadas se reconfigura rápida y progresivamente hacia el estado nativo. Existen entonces procesos paralelos y conjuntos de conformaciones a los que se llega por distintas secuencias de cambios de ángulos diedros y no por ensamblado secuencial de estructuras específicas y homogéneas. En definitiva una vía está definida por una ruta unidimensional a través del espacio conformacional, mientras que los embudos, primero multidimensionales, reducen progresivamente la 'dimensión' del espacio conformacional hacia el estado nativo (prácticamente sin grados de libertad). Los intermediarios ahora pueden explicarse como mínimos de energía locales (ver Figura 5D), valles en el embudo, o alternativamente trampas de alta entropía configuracional. En este último caso las moléculas deben gastar mucho tiempo de búsqueda (regiones llanas en el embudo). La prueba experimental del modelo requiere demostrar que el cambio de cada par de ángulos diedros no está correlacionado con el cambio de ningún otro par [44].

Las partes superiores del embudo conformacional han sido de difícil acceso experimental porque los primeros eventos ocurren muy rápidamente. Por esto, hasta recientemente, se han estudiado las regiones más profundas, cercanas al estado nativo con barreras energéticas considerables. Sin embargo, hace muy poco tiempo comenzaron a realizarse experimentos de replegado en escala de los micro y de los nanosegundos [45-48].

Frustración energética y topológica

En la nueva visión, una secuencia que es capaz de plegarse en una estructura bien definida es considerada como de mínima frustración. El balance entre interacciones nativas y no nativas en el proceso de plegado determina el grado de 'frustración'. Si en el proceso de plegado las interacciones nativas no entran en conflicto con otras (no nativas), estamos en el caso de mínima frustración. Para este tipo de secuencias, cada parte de la cadena es a su vez un mínimo energético. El resultado es un embudo con una superficie suave y un plegado rápido. En el extremo opuesto, en el caso de máxima frustración, el estado nativo es un mínimo pero no hay ninguna pieza que aisladamente lo sea, la similitud estructural con el estado nativo no está correlacionada con la energía, en otras palabras, midiendo solamente la energía no se puede saber cuán cerca del estado nativo se está (nuevamente el paisaje es un campo de golf, ver Figura 5B) y el plegado se vuelve prácticamente imposible (paradoja de Levinthal). Además del factor de frustración energética la topología final que adopta la cadena polipeptídica puede jugar un rol dominante en la capacidad de plegado de una secuencia dada (hay topologías sencillas y otras complicadas, con orden de contacto variable (se define el orden de contacto, largo o corto, a partir de la separación secuencial de residuos que interactúan en la estructura plegada, ver Figura 6). El grado de frustración topológica depende, desde un punto de vista práctico, de la dificultad que exista en el diseño de secuencias que se plieguen rápidamente en la estructura final. Las proteínas

reales poseen distintos grados de frustración energética y topológica. Cambios en el grado de frustración energética o topológica pueden determinar cambios en el mecanismo de plegado [49, 50].

Existe mucho interés en contrastar la nueva visión del plegado con los sistemas reales. Un caso interesante, reportado recientemente, es el de la proteína S6 permutada [51]. Esta proteína no presenta intermediarios cinéticos ni de equilibrio. Su estado de transición posee interacciones de largo y corto alcance, distribuidas homogéneamente en la secuencia, un hallazgo típico en proteínas con sólo dos estados durante el plegado. En S6, todas las partes de la proteína deben adquirir estructura simultáneamente (lo mismo ocurre en el caso de CL2, el inhibidor de quimiotripsina). Una variante circularmente permutada de S6, que se pliega correctamente posee en cambio un intermediario cinético y el estado de transición, a diferencia de la proteína salvaje, posee un *cluster* de interacciones de corto alcance bien definido. Este resultado muestra que es posible modular experimentalmente el grado de frustración de la cadena sin alterar la estructura 3D final. En las secuencias 'ideales' no sólo se favorecen las interacciones nativas (que en este caso son todas igualmente importantes) sino que se desfavorecen los contactos no nativos. La compensación entre entropía conformacional y entalpía produce una superficie de embudo suavizada. La barrera energética entre el conjunto U y el estado N se produce como consecuencia de un desbalance entre entropía y entalpía, asociado con una fracción de contactos nativos en la coordenada de búsqueda conformacional, dando lugar al estado de transición del sistema.

En las secuencias reales, por el contrario, existen interacciones nativas repulsivas, la superficie de los embudos reales suele ser complicada y rugosa. Se ha visto en algunos casos que, como para las secuencias de mínima frustración, el conjunto de conformaciones

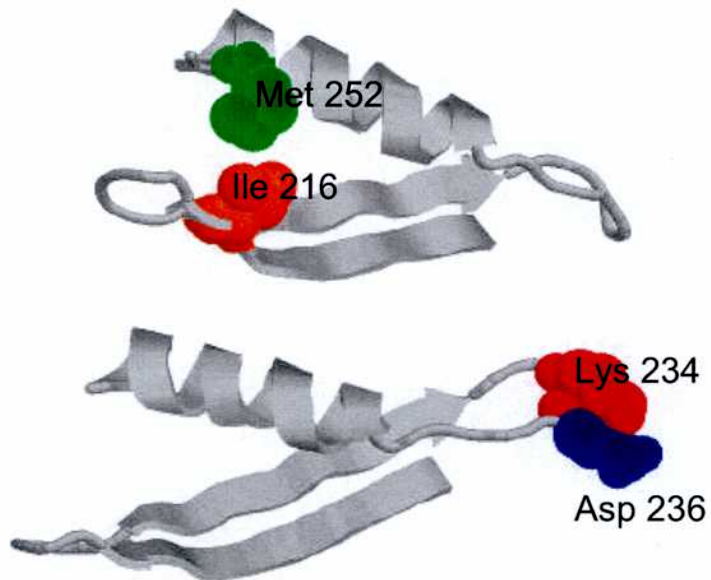


Figura 6. Orden de contacto. Este parámetro se define en función de la separación secuencial de dos residuos que interactúan. Se considera que existe un contacto entre dos átomos si estos están separados por no más de 5 Å. Por ejemplo, el orden de contacto de la interacción entre Met 252-Ile 216 es mayor que el de Lys 234-Asp 236 ya que el primer par de residuos está separado por 35 residuos, en cambio, el segundo par está sólo separado por un residuo. El orden de contacto global para una proteína se correlaciona con su complejidad topológica.

que forma el estado de transición real posee interacciones no localizadas, pero a su vez posee un grado de heterogeneidad estructural importante [52]. La participación de cada contacto puede ser medida experimentalmente a partir de los valores Φ de Fersht [42].

Otros modelos actuales relacionados

Unidades autónomas de plegado y fragmentos

El plegado en módulos fue postulado por Wetlaufer [53, 54] como una manera de resolver la paradoja de Levinthal. Si distintas partes de la cadena pudieran realizar la búsqueda conformacional en forma independiente, la cadena completa podría plegarse en tiempos razonables. Siguiendo este concepto, fueron definidas las ‘unidades autónomas de plegado’ (*AFUs*) [55], como subestructuras capaces de adoptar el plegado nativo en forma aislada del resto de la cadena polipeptídica. Originalmente se pensó que el análisis de las *AFUs* podría proveer información sobre los principios que gobiernan el plegado y simplificaría el problema del plegamiento desde un punto de vista computacional. En la definición de las *AFUs* está implícito el concepto de las interacciones que definen subestructuras locales e interacciones que participan en el ensamblado global de la macromolécula. La caracterización de las primeras podría ayudar a comprender cómo se codifica la información para el plegado (por ejemplo si se trata de información local en la secuencia o no). La caracterización del segundo tipo de interacciones permitiría entender cómo se produce el reconocimiento entre bloques y cómo se lleva a delante el proceso de unión o ensamblado. Se han propuesto algoritmos de predicción de *AFUs* que permitirían su identificación a partir de la estructura nativa [55, 56, 57]. También se han utilizado diversas metodologías experimentales para identificar *AFUs*. Los experimentos clásicos hacen uso de proteólisis limitada, con eficacia demostrada para disecar dominios completos [58, 59]. En los últimos años, con el advenimiento de las técnicas de biología molecular, se

produjeron numerosas proteínas fragmentadas o abreviadas, la barnasa, la nucleasa de *S. aureus*, la Rnasa H, la adenilato kinasa, la termolisina, el represor triptofano, el citocromo C, la triptofano sintetasa, la mioglobina, y la iFABP entre muchas otras. Algunos de estos fragmentos de proteína poseen estructura terciaria definida e incluso actividad biológica. Otros, en cambio, alcanzan sólo estados intermedios de plegado y serán discutidos posteriormente en detalle. Diversas razones llevan a pensar que las interacciones terciarias de largo rango son requeridas para fijar la estructura final.

Las *AFUs* se corresponden con las unidades hidrofóbicas de plegado, unidades termodinámicamente estables, independientes, compactas y con un *core* hidrofóbico, que fueran propuestas por R. Nussinov y colaboradores [60]. Las unidades hidrofóbicas de plegado, a su vez, se forman por el ensamblado combinatorio de bloques de construcción más pequeños o *Building Blocks* [61]. Estos bloques son fragmentos contiguos en secuencia (por lo menos de unos quince residuos) con cierta estabilidad y pueden estar asociados a estructura secundaria o super secundaria. Los embudos conformacionales y la ‘nueva visión’ (ver arriba) proveen un sustento teórico para las *AFUs* anticipando, para proteínas pequeñas de plegado rápido, que el plegado es un proceso de mínima frustración energética, garantizado en parte por el carácter local de las interacciones. Cada bloque constituiría primero una estructura en un mínimo local de energía. La subsiguiente asociación y estabilización mutua de las *AFUs* produciría el plegado final (mínimo global del sistema). En este caso cada *building block* poseería su propio embudo de plegamiento. Alguno de los bloques podría ser más importantes que otros a la hora de ‘dictar’ el plegado correcto de la cadena polipeptídica. En algunos casos la ausencia de un módulo determinado podría permitir la asociación incorrecta (no nativa) del resto [62].

El modelo experimental, la β -lactamasa

Aspectos generales de las β -lactamasas

Los antibióticos β -lactámicos inhiben un grupo de proteínas conocidas como 'proteínas de unión a penicilina' (*PBP*s), que poseen actividad transpeptidasa y juegan un papel muy importante en la construcción de la lámina de péptido glicano bacteriano. La inhibición de las *PBP*s durante el crecimiento bacteriano resulta en la construcción incompleta de la pared y tiene como consecuencia la muerte celular por lisis osmótica.

Las β -lactamasas bacterianas, destruyen con alta eficiencia a los antibióticos β -lactámicos (penicilinas y cefalosporinas), mediante la catálisis de la ruptura del anillo β -lactámico (Figura 7A). La mayor parte de las β -lactamasas poseen en su centro de catálisis una serina, la gran excepción son las metalo β -lactamasas, que poseen un centro catalítico con zinc. Se han descrito un gran número de β -lactamasas y cada año se descubren y caracterizan nuevos miembros de cada clase. En 1980 Ambler propuso una clasificación en base a la estructura primaria [63]. Esto permitió identificar cuatro clases. Las clases A, C y D en conjunto con las *PBP*s, forman parte de la superfamilia de las peniciloil serina transferasas. La clase B corresponde a las metalo β -lactamasas mencionadas anteriormente. Las β -lactamasas de clase C están codificadas en el cromosoma bacteriano de bacterias Gram negativas, principalmente las Enterobacteriaceae, y sus secuencias conocidas son altamente conservadas. En cambio, las secuencias de las β -lactamasas de clase A, aunque claramente homólogas, exhiben un grado de variabilidad mucho mayor. Las clases A y C podrían haber evolucionado de las transpeptidasas bacterianas que transfieren péptidos X-D-Ala-D-Ala a el péptidoglicano en crecimiento durante la síntesis de pared extracelular. Sólo las DD-peptidasas reconocen péptidos de pared, pero los miembros de la clase C exhiben

A

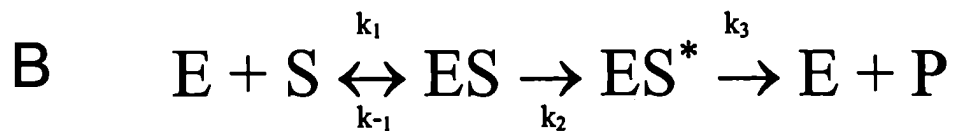
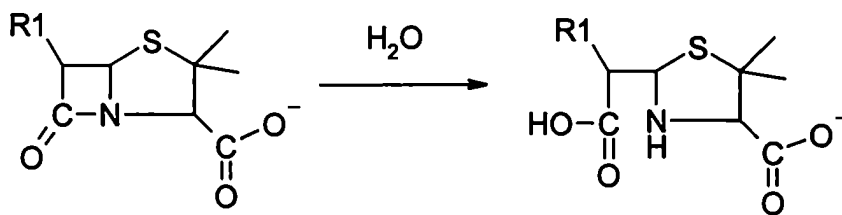


Figura 7. La reacción enzimática catalizada por las β -lactamasas. A, degradación de la penicilina. B, un esquema del mecanismo cinético en tres pasos. E es la enzima, S es el sustrato, ES es un complejo no covalente Henri-Michaelis, ES^* es el complejo covalente acil-enzima, P es el producto hidrolizado, biológicamente inactivo.

significativa actividad esterasa, mientras que los miembros de clase A son, en este sentido, completamente inactivos .

Todas las serin β -lactamasas y las PBPs de estructura conocida comparten un plegado general similar. Estas enzimas también se caracterizan por poseer tres patrones secuenciales conservados que están localizados en posiciones similares del sitio activo. El primer motivo SXXK incluye a la serina catalítica. El segundo motivo, (S/Y)XN, muestra cierta variabilidad entre clases, las de clase A y las PBPs usualmente poseen SXN, mientras que las de clase C y D poseen YXN y SXV, respectivamente. El tercer motivo conservado es la tríada K(T/S)G. Las clases A y D poseen adicionalmente una base general, que en cada clase está conservada. En la clase A es el Glu166 (ver más adelante). Además en las enzimas de clase D la lisina del motivo SXXK se encuentra carbamilada. La evidencia de la participación de este grupo funcional como base general está dada por la dependencia que tiene la actividad enzimática con la concentración de CO₂. Las enzimas de clase C y las PBPs aparentemente no poseen un residuo adicional con estas características químicas. A diferencia de las PBPs, en el sitio activo de las β -lactamasas de clase C se ha identificado una red de puentes de hidrógeno que parecería ser clave en la catálisis y en la transmisión de cargas del sistema [64]. La catálisis de las serin β -lactamasas puede representarse esquemáticamente con un modelo de tres pasos (Figura 7B). Usualmente la reacción es caracterizada mediante K_{cat} y K_M , que describen la máxima velocidad de hidrólisis y la afinidad por el sustrato, respectivamente. Una β -lactamasa eficiente posee por lo tanto una alta K_{cat} pero además el cociente K_{cat}/K_M también es elevado. Este último valor refleja la velocidad de acilación. El mismo esquema puede aplicarse a la interacción entre los β -lactámicos y las PBPs, pero en este caso k_3 (Figura 7B) es muy pequeña.

Desde un punto de vista epidemiológico la β -lactamasa de clase A TEM-1, codificada por DNA plasmídico, es la β -lactamasa más común en bacterias Gram negativas. Fue identificada en aislamientos de *E. coli* y *Salmonella paratyphi* en el año 1965, poco después de la introducción de la ampicilina para el uso clínico. En 1979 fue identificada en 28 especies de bacterias Gram-negativas y en *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Pseudomonas aeruginosa*. La aparición de variantes resistentes a antibióticos β -lactámicos y a inhibidores de las serina β -lactamasa a progresado con una velocidad alarmante. Actualmente la búsqueda racional de antibióticos e inhibidores en base a la evaluación estructural de estas mutantes resistentes, emergentes o producidas en el laboratorio, se ha convertido en un campo fundamental para la contención de estos organismos patógenos [65]. Acompañando a mutaciones que incrementan la eficiencia en la catálisis de antibióticos y la resistencia a inhibidores como el ácido clavulánico, se seleccionan también mutaciones que actúan alterando la vía de plegado impidiendo la estabilización de estructuras parcialmente plegadas e inhibiendo la formación de agregados sin afectar la estabilidad termodinámica del estado nativo [66]. En otras palabras, mutaciones que optimizan el plegado de la enzima.

β -lactamasas de clase A

Estructura general

Son moléculas globulares monoméricas de tamaño intermedio (~30kDa) con una topología general compleja. Poseen dos dominios: uno α/β y otro α . El primero está formado por una lámina β central de cinco hebras cubierta por tres hélices- α superficiales (dos de ellas son las hélices N y C-terminales). El segundo es un arreglo de elementos helicoidales (de ocho a 11 hélices y dos pares pequeños de cordones β). El sitio catalítico está ubicado en la

interfase de ambos dominios. En la Figura 8 se muestra un alineamiento estructural de algunos miembros de la clase A.

Actividad enzimática y sitio activo

El mecanismo catalítico de las β -lactamasas de clase A comprende el ataque nucleofílico al grupo carbonilo del anillo β -lactámico por el hidroxilo de la serina para rendir el ester intermediario correspondiente. Aunque los mecanismos finos de acilación o deacilación están aún en debate, se sabe que el sitio activo es complejo. Una serie de residuos y moléculas de H_2O participan en estos procesos, entre estos, la Lys73 y la Ser130 son importantes en la formación del intermediario acil-enzima. Por otro lado el Glu166, un residuo conservado (base general) que posee un bajo valor de accesibilidad al solvente – 1.5 \AA^2 , 0.8 % con respecto al grado de exposición en el tripéptido Gly-Glu-Gly– ubicado en el *loop* omega (~16 residuos), está vinculado en una primer etapa a la activación de la Ser catalítica para el ataque nucleofílico. Posteriormente el Glu166 participa en la activación de una molécula de agua estructuralmente conservada en el paso de deacilación necesario para la regeneración de la enzima libre. La eliminación del *loop* omega en la β -lactamasa de *S. Aureus* (PC1), impide la hidrólisis de penicilina y disminuye la velocidad de hidrólisis de cefalosporinas unas 1000 veces [67]. La Arg244 ubicada sobre la hebra β_4 participa en interacciones con el sustrato. La Ala237 situada en la hebra β_3 interacciona con el sustrato a través del grupo amida y del carbonilo quienes ayudan a posicionar correctamente al grupo carbonilo del anillo β -lactámico para su deacilación. La Asn132 posee un rol crucial en el posicionamiento adecuado de los sustratos β -lactámicos [68].

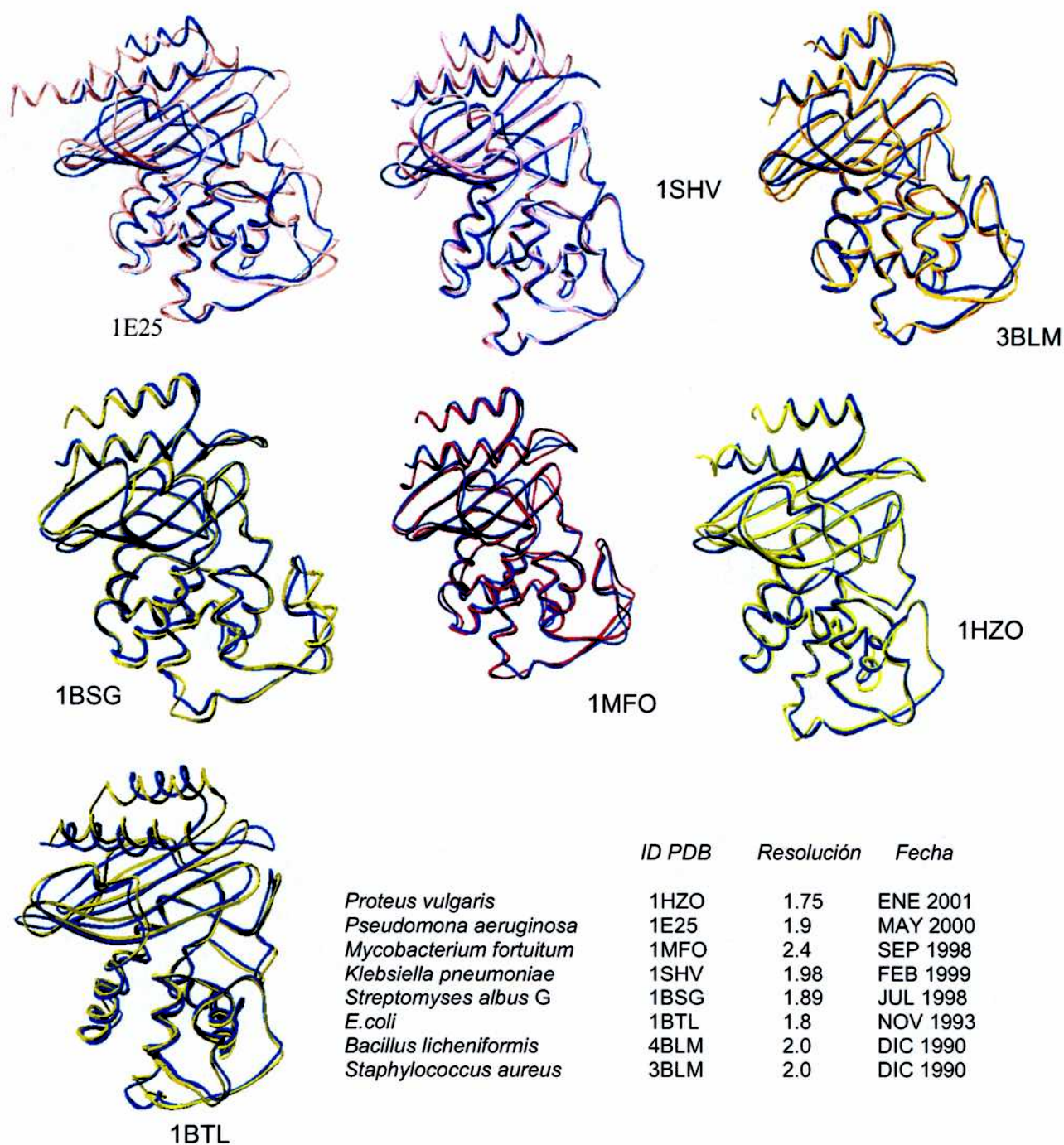


Figura 8. Alineamiento estructural de β -lactamasas de clase A. En todos los casos en color celeste se muestra el esquema de cintas de la β -lactamasa de *B. licheniformis*. Los alineamientos estructurales de los átomos del backbone fueron realizados con el programa Swiss-Pdb Viewer 3.7 (Glaxo Wellcome Experimental Research).

Experimentos de plegado y caracterización de estados conformacionales

Las β -lactamasas de clase A son proteínas estables y compactas (Tabla 1). Como se dijo anteriormente, poseen gran variabilidad de secuencia pero con un grado elevado de homología estructural. En todos los casos estudiados se han encontrado diversos intermediarios o estructuras parcialmente plegadas estabilizadas en concentraciones intermedias de desnaturalizantes (urea, GdmCl y bajos pHs en presencia de sales) en el equilibrio. También se han encontrado intermediarios cinéticos. Algunos estados no nativos han sido ampliamente caracterizados, como por ejemplo, el estado H (GdmCl, 0.8 M) que posee cerca del 60 % de estructura secundaria y no posee interacciones terciarias fijas [32]; el estado I observado en cinéticas a bajas temperaturas más compacto que H pero más expandido que el estado nativo y con el 85 % de estructura secundaria, pero con una reducción dramática de interacciones terciarias presentes en el estado nativo determinadas por CD y RMN [69]; el estado A, un estado compacto inducido por el agregado de KCl a pH 2, con contenido de estructura secundaria pero sin estructura terciaria definida [70], aunque la dinámica de ciertas cadenas laterales del sitio activo podría ser similar a la nativa [71]. El desplegado a alta temperatura de la β -lactamasa se ha estudiado mediante dinámica molecular. Se halló que podría existir estabilidad diferencial de hélices α y láminas β frente al desplegado térmico, dando lugar a posibles intermediarios en los que prevalece la lámina β frente a la estructura helicoidal. Llamativamente, la hélice α N-terminal (altamente expuesta al solvente) permanece estable durante toda la simulación. En cambio la hélice α C-terminal, que posee menor exposición al solvente en el estado nativo, se desestabiliza y se despliega completamente. Mediante digestión proteolítica a 48 °C se ha podido demostrar que se estabiliza un intermediario con la hélice α C-terminal desplegada

Tabla 1. β -lactamasas de clase A para las cuales se describieron estados parcialmente plegados

| Organismo | Variante | Estabilidad (N \leftrightarrow U) | Radio (Å) | Referencia |
|-------------------------|-----------|--|-----------------|------------|
| <i>B. licheniformis</i> | exo-small | 8 kcal mol ⁻¹ | 25 (29500 Da) | [81] |
| <i>E. coli</i> | RTEM | 6.5 kcal mol ⁻¹ | 24.5 (29000 Da) | [111] |
| <i>S. aureus</i> | PC1 | 6 kcal mol ⁻¹ | 23.5 (30000 Da) | [34, 114] |

pero que conserva una superficie hidrofóbica considerable capaz de interactuar con la chaperona GroEL [72].

Péptido señal y efecto en el plegado

La β -lactamasa es una molécula de localización periplasmática. Por lo tanto debe ser translocada desde el citoplasma para ejercer su función biológica. En el caso general de las 'proteínas de exportación' se ha podido determinar que contienen una secuencia auxiliar o 'péptido señal' que codifica información para la ubicación subcelular y modula el plegado. El péptido señal posee un efecto notable sobre las estabilidades relativas del estado desplegado y estado nativo (efecto termodinámico) y sobre la velocidad de plegado y desplegado (efecto cinético) [73, 74]. Se ha postulado que, *in vivo*, la interacción del péptido señal con regiones hidrofóbicas de la molécula la mantiene parcialmente desplegada, y de esta manera, permite la interacción con chaperonas y otras moléculas de los distintos sistemas de exportación de proteínas [75, 76].

La β -lactamasa de *Bacillus licheniformis*

Expresión

El gen de la β -lactmasa de *B. licheniformis* (*Bacillus licheniformis* 749/C β -lactamasa, BL- β L, penicillin amido- β -lactamhydrolase, EC 3.5.2.6) es cromosomal y codifica para una preproteína de 307 residuos (Figura 9A), de los cuales los primeros 34 residuos comprenden la señal de secreción y anclaje a membrana. Después de la exportación y de la remoción proteolítica de los primeros 26 residuos, la lactamasa permanece unida a membrana a través de un tioester entre la Cys27 y un diacilglicérido, procesada y orientada externamente como lipoproteína unida a membrana. Además, por acción de proteasas, una fracción de las moléculas puede perder los primeros 34 residuos originando la variante soluble *exo-large* (Fig 9B). Posteriormente, esta variante puede sufrir una segunda

digestión en el N-terminal para rendir la variante *exo-small* de 264 aminoácidos [77-80]. Cuando el precursor BL-βL es expresado en *E. coli*, la proteína es exportada, procesada y orientada externamente como lipoproteína unida a membrana. Pero una variante en la que se ha removido el motivo de anclaje, incluyendo la Cys27 y el sitio de corte de la peptidasa de la señal de exportación, es translocada sin sufrir procesamiento y también queda unida al lado externo de la membrana interna. Una proteasa aún no identificada libera de esta variante la forma *exo-large*.

La sobreexpresión en *E. coli* de la variante más corta, *exo-small* (ES-βL) rinde 100 % de proteína soluble, correctamente plegada [81]. Curiosamente la variante ES-βL se obtiene masivamente en el fluido de *shock* osmótico en su conformación nativa [81]. No obstante, las células que expresan esta variante no son resistentes a la ampicilina cuando son crecidas en medio sólido (resultados del laboratorio no publicados), mostrando que la β-lactamasa no posee realmente ubicación periplasmática. La extracción en fluido osmótico puede relacionarse con aspectos mecánicos del procedimiento y con una ubicación citoplasmática atípica (cercana a la membrana interna). Este tipo de comportamiento ha sido descrito para otras moléculas, entre las que se encuentran algunas subunidades ribosomales, DnaK, tioredoxina entre otras [82-84].

Estructura de ES-βL

La secuencia de aminoácidos completa de ES-βL se muestra en la Figura 9. Su estructura 3D a alta resolución (2 Å) se conoce desde hace varios años [85]. Cuenta con 19 % de lámina β, 35 % de hélice α y 7 % de hélice_{3,10}. La estructura de la β-lactamasa de *B. licheniformis* es básicamente superponible a la del resto de las lactamasas de clase A (Figura 8). En el año 2002 pudo resolverse la estructura de la enzima BS3 (que difiere en

A

MKLWFSTLKL KKAAVLLFS CVALAGCANN QTNASQPAEK NEKTEMKDDF AKLEEQFDAK
LGIFALDTGT NRTVAYRPDE RFAFASTIKA LTVGVLLQOK SIEDLNQRIT YTRDDLNVYN
PITEKHVDTG MTLKELADAS LRYSDNAAQN LILKQIGGPE SLKKELRKIG DEVTNPERFE
PELNEVNPGE TQDTSTARAL VTSLRAFALE DKLPSEKREL LIDWMKRNTT GDALIRAGVP
DGWEVADKTG AASYGTRNDI AIIWPPKGDV VVLAVLSSRD KKDAKYDDKL IAEATKVVMK
ALNMNGK

B

MKLWFSTLKL KKAAVLLFS CVALAGCANN QTNASQPAEK NEKTEMKDDF precursor
CANN QTNASQPAEK NEKTEMKDDF lipoproteína
QPAEK NEKTEMKDDF exo-large
TEMKDDF exo-small
MTEMKDDF exo-small*

Figura 9. A, secuencia completa del precursor de la β -lactamasa de *B. licheniformis*. B, variantes producidas durante y con posterioridad al proceso de translocación de la membrana plasmática (ver texto). *la secuencia N-terminal de la variante recombinante estudiada en este trabajo de tesis.

sólo siete residuos de la 749/C) y del complejo acil-enzima con cefoxitin a 1.7 Å de resolución. La estructura de los primeros cinco y los últimos cuatro residuos no ha podido ser determinada en ningún caso, presumiblemente debido a su alta movilidad. Sin embargo, como se muestra en la Figura 8, en varios representantes de la clase A, la estructura helicoidal del extremo N-terminal se prolonga. Incluso, en la estructura preliminar de ES-βL (2BLM) los residuos N-terminales forman parte de la hélice α , por lo que no puede descartarse un grado de estructuración mayor para los primeros cinco residuos. Se han reportado y caracterizado estructuras parcialmente plegadas de ES-βL estabilizadas tanto en GdmCl como en medio ácido con la adición de sales [71, 81]. Su plegado es aparentemente complejo y multifásico. Posee tres triptofanos once prolinas, y ninguna cisteína. Su pI es 5.15 y su peso molecular teórico, considerando el promedio isotópico, es de 29508.96 Da.

HIPÓTESIS SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE LA INFORMACIÓN PARA EL PLEGADO EN LA SECUENCIA DE ES- β L

Existen pruebas de que la información para que la cadena polipeptídica adquiriera la estructura nativa no estaría distribuida homogéneamente en la secuencia proteica [86]. En una misma cadena polipeptídica existen fragmentos o bloques que pueden ser eliminados sin producir alteraciones en el plegado final, por lo que no formarían parte del conjunto de residuos determinantes de la estructura 3D nativa. Otros fragmentos aparentemente no pueden ser removidos. La eliminación de estos últimos, muchas veces compromete el proceso de adquisición de estructura terciaria fija, interrumpiéndolo y dando lugar a la estabilización de estados parcialmente plegados, a veces con topología (recorrido de la cadena polipeptídica en el espacio) similar a la nativa [17] y en otros casos, con una asociación no nativa de elementos estructurales [62].

Este conjunto de resultados experimentales podría ser reinterpretado introduciendo un mecanismo general de plegado jerárquico en el que la información podría estar codificada en forma de 'bloques con topología' o módulos. Algunos de ellos podrían ser determinantes de la topología de otros fragmentos no tan estables en su forma aislada, o con cierta tendencia a asociarse de manera incorrecta en ausencia de los primeros.

La confirmación de este tipo de mecanismo sería una clave para poder comprender porqué ciertos estados parcialmente plegados sin estructura terciaria fija poseen topología nativa y también permitiría explicar la presencia de topología y arreglos de estructura secundaria en

presencia de altas concentraciones de agentes caotrópicos. El estudio de las propiedades de los módulos podría contribuir en la predicción de estructura 3D.

Por último, la ES-βL es un buen modelo experimental de proteínas con cierta complejidad topológica para investigar la existencia de módulos como los mencionados más arriba y cómo se balancea en ellos la contribución entre interacciones locales y de largo alcance para la formación de estructura 3D nativa. El concepto modular reemplazaría el plegado concertado del polipéptido por reacciones locales de plegado y reacciones posteriores de unión (*binding*), similares a las que rigen numerosos procesos biológicos, reduciendo considerablemente la complejidad de la búsqueda conformacional del estado nativo.

OBJETIVOS GENERALES

- A) Avanzar en el estudio del plegado de ES-βL.
- B) Identificar la presencia de módulos o subdominios de ES-βL importantes desde el punto de vista del plegado.
- C) Determinar el efecto de la eliminación de información sobre el plegado y la estructura final de ES-βL.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

GENERALIDADES

Electroforesis

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) fue realizada utilizando el sistema de Schägger y von Jagow [87]. La densidad y entrecruzamiento de los geles fue 16.5 % y 6 %, respectivamente, o alternativamente 10 % y 6 %. Las muestras a analizar se diluyeron al medio con un volumen de 'buffer muestra' (Tris HCl 50 mM, glicerol 12 %, azul de bromofenol 0.005 %, SDS, 8 %, pH 6.8) y se les agregó, en el momento, 4 % de β -mercaptoetanol. Paralelamente se preparó un patrón de pesos moleculares adecuado. Luego de un calentamiento a 100 °C durante 5-10 min, se sembró cuidadosamente, con una jeringa *Hamilton*, un volumen determinado (típicamente entre 5 y 20 μ l) de cada mezcla por calle y se dejó correr 1100 Vh (geles 16.5 %) o 250 Vh (geles 10 %). Usualmente se estableció un voltaje constante menor o igual a 100 V y el tiempo de corrida se ajustó de manera que la integral del voltaje en función del tiempo fuera la indicada. Al finalizar la corrida, los geles se desmontaron y se tiñeron con *Coomassie Brilliant Blue R250* 0.3 % en metanol:ácido acético:agua (3:1:6) y luego, se decoloraron en una solución de metanol:ácido acético:agua (3:1:6) hasta la visualización de las bandas. Los geles se conservaron en ácido acético 5 % en agua, o simplemente en agua.

Los geles no desnaturalizantes se prepararon de acuerdo a Walker [88]. La densidad y entrecruzamiento de los geles fue 7.5 y 0.2 %, respectivamente. Las muestras a analizar se diluyeron al quinto con Tris-HCl 0.31 M, azul de bromofenol 0.05 % y glicerol 50 %, pH 6.8 y se sembraron. El gel concentrador se preparó a pH 6.8 y el separador a pH 8.8. A pH 8.8 la β -lactamasa posee carga negativa y por lo tanto migra hacia el polo positivo. La tinción fue como se describió más arriba.

Western blotting

En la transferencia de proteínas a floruro de polivinilideno (PVDF) (Bio-Rad, CA, USA) se utilizó buffer CAPS 10 mM pH 11.0. Posteriormente las membranas fueron incubadas con BSA 5 mg/ml en TBS, (etapa de bloqueo) y luego con una dilución 1:2000 TBST (TBS, Tween 0.05 %) de un suero hiperinmune anti ES-βL obtenido de conejo con un protocolo convencional. Después de tres lavados de 10 min con TBS, tween 0.05 %, se realizó una incubación con un anticuerpo anti FC de conejo conjugado a peroxidasa (Santa Cruz, CA, USA) y un revelado a 20 °C con 4-cloro-1-naftol y H₂O₂.

Espectrometría de masa

Las muestras de proteínas purificadas se acondicionaron con microcolumnas de octadecilsilano (Vydac, Bio-select, CA, USA). Las microcolumnas se equilibraron con 1 ml de acetonitrilo 100 %, luego se lavaron con H₂O, TFA 0.05 %. Las muestras (0.5 ml) fueron filtradas por centrifugación a través de una membrana de 0.22 μm en microtubos (Vanex, NJ, USA) y luego se sembraron por gravedad en las microcolumnas. Se realizaron lavados de 1 ml con concentraciones crecientes de acetonitrilo y se eluyó la muestra con 1 ml de acetonitrilo al 75 %, TFA 0.05 %. Las muestras así acondicionadas se analizaron en un VG Quatro II (Micromass) de cuadrupolo triple con una fuente de ionización electrospray, operando en modo positivo, calibrado con mioglobina equina. El análisis de los datos se realizó mediante el programa Mass Lynx 2.1 (Fisons Instrument, Altrincham, UK). La masa se calculó considerando la abundancia isotópica promedio con la rutina Bio Lynx.

Coeficientes de extinción molar, espectros-UV y concentración de proteína

La concentración proteica se midió por absorción UV a 280 nm en GdmCl, 5 M. Se utilizó para el cálculo el coeficiente de extinción teórico correspondiente, $24750 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, calculado como $\epsilon_{\text{GdmCl } 5\text{M } 280 \text{ nm}} = y \times 1280 + w \times 5690$ donde w es el número de triptofanos e y es el número de tirosinas por molécula [89]. La composición en residuos aromáticos de las variantes preparadas y utilizadas en esta tesis es idéntica a la composición de ES-βL. Para determinar por el mismo método la concentración de lactamasa en soluciones no desnaturizantes, se utilizaron coeficientes de extinción determinados como se describió previamente [86]. Los espectros de absorción fueron adquiridos entre 340 y 240 nm. En los casos en los que se observó *light scattering*, en los espectros se hicieron las correcciones correspondientes (ver más abajo).

Técnicas computacionales para el análisis de la estructura proteica

Para analizar interacciones terciarias se utilizó el programa de visualización molecular Insight II (Molecular Simulations Inc. CA, USA). Cuando no se indica otra cosa, los cálculos realizados a partir de las coordenadas espaciales se hicieron mediante programas en lenguaje C desarrollados en el laboratorio especialmente para este tipo de trabajo. Se utilizó una estación de trabajo Octane Silicon Graphics (SGI, USA) con dos microprocesadores y 256 MB de memoria RAM. La determinación de áreas accesibles fue realizada con el programa ACCESS (M. D. Handschumacher and F. M. Richards, Yale University, 1983) [90, 91], con una sonda de 1.4 Å de radio. Para representar gráficamente elementos sencillos en las estructuras proteicas se utilizó el programa Rasmol (Raswin

Molecular Graphics, 1993-1995, R. Sayle), o alternativamente Swiss-Pdb Viewer 3.7 (Glaxo Wellcome Experimental Research).

Reactividad Química de tioles y conformación proteica, modificación con DTNB

Para la determinación de tioles libres [92] se utilizó 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB); la reacción se realizó en 1 ml de fosfato de sodio 100 mM, pH 8.0 y a una concentración proteica exactamente conocida de ~0.5 mg/ml. A las muestras se les agregó 5 μ l de DTNB 3.9 mg/ml disuelto en buffer fosfato de sodio 100 mM, pH 7, y se determinó la absorbancia a 425 nm hasta lectura constante (5-10 min). Luego de corregir por el blanco, en el que se omitió la proteína, se calculó la concentración de tioles reactivos usando un coeficiente de extinción $\epsilon_{425\text{ nm}} = 12400 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ [93]. En las condiciones utilizadas, la absorbancia del blanco fue despreciable. Para analizar la velocidad de reacción de los tioles libres se utilizó un equipo de cinética rápida (*stopped flow*) RX2000 (*Applied Photophysics*) conectado a un espectrofotómetro. Se prepararon soluciones de buffer fosfato de sodio 100 mM, DTNB 7.8 mg/ml, urea 0-8 M, pH 7.0. Paralelamente se incubó la proteína por tres horas en urea 0-8 M. Mediante el sistema de jeringas del aparato se mezclaron volúmenes iguales de la solución proteica y del reactivo y se registraron las lecturas a 425 nm cada 0.1, 1 o 5 s, dependiendo de la reactividad del tiol en cuestión. A los datos se ajustaron, por regresión no lineal, ecuaciones de pseudo primer orden [94].

Modificación química con glutaraldehído

El entrecruzamiento o *crosslinking* con glutaraldehído (Fluka, Suiza), 0-0.5 % o disuccinimidil glutarato, 0-1.5 mM (DSG, Pierce, Rockford, IL) fue realizado a 4 °C

mediante una incubación de 5-30 min en un volumen de 100 μ l. La concentración de proteína fue 0.2-03 mg/ml en fosfato de sodio 100 mM. La reacción se frenó mediante la adición de Tris-HCl, 50 mM, pH 7.5 o *buffer* de muestra.

Concentración y almacenamiento de proteínas

Cuando fue necesario concentrar variantes proteicas en el estado nativo se recurrió a filtros concentradores CENTRIPREP® YM-10 (Millipore, Bedford, MA) con corte de 10000 Da. En el caso de proteínas parcialmente plegadas se pudo determinar que no es conveniente la utilización de dichos filtros ya que se detectó agregación y posible unión de las proteínas a la membrana. Siempre que se concentró una muestra por *Centriprep* se determinó posteriormente el estado de agregación por SEC-FPLC (ver “Comportamiento hidrodinámico”).

Cuando fue necesario concentrar variantes en el estado desplegado se recurrió a la resina de intercambio catiónico *SP-Sepharose*. La desnaturalización y la unión a la matriz se realizó en *batch*, en tubos de 15 o 50 ml, en urea 6.5 M, ácido fosfórico 25 mM, glicina 5 mM, pH 3.5. La unión fue corroborada espectrofotométricamente y la elución se realizó con GdmCl 8 M en H₂O. La urea residual y el exceso de GdmCl fueron eliminados por diálisis.

Las proteínas purificadas en su estado nativo fueron dializadas extensivamente contra agua destilada. Posteriormente se prepararon alícuotas de 20 ml y se congelaron a -20 °C. Las alícuotas ya congeladas fueron enfriadas a -80 °C por 2 h y finalmente liofilizadas. Las proteínas liofilizadas fueron conservadas en envases herméticos a -20 °C.

Las proteínas purificadas en estado desplegado fueron almacenadas a -20 °C en urea 5-6.5 M, ácido fosfórico 25 mM, pH 3.5 y en presencia de glicina 5 mM como atrapador de

cianato —contaminante formado por descomposición de la urea. Las variantes Ser→Cys fueron almacenadas de la misma manera pero con el agregado de DTT 1 mM [95].

Diálisis

Las diálisis se realizaron a 4 °C. Las membranas fueron previamente lavadas con agua a 50-60 °C y luego con H₂O destilada. Después de llevar adelante diálisis renaturalizantes (en experimentos de replegado) las muestras se centrifugaron a 10000 rpm por 20 min con el fin de eliminar agregados insolubles.

Determinación de actividad β-lactamasa

La actividad enzimática se determinó a 4, 10 ó 25 °C por medición de la hidrólisis de bencilpenicilina ($\Delta\epsilon_{240\text{ nm}}=570\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, [81, 96]) en fosfato de sodio 50 mM, pH 7.0, y en presencia de albúmina sérica bovina (BSA) 1.5 μM. Los experimentos de desplegado o replegado seguidos por actividad de las variantes de longitud completa se realizaron a bajas temperaturas (típicamente 10 °C) para evitar el replegado durante la determinación de actividad enzimática [81] (ver “Cinética del plegado”).

Cuando fue relevante se determinaron los parámetros enzimáticos K_M y V_{max} o la actividad específica relativa a ES-βL. Las soluciones de bencilpenicilina se prepararon en el buffer de reacción utilizando $\epsilon_{240\text{ nm}}=820\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.

Variantes de la β-lactamasa

La nomenclatura y características de las variantes de β-lactamasa utilizadas en este trabajo se indican en la Tabla 2. También se detalla el tipo de mutación que se introdujo en cada caso.

Tabla 2. Nomenclatura para las variantes proteicas utilizadas en este trabajo.

Variantes de longitud completa

| | |
|-------------------|--|
| ES-βL | Es la proteína salvaje [81]. |
| S126C ES-βL | Se ha reemplazado la Ser 126 (-OH) por Cys (-SH) |
| S265C ES-βL | Se ha reemplazado la Ser 265 (-OH) por Cys (-SH) |
| S126C-S265C ES-βL | Se han reemplazado ambas Serinas por Cisteínas |

Variantes recortadas

| | |
|----------------------------|--|
| ES-βL ^{CA9} | Se eliminaron nueve residuos de la hélice α C-terminal |
| ES-βL ^{CA14} | Se eliminaron catorce residuos de la hélice α C-terminal |
| ES-βL ^{CA19} | Se eliminó por completo la hélice α C-terminal (diecinueve residuos) |
| ES-βL ^{NA14} | Recortada en los primeros catorce residuos. Se elimina por completo la hélice N-terminal |
| S126C ES-βL ^{CA9} | Recortada en los últimos nueve residuos de la hélice α C-terminal en la que se ha modificado la Ser 126 por Cys |
| S265C ES-βL ^{CA9} | Recortada en los últimos nueve residuos de la hélice α C-terminal en la que se ha reemplazado la Ser 265 por Cys |

INGENIERÍA GENÉTICA

Mutagénesis

El gen de la β -lactamasa de *B. licheniformis* clonado en el vector *pET-9b* (Novagen, Madison, WI), que confiere a las bacterias resistencia al antibiótico kanamicina, fue gentilmente cedido por el Dr. Anthony Fink. En dicho plásmido (pET-BLA1), el gen de la β -lactamasa se encuentra bajo el control regulatorio del promotor de la RNA polimerasa del fago *T7* [97] y esta polimerasa se encuentra codificada en el DNA genómico (cromosomal) de las bacterias BL21. Su inducción mediante IPTG 1mM o simplemente lactosa 1 % activa la transcripción del gen de la β -lactamasa. En nuestro laboratorio (ver introducción) se subclonó en el mismo vector de expresión la variante de β -lactamasa más corta presente en cultivos de *Bacillus licheniformis: exo-small* (ES- β L). El DNA fue secuenciado y la masa del producto proteico fue determinada [81]. Utilizando el vector pET-BLA1 como DNA molde se prepararon las variantes de cisteína de la ES- β L mediante la reacción en cadena con polimerasa (PCR) según lo descrito en la literatura [98]. El esquema general para la producción de las variantes truncadas se muestra en la Figura 10 A y el esquema general utilizado para introducir las mutaciones Ser \rightarrow Cys se muestra en la Figura 10 B. Los oligonucleótidos iniciadores utilizados en las reacciones PCR (Tabla 3).

y fueron diseñados utilizando el programa Amplify (Bill Engels® 1992, University of Wisconsin, Genetic, Madison, WI 53706). Con este programa se simulaban los posibles productos de amplificación utilizando la secuencia del gen y los oligonucleótidos correspondientes. Para evitar la formación de estructura secundaria, que podría disminuir el rendimiento en las PCR, también se utilizó en el diseño de los oligonucleótidos el programa

RNA*draw* de Ole Matzura del Departamento de Biofísica, Karolinska Institute, Solna, Sweden.

La amplificación de los fragmentos se realizó en tubos de 500 μ l. El volumen de reacción fue 25, 50 o 100 μ l para selección de clones, PCR preparativa o tercer PCR (ver protocolo de unión de 2 fragmentos), respectivamente. La mezcla de reacción (50 μ l) consistió en 5 μ l de buffer de reacción (buffer *Pfu* 10 \times), 4 μ l de dNTP 2.5 mM (cada uno) y 1 μ l de polimerasa *Pfu*. A la mezcla de reacción se adicionaron ~10 ng totales de DNA molde y 0.5 μ l de una solución de cada oligonucleótido (1 μ M concentración final). El agregado de la polimerasa se llevó a cabo después de una preincubación de 1 min a 94 °C y se utilizaron extensiones de 2 min por kb.

Visualización y aislamiento de los productos de PCR

Los productos de amplificación de cada PCR se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa 1 % o 2 %, dependiendo del tamaño del producto, >500 y <500 pb respectivamente, en buffer TBE (Tris-Borato 0.045 M, EDTA 1 mM). Las bandas separadas se visualizaron por su fluorescencia al ser iluminadas con luz UV de 254 nm. Las corridas electroforéticas se realizaron en una cuba horizontal a 80 V utilizando TBE como buffer de corrida [99].

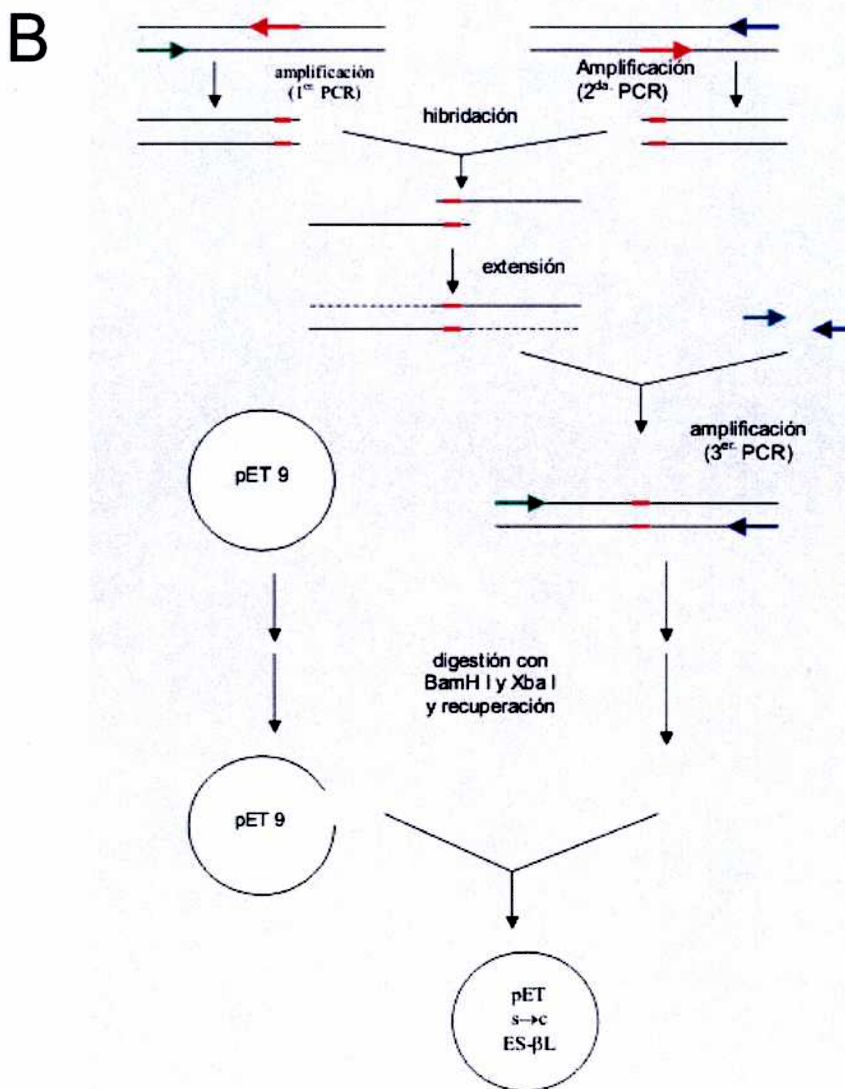
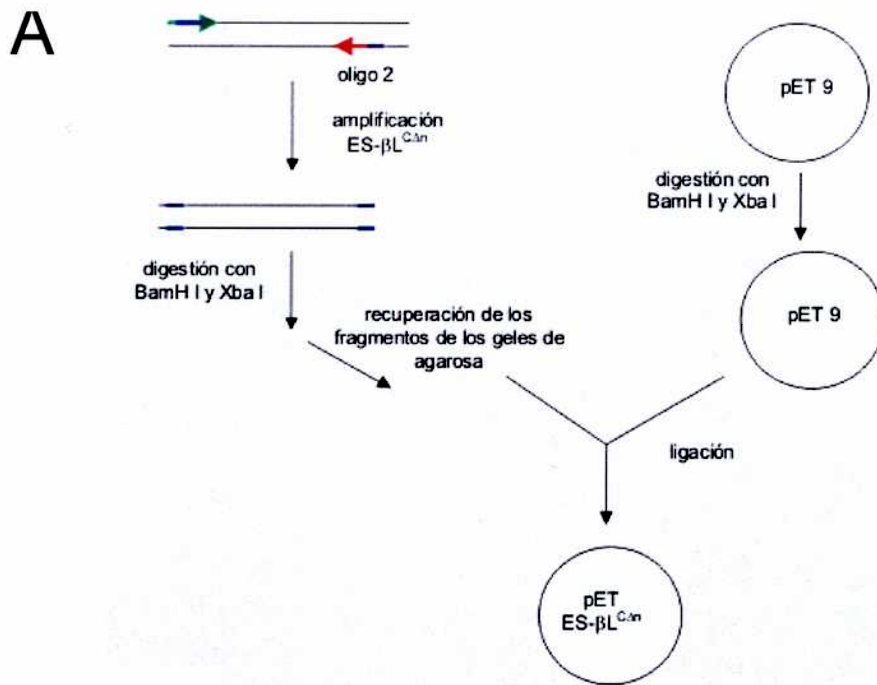


Figura 10. Estrategias de biología molecular para la preparación de las variantes de ES-βL. (A) Esquema general para la preparación de variantes cortas de ES-βL^{CΔn}. (B) Esquema general para la preparación de variantes S→C.

Tabla 3. Oligonucleótidos iniciadores utilizados en la construcción de las variantes de ES-βL.

| Nombre | Secuencia | Especificidad (bases) ^a | Uso, variante ^b |
|--------------------|--|------------------------------------|---|
| 3'BamH I CA9 | ttaaggatccttataccaccttggcctctgcaa | +746 ← +781 | ES-βL ^{CA9} |
| 3'BamH I CA14 | ccacggatccttactctgcaataagtta tcatacttg | +726 ← +766 | ES-βL ^{CA14} |
| 3'BamH I CA19 | ctgcggtccttaatcatcatactggcgtcc | +720 ← +751 | ES-βL ^{CA19} |
| S265C _F | gcagtatta/gcagcaggataaaaag gac | +694 → +723 | S265C ES-βL ^{CA9} S265C ES-βL S2656C S126C ES-βL |
| S265C _R | atccctgctgcataactgcaagaacg | +687 ← +714 | idem S265C _F |
| S126C _F | ctgcggtatgctgccttcgatatagtgacaatg | +280 → +313 | S126C ES-βL ^{CA9} S126C ES-βL S265C S126C ES-βL |
| S126C _R | actatatgcaaggcaagcatccgcaagctc | +277 ← +306 | idem S126C _F |
| 3'BLA-T | cctgtggatccggatagttctcc | +1028 ← +1055 | general |
| T7 prom | taatcgcactcactataggg | -80 → -61 | general |
| C'BLA | gggtccatgatgcccctcc | -622 → -643 | general |
| 5' XbaI BLA | agaccacaacggttccctctagaaa | -59 → -35 | general |
| In pEtren | gcatcaaattgtcctcaagt | +30 ← +50 | general |
| 3'BAMHI Bla | gtttgacggatccatcgcaatgtttta | +811 ← +840 | general |

^a La posición en la que el *primer* 'hibridiza' en la secuencia del gen de la β-lactamasa de *B. licheniformis*, gentilmente cedido por el Dr. Anthony Fink.

^b Ver Tabla 2.

Purificación de fragmentos de DNA

Extracción física

Las porciones de agarosa conteniendo las bandas de interés se escindieron de los geles utilizando un bisturí, se colocaron en tubos *Eppendorf* de 1.5 ml y fueron disgregadas con una punta de pipeta. La suspensión resultante se centrifugó 10 min a 14000 rpm en una microcentrífuga y la solución sobrenadante fue separada y almacenada a 0 °C. La fracción particulada se mezcló mediante un vortex a máxima velocidad con 100 µl de agua destilada y se incubó a 37 °C durante 30 min. Luego, se repitió la centrifugación, el nuevo sobrenadante se mezcló con el anterior y se filtró por un microfiltro de centrifuga de 0.22 µm para eliminar cualquier resto de agarosa. El DNA de la mezcla se precipitó por adición de 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3.0 M, pH 5.6 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto [99]. La mezcla se incubó durante 30 min a -86 °C, se centrifugó 10 min a 14000 rpm y se descartó el sobrenadante. Al precipitado adherido a la pared del tubo se le agregó suavemente 100 µl de etanol 70% sin resuspender el material y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. El DNA precipitado se disolvió en 20 µl de agua o en buffer TE al décimo (Tris-HCl 1 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.5) y se almacenó a -20° C. Esta técnica permitió recuperaciones cercanas al 50 % del material inicial.

Extracción química

Las porciones de agarosa conteniendo las bandas de interés se escindieron como en el protocolo mencionado más arriba y se colocaron en tubos *Eppendorf* de 1.5 ml. El DNA fue extraído empleando un *kit* comercial basado en la utilización de resinas de intercambio iónico (Concert™, Life Technologies GIBCO BRL, U.K.). El porcentaje de recuperación fue superior al 70 %. El DNA se recuperó en 25 µl de buffer TE al décimo.

Subclonado de productos obtenidos por PCR

La ligación de los productos de PCR a los plásmidos lineales purificados se realizó mezclando el fragmento a clonar y el vector, previamente digeridos con las enzimas de restricción adecuadas, en una relación aproximada de 3:1. Se usó ligasa del fago T4 (3 U, en Tris-HCl 30 mM, pH 7.8, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, y ATP 0.5 mM) durante 15 h a 22 °C. La reacción de ligación se almacenó a -20 °C.

Preparación de bacterias competentes

Las bacterias se cultivaron durante 16 h en 2 ml de medio LB (NaCl 10 g/l, triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l) a 37 °C con agitación permanente (precultivo). Luego, 200 ml del mismo medio fueron inoculados con el precultivo preparado y las bacterias se cultivaron a 250 rpm hasta que la densidad óptica a 600 nm fue aproximadamente 0.4-0.6. El cultivo se transfirió a un tubo de centrifuga estéril y se dejó reposar en hielo por 10 min. Seguidamente se centrifugó a 5000 rpm en rotor JA-14 (Beckman, USA) por 10 min a 4 °C. La fracción sobrenadante se descartó y las bacterias se resuspendieron suavemente en 200 ml de glicerol 10 %, en baño de hielo. Posteriormente, se volvió a centrifugar y se repitió la operación resuspendiendo primero en 100 ml, luego en 50 ml, 25 ml y finalmente 0.4 ml. Este volumen se fraccionó en alícuotas de 80 µl que fueron almacenadas a -86 °C hasta su utilización.

Transformación de bacterias *E. coli* JM109 y BL21(DE3)

Con el fin de replicar y almacenar los nuevos plásmidos se utilizaron bacterias *E. coli* JM109. La electroporación se realizó con 80 µl de bacterias descongeladas a 4 °C, agregando 1 a 2.5 µl del resultante de la ligación ó con 10 ng de plásmido superenrollado.

Las celdas de electroporación (de 0.2 cm) fueron preenfriadas a 0 °C y el electroporador (*E. coli*-Bio-Rad) se ajustó en 2.5 kV.

Con el objeto de expresar eficientemente los genes subclonados, los plásmidos, con el inserto correspondiente, fueron introducidos en bacterias *E. coli* BL21(DE3). El protocolo de transformación fue el mismo que se utilizó para las *E. coli* JM109. El DNA para estas transformaciones provino de las preparaciones de plásmidos en gran escala replicados en *E. coli* JM109, y fue previamente secuenciado. Luego de la transformación las bacterias se sembraron en placas de Petri con kanamicina. Las colonias positivas se identificaron por la expresión a pequeña escala (ver más adelante) de la proteína de interés y geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). A partir de colonias aisladas se prepararon *stocks* en glicerol 10 %. [99] y se conservaron a -86 °C

EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Expresión en pequeña escala

Se realizaron cultivos líquidos a 37 °C de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con los plásmidos correspondientes (10 ml de medio líquido con kanamicina 100 µg/ml). Luego de alcanzar una $DO_{600} \sim 1.0$ se extrajo 1 ml del cultivo y se almacenó a 0 °C como control de preinducción. El volumen restante se suplementó con IPTG 1 mM ó, alternativamente, lactosa 1 % (P/V) final, y se creció a 37 °C por 3 h con agitación a 250 rpm. Las bacterias se cosecharon por centrifugación

Purificación de variantes de longitud completa en condiciones nativas

Las variantes de longitud completa de β -lactamasa fueron purificadas esencialmente como se describe en un trabajo previo del laboratorio [81]. Brevemente, el fluido aislado por *shock* osmótico preparativo (~900 ml) fue acidificado con 100 ml de acetato de sodio 100 mM, pH 5.0. La suspensión resultante fue centrifugada a 13500 rpm con el objeto de remover el material precipitado. El sobrenadante, libre de agregados insolubles y partículas fue sembrado en una columna *fast flow* S-Sepharose (1.5 × 7.0 cm) previamente equilibrada con acetato de sodio 10 mM, pH 5.0. La proteína fue eluida con un gradiente lineal de 150 ml, entre 0-250 mM NaCl en el mismo *buffer*. Las fracciones colectadas se analizaron por SDS-PAGE, y absorción a 280 nm. Además, en el eluido se midió actividad enzimática. Las fracciones conteniendo proteína pura fueron dializadas contra agua y posteriormente liofilizadas.

Purificación de variantes truncadas en condiciones desnaturalizantes

Preparación de cuerpos de inclusión

Las proteínas que se pliegan incorrectamente durante la expresión en *E. coli*, suelen degradarse por proteólisis intracelular y/o se agregan formando 'cuerpos de inclusión'. Estos últimos pueden ser separados fácilmente del resto del material celular mediante una serie de lavados con detergentes y tratamientos con enzimas. Se ha visto que por lo general la proteína sobreexpresada presenta ya en esta etapa de purificación pocos contaminantes, entre los que se encuentra una proteína de membrana de ~40 kDa (de acuerdo a datos de secuencia N-terminal obtenidos en el laboratorio, AEIYNKDGKVDLY, se trata de la

porina OMPF). A continuación se describe el protocolo usado para la preparación de cuerpos de inclusión, una adaptación del descripto por Jenssen y col. [100]. Las células centrifugadas (6-8 g) fueron resuspendidas en 15 ml de buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) y rotas por sonicación en un baño de agua-hielo (en fracciones de 5 ml y con cinco pulsos de 30 s a 4 W). Los cuerpos de inclusión crudos fueron aislados por centrifugación ($12,000 \times g$, 10 min a 4 °C), mediante sucesivos ciclos de incubación/centrifugación con (a) $MgCl_2$ 10 mM y DNAsa I 10 $\mu g/ml$ en buffer de lisis (30 min a 37 °C), (b) lisozima 0.2 mg/ml en buffer de lisis (15 min a 25 °C), (c) deoxicolato de sodio 2 mg/ml en buffer de lisis (10 min a 25 °C), (d) Triton X-100 0.5 % y EDTA 10 mM en buffer de lisis (10 min a 25 °C), (e-g) H_2O desionizada.

Intercambio iónico

Los cuerpos de inclusión limpios fueron solubilizados en urea 6.5 M, ácido fosfórico 25 mM, glicina 5 mM, pH 3.5 (buffer de solubilización). La fracción insoluble fue separada por centrifugación a 14000 rpm, 20 min a 4 °C. La fracción soluble se sembró en una columna *fast flow* S-Sepharose (1.5 \times 7.0 cm). La elución fue realizada con un gradiente de 100 ml, de 0 a 500 mM de NaCl en buffer de solubilización. Las fracciones conteniendo β -lactamasa pura (SDS-PAGE) fueron reunidas y guardadas a -20 °C. Antes de ser utilizadas, éstas se diluyeron hasta 1-2 mg/ml con fosfato de sodio 10-150 mM, pH 6.5, y se dializaron a 4 °C contra el mismo buffer. Para eliminar agregados insolubles se centrifugó a 4 °C (14.000 rpm por 15 min).

S265C ES- βL^{CA9} y S126C ES- βL^{CA9} fueron purificadas con las siguientes modificaciones (a) Se agregó ditioneitol (DTT) al buffer de solubilización (10 mM) y al buffer para la cromatografía en *SP-Sepharose* (1 mM); (b) la mayor parte de la urea y del DTT fueron

removidos en un segundo paso de intercambio iónico (matriz *SP-Sepharose*), en buffer ácido fosfórico 25 mM, pH 3.5, y elución con GdmCl 5 M en H₂O desionizada; (c) la urea y el DTT residual fueron eliminados con una filtración en gel (columna PD10 de Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden) equilibrada con GdmCl; (d) el replegado fue realizado mediante una dilución (1:100) en fosfato de sodio 75 mM, sulfato de sodio 250 mM, pH 6.0 (la dilución también se realizó a pH 6.5 y a pH 7.0, ver Resultados); (e) Las proteínas S126C y S265C ES-βL^{CA9}, puras y plegadas, fueron concentradas hasta 20 μM usando filtros CENTRIPREP® YM-10.

Proteólisis controlada, analítica y preparativa

Para estudiar la susceptibilidad a la proteólisis, ES-βL y las variantes recortadas fueron incubadas a 20 °C con tripsina en una relación proteasa:β-lactamasa de 1:100 en peso. El buffer de proteólisis fue fosfato de sodio 100 mM, pH 7.0. La reacción fue seguida por SDS-PAGE, actividad enzimática y *western blotting*.

La tripsinólisis también se realizó en forma preparativa con el objeto de purificar ES-βL^{CA9} en su estado nativo, aprovechando la resistencia a la tripsina de esta última, con respecto a la susceptibilidad que caracteriza a los estados parcialmente plegados. Estos experimentos se realizaron a 20 °C en fosfato de sodio 10 mM, pH 7.0. La reacción fue terminada después de 5 min, mediante la inyección de la muestra en una columna Mono Q (0.5 × 5.0 cm; Pharmacia, Uppsala, Sweden), equilibrada con el mismo buffer y a un flujo de 0.5 ml/min. La elución fue realizada con fuerza iónica creciente (NaCl) hasta 200 mM. La tripsina a pH 7.0, no se retiene, por lo que esta técnica permitió su eliminación muy eficientemente. Los experimentos se realizaron con un instrumento *Fast Protein-Peptide and Polynucleotide Liquid Chromatography* (FPLC, Pharmacia), equipado con una cámara

de inyección de 1.5 ml, y un detector con longitud de onda fija UV a 280 nm (Pharmacia) conectado a una computadora para la recolección de datos.

Separación preparativa por tamaño molecular

Los experimentos preparativos de filtración molecular, con el objetivo de aislar formas parcialmente plegadas de ES- β L^{CA9}, se realizaron en una columna Sephacryl S-100 HR (2.6 × 90 cm; Pharmacia, Uppsala, Sweden) equilibrada con fosfato de sodio 150 mM pH 7.0. La elución fue realizada en el mismo buffer. La columna se calibró previamente con una mezcla de BSA (66 kDa), ES- β L (30 kDa) y lisozima de clara de huevo (14 kDa).

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

Comportamiento hidrodinámico

Para estudiar el grado de expansión y agregación de las distintas variantes se determinó el radio de Stokes (R_s) mediante cromatografía líquida de exclusión molecular (SEC) en presencia o en ausencia de urea o GdmCl. Esta misma técnica se utilizó para determinar la presencia de agregados solubles de alto peso molecular. Los experimentos se realizaron utilizando un instrumento FPLC, equipado con una cámara de inyección de 100 μ l, una columna de Superosa 12 (Pharmacia) y un detector de longitud de onda fija UV a 280 nm (Pharmacia) conectado a una computadora para la recolección de datos. La columna se calibró periódicamente inyectando una mezcla de proteínas globulares de peso molecular conocido (tiroglobulina, γ globulina bovina, ovoalbúmina de pollo, mioglobina equina y vitamina B₁₂). El R_s de esas proteínas se calculó mediante la ecuación (1) [33, 34].

$$\log(R_s) = 0.369 \log(\text{PM}) - 0.254 \quad (1)$$

donde PM es el peso molecular en Da de la proteína de interés.

Dispersión de luz por agregados proteicos

La intensidad de luz dispersada (*light scattering*), para moléculas pequeñas con respecto a la longitud de onda, tiene una dependencia inversa con la longitud de onda elevada a la cuarta potencia. Una suave curva ascendente en los espectros de absorción UV de un polipéptido entre 400 y 300 nm, generalmente se debe a la presencia de *light scattering*. Para corregir este efecto se extrapolaron los datos experimentales entre 340 y 310 nm, donde no hay picos de absorción proteica, a la región entre 300 y 240, donde sí hay picos proteicos. La extrapolación se hizo por ajuste de ecuaciones a los datos experimentales y minimización de la suma de 'cuadrados'. Se utilizó el subprograma Solver de Excel para la minimización. La ecuación ajustada fue

$$Abs = k_1 + \frac{k_2}{\lambda^{k_4}} \quad (2)$$

Esta ecuación permitió, además, realizar una corrección por línea de base (k_1). El parámetro k_4 se aproxima a 4 para soluciones de moléculas mucho menores que la longitud de onda absorbida. Cuando hay turbidez manifiesta, debido a que el tamaño de las moléculas o agregados de las mismas se acerca a la longitud de onda, el parámetro k_4 puede adquirir valores menores. En general resultó suficiente usar como datos los puntos del espectro entre 310 y 340 nm para el ajuste. En algunos casos, por el contrario, fue necesario extender hasta los 400 nm para lograr un buen ajuste.

Cuarta derivada del espectro UV

El entorno conformacional de los residuos aromáticos de las variantes de β -lactamasa se estudió mediante espectroscopía de absorción UV y posterior cálculo de la derivada cuarta

del espectro [101]. Se utilizó un espectrofotómetros Shimadzu UV 160 A o UV2401 PC (Shimadzu Inc., Tokyo, Japon). Se tomaron datos en el modo lento y cada 0.1 nm. Los espectros de cuarta derivada se calcularon mediante dos ciclos sucesivos de derivación de segundo orden [101], utilizando la ecuación (3)

$$\Delta^2 A / \Delta \lambda^2 = (A_{i+20} - 2A_i + A_{i-20}) / \Delta \lambda^2 \quad (3)$$

Previamente los espectros fueron corregidos por sus respectivos blancos promediados, suavizados y, en caso necesario, corregidos por dispersión de luz como se indicó más arriba.

Modelado de espectros

Los espectros correspondientes a la forma desnaturalizada de cada variante de β -lactamasa se simularon a partir de la combinación apropiada de los espectros de fenilalanina, N-acetyltryptofanoamida (NATA) y N-acetyltyrosinamida (NAYA) en buffer fosfato de sodio 100 mM pH 7.0. [86, 102]. Este modelo es consistente con espectros de digeridos exhaustivos con proteinasa K de las variantes.

Dicroísmo circular

Se analizó el contenido de estructura secundaria y terciaria de las variantes de β -lactamasa por espectroscopía de dicroísmo circular en el UV-lejano (180 y 240 nm) y cercano (240-340 nm), respectivamente [103]. Se utilizó un equipo JASCO J-810 (Jasco Corp. Japón) [86] calibrado de acuerdo a instrucciones de los fabricantes con ácido (+)-10-canforsulfónico y equipado con un sistema de tipo Peltier para la regulación de la temperatura (20-22 °C). La fuerza iónica se ajustó con NaF (el fluoruro absorbe muy poco en el UV lejano).

CD en el UV lejano

Se utilizó una celda de 0.1 cm. La concentración de proteína fue 1.5 μM . La sensibilidad fue de 100 miligrados. La velocidad de barrido fue 20-50 nm/min, el tiempo de respuesta fue de 1 s y el ancho de banda fue 1 nm. Se obtuvieron unos diez espectros para cada muestra. El promedio fue corregido por absorción del buffer y posteriormente se corrigió por línea de base utilizando como cero la lectura a 340 nm. Los datos finalmente fueron suavizados mediante un ciclo de cuarto grado de filtro Savitzky-Golay, con una ventana de diez puntos [104]. La elipticidad molar se calculó como

$$[\theta] = \theta / ([b] \times n \times d \times 10) \quad (4)$$

donde $[\theta]$ es la elipticidad molar (en $\text{grados} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$), θ es la elipticidad en miligrados, n el número de residuos de la proteína menos uno (número de enlaces peptídicos), $[b]$ la concentración molar de proteína y d es la longitud de la celda en centímetros.

CD en el UV cercano

Los espectros se obtuvieron a una velocidad de barrido de 20 nm/min, con una sensibilidad de 5 miligrados. La absorción en esta región es cerca de dos órdenes de magnitud menor que en el UV lejano, por esto, la concentración de proteína fue de 15 μM y se usó una celda de 1 cm de paso óptico. El buffer fue fosfato de sodio 10 mM, fluoruro de sodio 100 mM, pH 7.0. Los datos se procesaron de igual manera que en el caso del CD en el UV lejano.

Espectros de fluorescencia de triptofano

La fluorescencia estática de los triptofanos fue estudiada a 20 °C en un espectrofluorómetro K2 ISS (ISS, Champaign, IL) y, salvo que se indique lo contrario, las soluciones de proteína fueron preparadas en buffer fosfato de sodio 100 mM pH 7.0 a una concentración entre 2 y 5 μM (a absorbancias menores a 0.15 con el fin de disminuir el efecto de filtro

interno). Las fluctuaciones en la intensidad de la lámpara fueron corregidas mediante la utilización del canal de referencia sensando continuamente la emisión de una solución de rodamina. La excitación fue a 295 nm (con un ancho de banda de 8 nm), los datos fueron adquiridos a intervalos de 1 nm entre 250 nm y 450 nm. La fluorescencia de las variantes de β -lactamasa en su estado desplegado fue medida después de una incubación de 5 h en fosfato de sodio 100 mM pH 7.0, GdmCl 5 M.

Rendimiento cuántico de triptofano

El rendimiento cuántico de un fluoróforo es el número de fotones emitidos relativo al número de fotones absorbidos. Cuando dicho fluoróforo se encuentra en el estado excitado puede retornar al estado basal emitiendo luz (proceso radiativo) o por medio de otros procesos que no involucran la emisión de luz (procesos no radiativos). La sensibilidad de la intensidad de fluorescencia a los cambios en el ambiente del fluoróforo y su rendimiento cuántico se deben a los procesos no radiativos que compiten con la emisión de luz por la desactivación de estado excitado. Las muestras se prepararon en buffer fosfato de sodio 100 mM pH 7.0. Usando la celda del espectrofluorómetro, se midió la concentración proteica en el espectrofotómetro tomando un espectro de absorción UV entre 240 y 340 nm en modo lento. Se colocó inmediatamente la celda en el fluorómetro y se tomaron tres espectros de emisión entre 250 y 500 nm con un ancho de paso de luz de 8 nm. La longitud de onda de excitación se fijó en 295 nm para excitar selectivamente al Trp (con un ancho de paso de luz de 8 nm. La temperatura se mantuvo a 20 °C. Se hicieron correcciones por la referencia, se sustrajo el blanco correspondiente y el aporte a 295 nm por la luz dispersada por la muestra. Del mismo modo se tomaron espectros de absorción y de emisión de fluorescencia de una solución de Trp de absorbancia ~ 0.1 en el mismo buffer. Los espectros

de absorción UV se analizaron gráficamente y, cuando fue necesario, se corrigieron por *light scattering*. Para calcular el rendimiento cuántico (Q), se midió el área total bajo la curva para el espectro de emisión y el área bajo la curva de absorción entre 291 y 299 nm. Para esto se utilizaron los programas Kaleidagraph (Synergy Software, Reading, PA) y Excel 2000 Microsoft®. Estos datos se combinaron con el rendimiento cuántico del Trp (0.14) [105].

$$\left(\int_{500}^{250} \text{Flu}_b \div \int_{299}^{291} \text{Abs}_b \right) \div \left(\int_{500}^{250} \text{Flu}_{\text{Trp}} \div \int_{299}^{291} \text{Abs}_{\text{Trp}} \right) \times 0.14 = Q_b \quad (5)$$

donde Flu es la fluorescencia, Abs absorbancia, b es una solución de la variante proteica analizada con absorbancia a 280 nm ~0.1.

Unión de ANS

La unión a proteínas de la sonda fluorescente 1-anilinaftaleno-8-sulfonato (ANS) se siguió mediante la emisión de fluorescencia a 480 nm (excitación a 350 nm) [14]. Tanto para la excitación como para la emisión se utilizaron rendijas de 8 nm. La concentración de proteína fue 3 μM . A la celda con la solución de proteína o buffer se le agregó de manera creciente alícuotas de una solución madre de ANS 1 mM, fosfato de sodio 100 mM, pH 7.0 ($\epsilon_{350 \text{ nm}} = 4950 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$; [106]) y se agitó suavemente dejando luego equilibrar por 2 min antes de adquirir los espectros (2 espectros por muestra entre 400-600 nm). Los datos fueron corregidos por la dilución y ajustados adecuadamente. La constante aparente de disociación fue calculada asumiendo un único sitio de unión [102].

Desplegado seguido por fluorescencia de triptofano

Las variantes de ES-βL fueron preparadas en fosfato de sodio 100 mM, pH 7.0. Volúmenes iguales de esta solución se agregaron a una serie de tubos de polipropileno que contenían soluciones del mismo buffer con GdmCl para dar concentraciones finales del entre 0.0 y 3.5 M. La concentración final de proteína fue 3 μM en todos los tubos. Los tubos se equilibraron a temperatura ambiente por 5 h. Se tomaron espectros con excitación a 295 nm y emisión entre 250 y 500 nm a 1-2 nm de intervalo y con 8 nm de ancho de banda. Las mediciones realizaron en un equipo K2 ISS (ISS, Champaign, IL). Los espectros recolectados se guardaron en modo texto y se procesaron con Microsoft Excel. A cada espectro de proteína se le restó el blanco correspondiente, se lo corrigió por la referencia y se tabularon los valores de fluorescencia a 330 nm en función de la concentración de GuHCl. Los cálculos se realizaron de acuerdo a Santoro y Bolen. [107]. También se realizaron experimentos semejantes a los descritos anteriormente pero usando urea como agente desnaturante en un rango de concentraciones de 0 a 8 M, en este caso los tubos se equilibraron a temperatura ambiente por 3 h. El resto de las condiciones fueron idénticas a las mencionadas más arriba.

Desnaturalización por temperatura

Las transiciones inducidas por la temperatura entre los estados nativo y desnaturado de las variantes se estudiaron mediante la detección de cambio en las señales de dicroísmo circular (contenido de hélices α) a 220 nm. La concentración de proteína fue 1.5 μM y la celda utilizada de 1 cm de paso óptico. La sensibilidad 100 miligrados. La muestra se equilibró a 0-4 llevándola posteriormente a 95 °C con velocidad de variación de 2 °C/min.

Se utilizó la ecuación (6) para describir el sistema y calcular los parámetros termodinámicos.

$$\Delta G(T) = \Delta H(T_G) + \Delta C_p (T - T_G) - T \left(\frac{\Delta H(T_G)}{T_G} + \Delta C_p \ln\left(\frac{T}{T_G}\right) \right) \quad (6)$$

El parámetro ΔC_p se obtuvo a partir de un ajuste múltiple donde se combinan las transiciones realizadas a distintos valores de pH (ver resultados). Existe una relación lineal entre ΔH y T_m cuya pendiente es ΔC_p [42]. Esto permite utilizar un ΔC_p global para calcular simultáneamente los ΔH a cada pH.

Cinética de plegado y desplegado

Para el replegado, las variantes de β -lactamasa fueron preincubadas por 5 h en buffer fosfato de sodio 100 mM, GdmCl 5 M, pH 7.0 y diluidas en el mismo buffer pero variando la concentración de desnaturalizante entre 0.05 y 1.5 M final. Para el desplegado, la proteína nativa en fosfato de sodio 100 mM, 7.0. fue diluida con GdmCl 1.5-5 M. En ambos casos la temperatura fue 20 °C y la concentración final de proteína fue 1 μ M. En el caso de la variante ES- β L^{CA} se realizó un experimento en el que se varió la concentración final de proteína entre 0.3-30 μ M.

En todos los experimentos se tomaron alícuotas del tubo de reacción a distintos tiempos y se midió inmediatamente la actividad enzimática como se describió anteriormente [81]. Sintéticamente, las muestras fueron ensayadas con la celda termostaticada a 10 °C (ES- β L) ó, alternativamente, a 20 °C (ES- β L^{CA9}). se tomaron datos de absorbancia a 240 nm en función del tiempo cada 0.1 s, y la pendiente fue utilizada para calcular la actividad. El

mezclado (manual) y la lectura se realizaron en menos de 30 s, con lo que la fracción replegada durante la medición no resultó ser significativa (<2 %).

Las siguientes formulas fueron utilizadas para analizar la cinética de plegado de las variantes estudiadas [42].

$$\ln k_{\text{obs}} = \ln(k_f^0 \exp(-\frac{m_f}{RT}[\text{GdmCl}]) + k_u^0 \exp(\frac{m_u}{RT}[\text{GdmCl}])) \quad (7)$$

$$\Delta G_{U \rightarrow \ddagger} = \Delta G_{U \rightarrow \ddagger}^0 + m_f[\text{GdmCl}] \quad (8)$$

$$m_{\text{kin}} = m_u + m_f \quad (9)$$

$$\beta_{N \rightarrow \ddagger} = \frac{m_u}{m_{\text{kin}}} \quad (10)$$

Donde k_{obs} es la constante de velocidad observada; k_f^0 y k_u^0 son las constantes de velocidad para replegado y desplegado respectivamente en ausencia de desnaturizante; m_f y m_u se relacionan con el cambio en área (superficie expuesta) para las transiciones $U \rightarrow \ddagger$ y $N \rightarrow \ddagger$, respectivamente; $\Delta G_{U \rightarrow \ddagger}^0$ y $\Delta G_{N \rightarrow \ddagger}^0$ son el cambio de energía libre hacia el estado de transición; y m_{kin} es el equivalente cinético de m_{eq} , la dependencia de $\Delta G_{N \rightarrow U}$ con la concentración de desnaturizante.

El replegado de ES- $\beta\text{L}^{\text{CA9}}$ también fue seguido por cromatografía de exclusión molecular. A distintos tiempos de replegado se tomaron muestras y se inyectaron en una columna Superose 12 10/30 (SEC-FPLC) equilibrada con fosfato de sodio 100 mM, pH 7.0 a 4 °C.

CAPÍTULO III

ESTRUCTURA Y PLEGADO DE ES- β L

INTRODUCCIÓN

Por diversos motivos, la ES- β L es muy atractiva como modelo para el estudio del plegado de proteínas de mediana complejidad con dominios no continuos en la secuencia [108] y plegado multifásico. Vale la pena recordar tres de estos motivos, (a) su estructura nativa se conoce con gran detalle; (b) estudios previos han permitido acumular abundantes pruebas sobre la existencia de intermediarios de plegado, tanto en el equilibrio [32, 70, 71, 109, 110] como en experimentos de cinética [69, 111]; (c) ES- β L no posee puentes disulfuro que compliquen adicionalmente el plegado.

En la estructura de las β -lactamasas de clase A pueden reconocerse dos dominios. La presencia de intermediarios cinéticos y de equilibrio podría estar relacionada directamente con las estabilidades relativas de estos dominios o incluso con la de sus eventuales subdominios. En la primer parte de este capítulo se describen experimentos dirigidos a estudiar aspectos generales de la estructura, el plegado, y estados parcialmente plegados de ES- β L, tanto desde un punto de vista cinético como en el equilibrio. En la segunda parte del capítulo se trata la estructura de formas parcialmente plegadas a partir de experimentos de modificación química de una cisteína, introducida a tal fin en la cadena polipeptídica, como sonda conformacional [94].

Para los estudios de modificación química se reemplazó una serina (-CH₂OH) por cisteína (-CH₂SH) en variantes de longitud completa (S126C ES- β L, S265C ES- β L y S126C/S265C ES- β L). La variante S126C se preparó para estudiar la estabilidad del dominio α -helicoidal (Figura 11). La variante S265C se preparó para investigar la posición de las hélices α , N y C-terminales, sobre la lámina β en estados parcialmente plegados (ver

Figura 11). Al respecto, estudios de dinámica molecular computacional [112] y de resistencia a proteólisis de la β -lactamasa TEM de *E. coli* [72] sugieren que la hélice α 11 (C-terminal) es un elemento inestable frente a cambios térmicos. Las variantes con una única mutación posibilitarían caracterizar termodinámicamente el efecto de cada reemplazo. Por último, la variante que posee ambas mutaciones permitiría comparar estabilidades relativas de dominios (o subdominios) ya que cualquiera de las dos mutaciones podría producir una desestabilización general que sería interpretada equivocadamente como local al analizar la variante puntual.

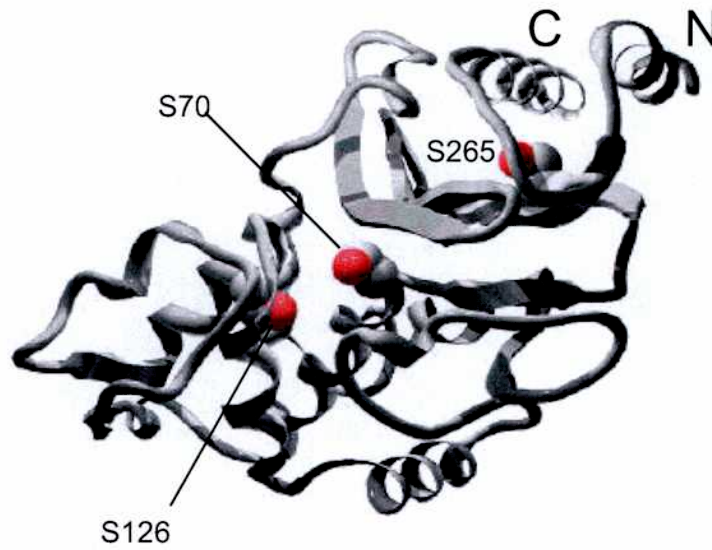


Figura 11. Modelo de cintas de ES- β L. Se muestra la ubicación de los residuos Ser70 (serina catalítica), Ser126, Ser265 y las hélices α_1 y α_{11} (N y C respectivamente). En color rojo se señala el átomo de oxígeno de cada una de las tres cadenas laterales de las serinas mencionadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Expresión y purificación de ES-βL

La ES-βL fue sobreexpresada en *E. coli* (250 mg/l de cultivo) y purificada a partir del extracto obtenido por *shock* osmótico preparativo. A juzgar por el análisis por SDS-PAGE del producto obtenido, la pureza fue >95 % y el rendimiento del ~50 % (Figura 12). El espectro de masa del producto indicó 29,373.9±1.1 Da, lo que concuerda con la estructura covalente esperada. Se detectó un segundo componente, 131.2 Da más pesado, consecuencia de la remoción parcial (30—50 %) de la metionina iniciadora. Los parámetros catalíticos ($K_M=0.18\pm0.05$ mM) y la actividad específica del producto concordaron con resultados previos [81]. El comportamiento hidrodinámico ($R_S=25.3\pm0.7$ Å, Figura 13) fue el esperado para una proteína monomérica (M) y globular del peso molecular de la ES-βL (el R_S teórico de ES-βL es 24.9 Å) [34]. También se observaron trazas de fracción dimérica (D), con un $R_S=33.0\pm0.5$ Å (el R_S teórico de la forma dimérica es 32.0 Å). En su estado nativo, la ES-βL resultó ser sumamente resistente a la acción de la tripsina (ver capítulo IV, Figura 38).

Caracterización espectroscópica

Espectroscopia UV

En los espectros de absorción UV de las proteínas, las bandas correspondientes a los residuos aromáticos no siempre se resuelven suficientemente, y resulta difícil extraer conclusiones acerca de la conformación proteica basándose en ellos. En la Figura 14 se muestra el promedio de diez espectros de ES-βL. Si los espectros son derivados en forma

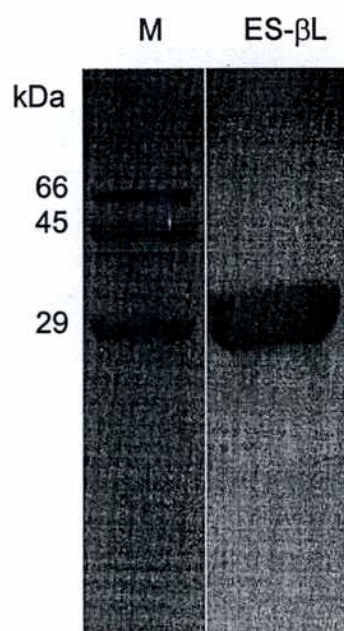


Figura 12. SDS-PAGE de la ES- β L después de la purificación y liofilización. Se sembraron en el gel 10 μ g de proteína liofilizada disueltos directamente en 15 μ l de *buffer* de muestra. M, marcadores de peso molecular, ES- β L, albúmina de huevo y albúmina sérica.

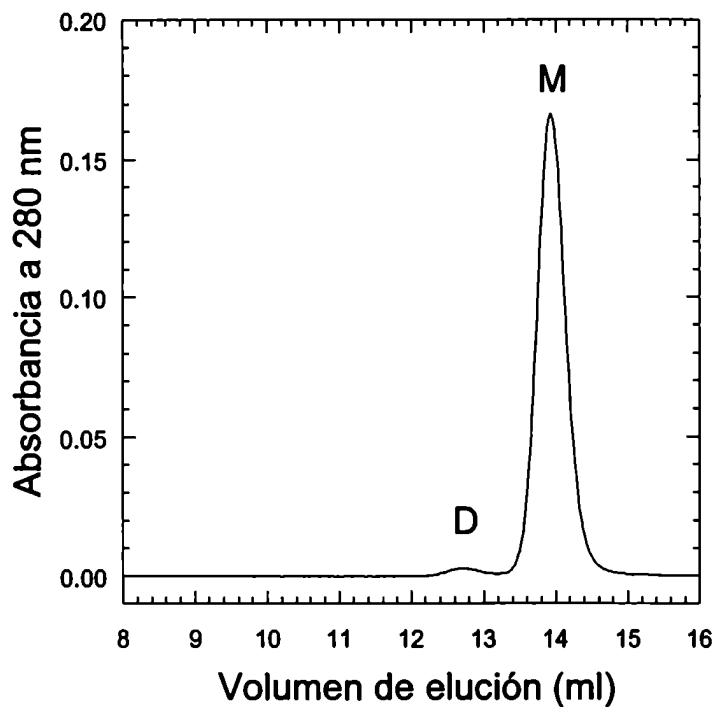


Figura 13. Cromatografía de exclusión molecular. ES- β L conserva sus propiedades hidrodinámicas luego de su purificación, congelado, liofilización y redisolución (ver texto). Se utilizó una columna Superosa 12, equilibrada con buffer fosfato de sodio 100 mM, pH 7.0 a un flujo de 0.5 ml/min. Se inyectaron 100 μ l de una solución 1.5 mg/ml.

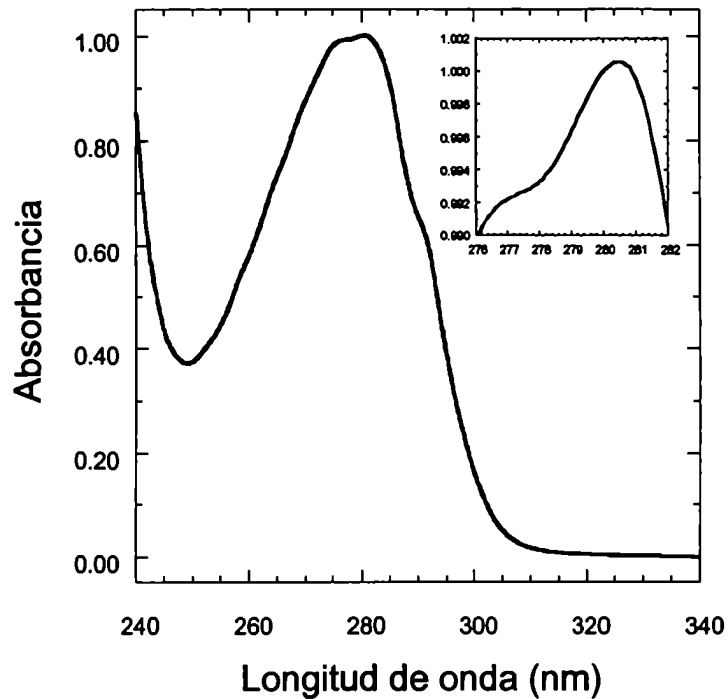


Figura 14. Espectro de absorción UV de ES-βL en el estado nativo. La determinación de las bandas de absorción de los residuos aromáticos Trp, Phe y Tyr posibilita inferir cualitativamente el estado conformacional de la macromolécula. En el inserto se muestra una relación típicamente nativa entre las bandas 277 y 280.5 nm. La observación de pendiente en el rango de 340-320 nm permite inferir y cuantificar el efecto de la dispersión de luz producida por agregación sobre el espectro (ver Capítulo II).

numérica (Figura 15B) la resolución aumenta significativamente: las bandas anchas en el espectro original tienden a desaparecer y los componentes agudos aparecen aumentados. En la derivación de orden cuatro, los máximos y mínimos coinciden con los máximos y mínimos del espectro original y su amplitud es inversamente proporcional a la cuarta potencia del ancho de la banda original [113].

Los espectros de absorción UV y cuarta derivada resultaron ser una herramienta sencilla para el análisis del plegado de ES-βL. En la región del UV cercano, entre 250 y 300 nm, se observan las transiciones electrónicas 1L_a y 1L_b de los residuos aromáticos. Las bandas 1L_b se manifiestan para Phe, Tyr y Trp. 1L_a se observa únicamente para Trp. Como se muestra en las Figuras 14 y 15A, la región por debajo de 270 nm está dominada por las transiciones 1L_b de Phe. Entre 270 y los 285 nm, la señal corresponde principalmente a las transiciones 1L_b de Tyr y $^1L_b+^1L_a$ de Trp. Por encima de 290 nm el Trp domina la absorción. El entorno promedio de los residuos de triptofano en el estado nativo de ES-βL es claramente no polar: la banda 1L_b del triptofano en el contexto nativo está centrada en 291.6 nm. En un modelo del estado desplegado, generado mediante la simulación del espectro de la proteína con espectros de N-acetil triptofanoamida (NATA) y N-acetil tirosinamida (NAYA) y fenilalanina disueltos en H₂O, la banda 1L_b está centrada en 289 nm. Un espectro prácticamente superponible se obtuvo después de tratar con proteinasa K durante 16 h a ES-βL^{CΔ19}, variante que conserva la composición de residuos aromáticos de ES-βL pero, a diferencia de esta última, es muy fácilmente degradada por proteasas. Así en la transición N↔U se produce un desplazamiento de más de 2 nm para esta banda de absorción. Este resultado sugiere que la técnica es suficientemente sensible para la detección de cambios conformacionales en el entorno de los residuos de Trp.

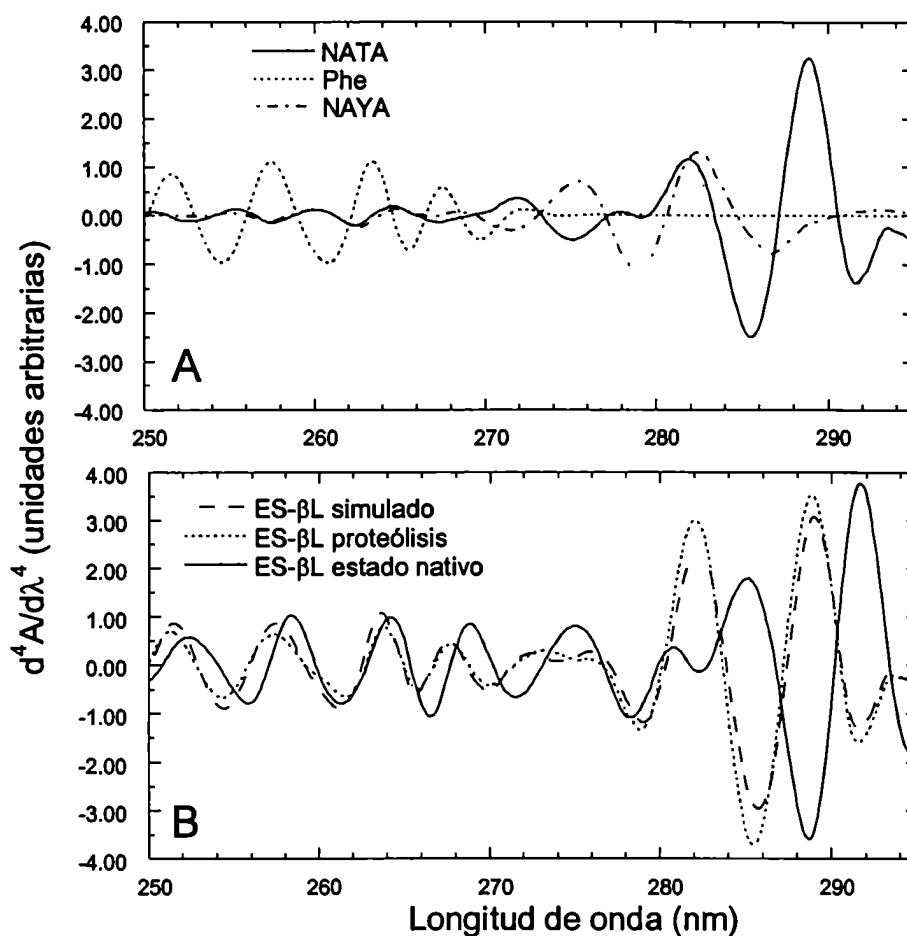


Figura 15. Análisis de cuarta derivada de espectros de absorción UV. Promedios de espectros de absorción UV correspondientes a residuos aromáticos preparados individualmente en *buffer* fosfato de sodio 100 mM, pH 7.0 fueron sumados y derivados (panel A) con el objeto de identificar bandas de absorción en espectros de cuarta derivada de ES-βL. El espectro de cuarta derivada del estado desplegado (panel B) fue simulado mediante la combinación correspondiente de los espectros de NATA, NAYA y Phe. También se muestra el espectro obtenido luego de proteólisis exhaustiva de la variante ES-βL^{CΔ19}, un modelo experimental razonable del estado desplegado (ver texto y Capítulo IV).

La banda centrada en 280.7 nm (probablemente Trp) como consecuencia del corrimiento hacia el 'rojo' de las bandas 1L_b del Trp y Tyr se resuelve muy bien en el estado nativo. Pero en el estado desplegado, por el contrario, hay solapamiento con las bandas correspondientes a las transiciones mencionadas más arriba. En conclusión, la banda de 280.7 nm pudo ser utilizada en este trabajo para el 'diagnóstico rápido' del estado conformacional de cada preparación de ES- β L y de sus variantes.

Dicroísmo circular

Los cromóforos más abundantes en péptidos y proteínas son los grupos amida de los enlaces peptídicos. Éstos poseen tres orbitales π . La transición $\pi_0 \rightarrow \pi^*$ está electrónicamente permitida y posee un $\epsilon_{\max} \sim 10^4 M^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (~190 nm). El momento dipolar magnético de esta transición está dirigido aproximadamente a lo largo de la dirección N \rightarrow O. El par de electrones n , relacionado con la transición $n\pi^*$, está localizado fundamentalmente en el oxígeno carbonílico (80-90 %), en un orbital $\sim 2p$, con su eje en el plano amida y diagonal al enlace carbonílico. El otro par de electrones del oxígeno (n) tiene carácter 2s y 2p, y su eje se encuentra en la dirección del enlace carbonílico. La transición $n\pi^*$ en amidas está prohibida electrónicamente y tiene un $\epsilon_{\max} \sim 100 M^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, sin embargo esta transición tiene un gran momento dipolar magnético direccionado a lo largo del enlace carbonílico. La longitud de onda de la transición amida $n\pi^*$ es muy sensible al solvente. En ambientes proteicos típicamente está centrada entre 215 y 222 nm.

Los espectros de CD en el UV lejano (180-240 nm) de ES- β L a 20 y 80 °C se muestran en la Figura 16 A. El contenido de estructura secundaria del estado nativo (20 °C) está de acuerdo con reportes previos [71]. El espectro a 20 °C es el esperado para una proteína $\alpha+\beta$ y coincide en forma general con espectros de otras β -lactamasas [70, 109, 114]. Cuenta con

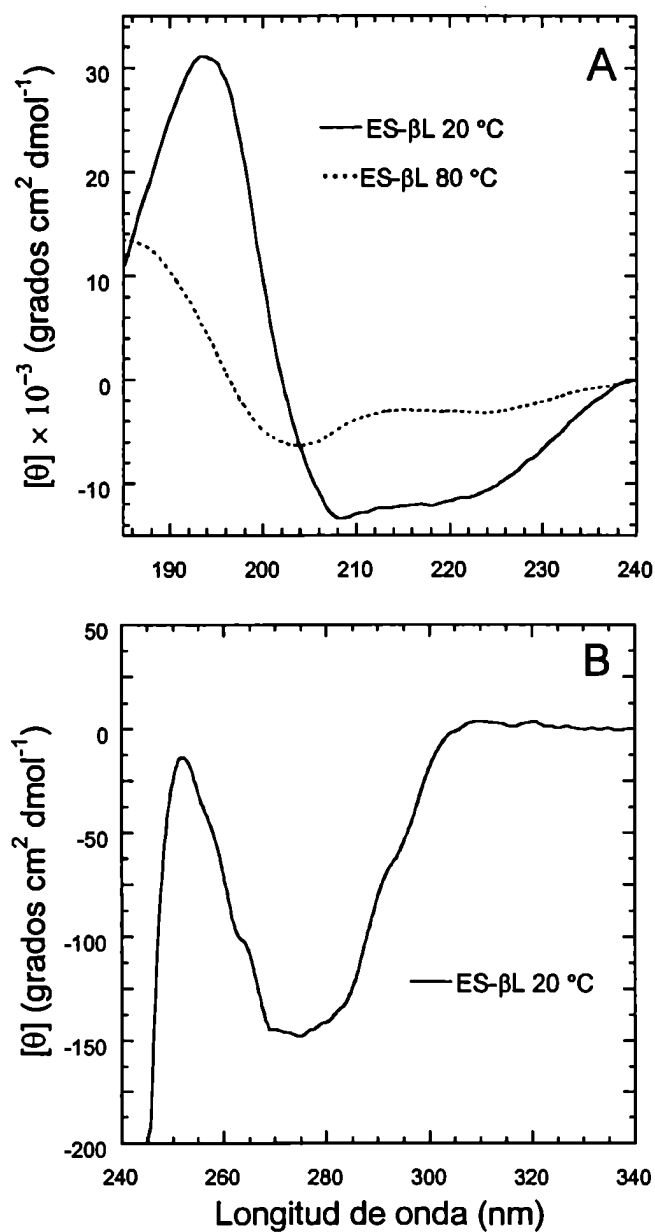


Figura 16. Panel A, CD en el UV lejano. Estructura secundaria en el estado nativo y el estado desplegado inducido por calor. Panel B, CD en el UV cercano, las bandas de absorción están asociadas a la existencia de asimetría en el entorno de los residuos aromáticos (estructura terciaria fija).

un máximo a 193-194 nm (transición $\pi \rightarrow \pi^*$ con polarización perpendicular al eje de la hélice α y dos mínimos, típicos de estructura rica en hélices α , uno a 208 nm, también relacionado con la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ pero con una polarización en el eje de la hélice, y otro a 218-222 nm (transición $n \rightarrow \pi^*$).

A 80 °C si bien la mayor parte de la estructura secundaria se ha perdido, se puede observar algo de estructura residual. El corrimiento observado para el máximo hacia longitudes de onda menores (190→185 nm) es típico de estructuras parcialmente plegadas y no de moléculas completamente desestructuradas.

En el UV cercano (Figura 16B), la contribución de las cadenas laterales aromáticas al espectro de CD de proteínas es producto de asimetría en su entorno y típica del estado nativo. La actividad dicroica en esta región es consecuencia de la existencia de estructuras rígidas y perfectamente empaquetadas en el entorno de los residuos aromáticos. El espectro obtenido para ES- β L concuerda con resultados previos [71] y se caracteriza por poseer bandas de absorción negativas, con excepción de la banda L_a de triptofano, positiva y ancha.

Fluorescencia

ES- β L posee tres residuos de triptofano en las posiciones 210, 229, y 251, con 2, 15, y 16 % de accesibilidad al solvente, respectivamente (Figura 17). De acuerdo con el espectro de fluorescencia nativo, ES- β L exhibe un pico de emisión centrado en 334 nm (Figura 18), típico de residuos de Trp en un entorno hidrofóbico. Otro indicador de que los Trp están protegidos del solvente en el estado nativo es su rendimiento cuántico ($Q = 0.24 \pm 0.02$). El desplegado inducido por GdmCl desplazó el pico de fluorescencia a 356 nm y provocó una

disminución de Q a 0.13 ± 0.01 , resultado típico de transferir residuos de Trp a soluciones acuosas (para Trp libre en solución, $Q = 0.14$, [105]).

Equilibrio de desplegado en GdmCl

Los experimentos de desplegado inducido por GdmCl seguidos por intensidad de fluorescencia, indicaron que ES- β L es una proteína sumamente estable (Figura 19A y Tabla 4). Aunque la transición en el equilibrio seguida por actividad enzimática fue prácticamente superponible a la curva de fluorescencia, una pequeña inflexión en la zona de pretransición sugiere una perturbación del equilibrio de dos estados ($N \leftrightarrow U$), indicando la estabilización de un intermediario ($I_{\text{GdmCl } 0.5-1}$). Este fenómeno fue observado más claramente usando un protocolo alternativo [81], en el que el tiempo de incubación en presencia de desnaturizante es menor. Un comportamiento similar ha sido reportado para la β -lactamasa de *E. coli* (TEM-1) cuando la transición es seguida por CD a 220 nm y el agente desnaturizante es GdmCl [66].

Las mediciones de R_S en el mismo rango de concentraciones de GdmCl (Figura 19B) demostraron la existencia de un estado levemente expandido de ES- β L ($I_{\text{GdmCl } 1.2}$), en equilibrio con especies desplegadas. El grado de compactación de estas últimas, a su vez, fue dependiente de la concentración de GdmCl. En la segunda parte de este capítulo se estudia el desplegado en urea y, como se verá, ES- β L posee múltiples estados parcialmente plegados, algunos descritos anteriormente, que se estabilizan a distintas concentraciones de desnaturizante en el equilibrio.

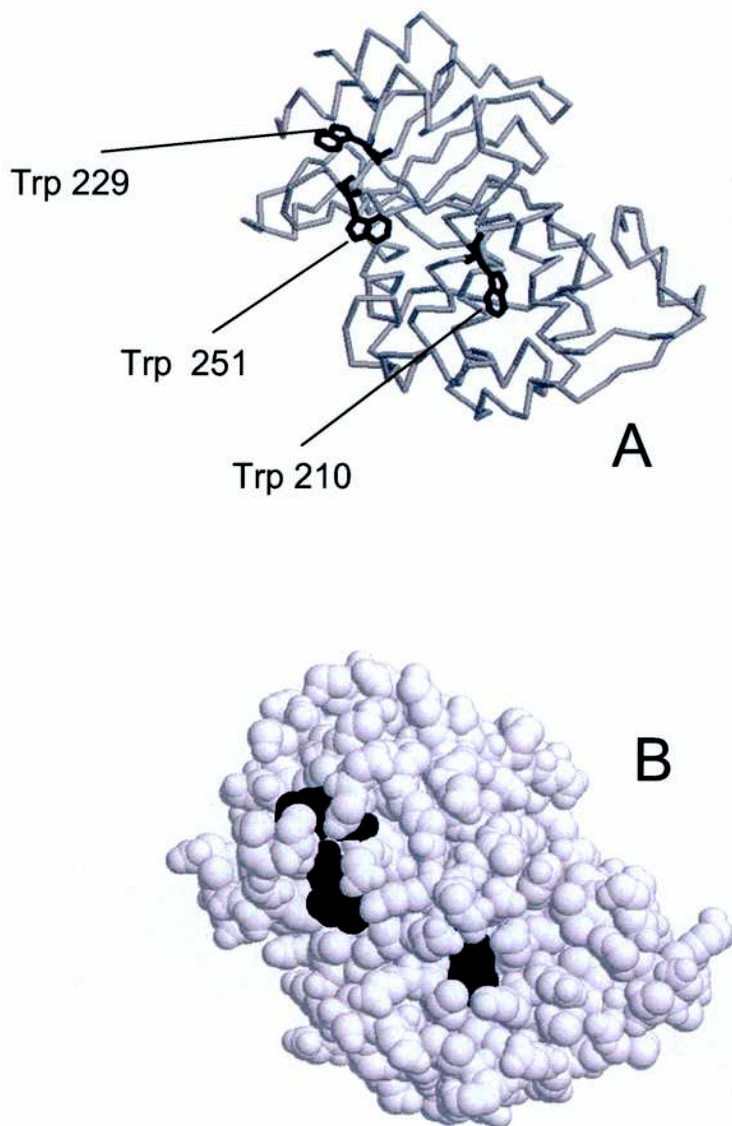


Figura 17. Accesibilidad al solvente de los residuos de triptofano en la β -lactamasa. Panel A, ES- β L posee tres residuos de triptofano en las posiciones 210 (dominio α), 229 (dominio $\alpha+\beta$), y 251 (interfase) con 2, 15, y 16 % de accesibilidad al solvente, respectivamente. Panel B, representación de espacio lleno (Trp en color azul). Se usó el programa Rasmol para representar la molécula.

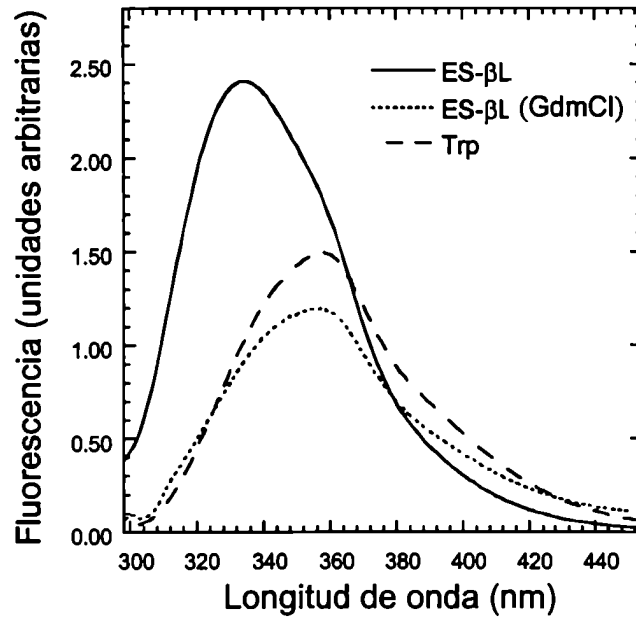


Figura 18. Espectros de emisión de fluorescencia de Trp. ES-βL posee un λ máximo de emisión a 334 nm mientras que el estado desplegado inducido por la adición de GdmCl posee un λ máximo completamente desplazado hacia el rojo (356 nm). Como consecuencia de la plena exposición al solvente, el espectro de Trp en solución acuosa muestra un máximo a 356 nm. La excitación se realizó a 295 nm.

Tabla 4. Parámetros termodinámicos cinéticos y de equilibrio del plegado de ES-βL

| | $\Delta G_{N \leftrightarrow U}^0$ (kcal mol ⁻¹) | m (kcal mol ⁻¹ M ⁻¹) | C_m^d (M) | k_u^0 (s ⁻¹) | k_f^0 (s ⁻¹) | m_u (s ⁻¹) | m_f (kcal mol ⁻¹ M ⁻¹) | $\beta_{N \rightarrow \ddagger}^e$ (kcal mol ⁻¹ M ⁻¹) |
|-------------------------|---|--|----------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|--|---|
| equilibrio ^a | 8.39 ^f | 6.58 | 1.28 | | | | | |
| cinética ^b | 7.25 | 7.27 ^e | 1.00 | 1.16×10^{-6} | 0.29 | 2.02 | 5.24 | 0.28 |

^a El desplegado fue inducido por GdmCl a 20 °C y seguido por fluorescencia de Trp (ver Fig. 19, panel A).

^b La transición fue seguida por actividad enzimática (ver Figura 20, Capítulo III). Los datos cercanos al punto medio de la transición fueron ajustados mediante la ecuación (7).

^c A concentración cero de desnaturalizante.

^d La concentración de desnaturalizante que causa el 50 % de desplegado fue calculada como $\Delta G_{N \leftrightarrow U}^0/m$.

^e m y $\beta_{N \rightarrow \ddagger}$ fueron calculados con las ecuaciones (9) y (10), respectivamente.

^f El error en el parámetro fue 10 % o menos, estimado por el método Monte Carlo [104].

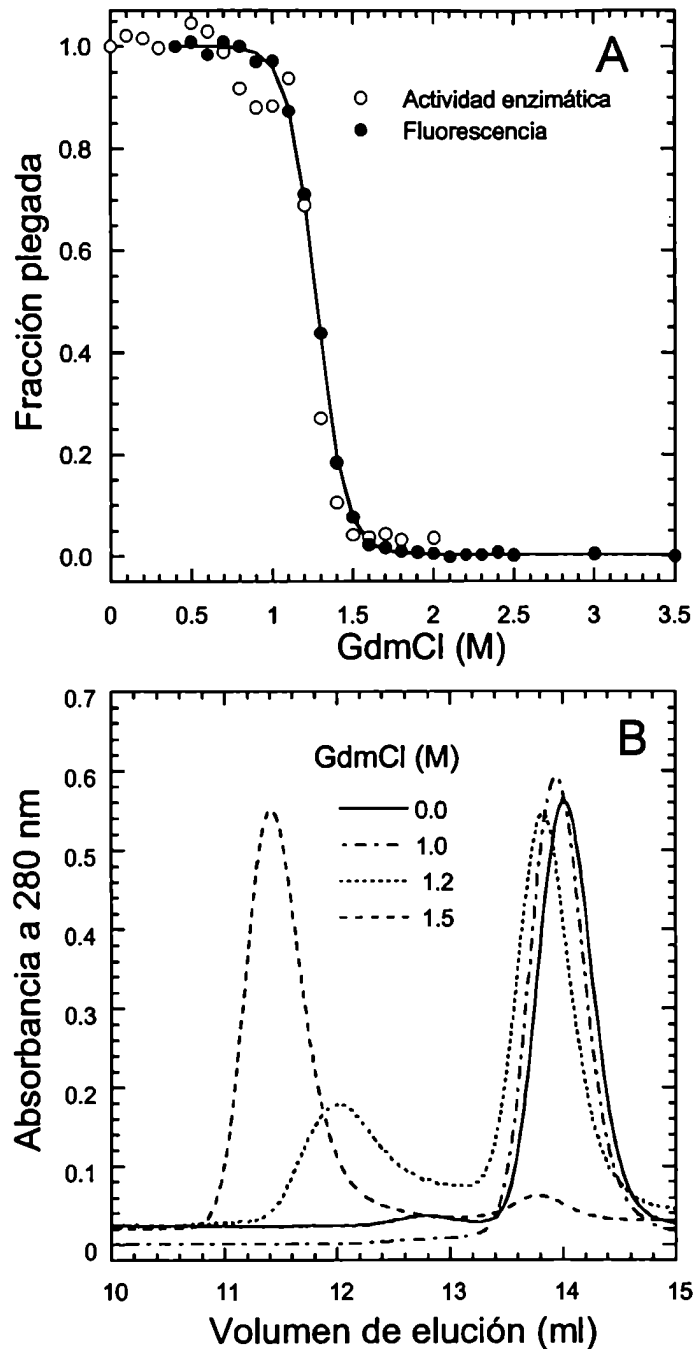


Figura 19. Equilibrio de desplegado de ES-βL inducido por GdmCl. Panel A: La disminución en la intensidad de fluorescencia pudo ser ajustada a un equilibrio de dos estados. La disminución en la actividad enzimática, por el contrario, muestra perturbaciones que podrían indicar la presencia de un intermediario a concentraciones de GdmCl ~1 M. Panel B: Por SEC-FPLC, a concentraciones de desnaturalizante 1-1.2 M se observó una pequeña expansión de las moléculas. En GdmCl 1.2 M es evidente la presencia de una fracción con propiedades intermedias entre el estado nativo y el desplegado.

Cinética del plegado de ES-βL

El replegado de ES-βL a 10 y 20 °C, por dilución desde 5 a 0.05 M GdmCl fue seguido por actividad enzimática (Figura 20A). El resultado pudo ser ajustado a una función exponencial simple y el tiempo de relajación ($1/k_F$) fue de 1.7 min a 20 °C, y de 3.3 min a 10 °C. En estas condiciones experimentales la recuperación de proteína replegada fue del 100 %.

Gráficos de Chevron

Las velocidades de replegado y desplegado a 20 °C en función de la concentración de desnaturizante (GdmCl) se muestran en la Figura 20 y Tabla 4. Alícuotas de proteína en estado nativo o desplegado, 0 y 5 M GdmCl, respectivamente, se diluyeron rápidamente hasta la concentración de desnaturizante indicada (concentración de proteína final constante) y se midió el incremento o la disminución de actividad enzimática en función del tiempo de replegado o desplegado respectivamente.

La medición de actividad se hizo por medio de un ensayo óptico rápido (15-20 s, ver Materiales y Métodos) para minimizar cambios en la fracción nativa durante la medición. Para cada concentración de desnaturizante se calculó la constante cinética para la formación o el desplegado del sitio catalítico. Como el tiempo muerto fue ~15 s, incluyendo dilución y transferencia a la celda de las muestras, sólo las reacciones con tiempos de relajación mayores que 20 s pudieron ser estudiadas con esta metodología. Afortunadamente, esta no fue una limitación porque todos los tiempos de relajación fueron ≥ 30 s.

Por debajo de 0.4 M de desnaturizante, la velocidad del replegado de ES- β L fue constante con $\tau = 105$ s. Como la dependencia del logaritmo de la velocidad de replegado con respecto a la concentración de desnaturizante es proporcional a la diferencia en superficie expuesta entre el estado basal y el estado de transición, se deduce que, bajo condiciones fuertemente nativas, el plegado de ES- β L atraviesa el paso limitante con poco o ningún cambio de superficie. En otras palabras, el estado de transición en esta condición tendría una superficie accesible al solvente similar al estado nativo. El hecho de que el agregado de sulfato de sodio no tenga efecto sobre la velocidad de replegado a bajas concentraciones de GdmCl da mayor sustento experimental a la conclusión anterior (con una mayor área expuesta se observaría un mayor efecto del sulfato de sodio). Alternativamente el aplanamiento de la curva podría deberse a la presencia de intermediarios cinéticos en equilibrio rápido [42].

Entre concentraciones de desnaturizante de 0.6 y 2 M el diagrama de ES- β L exhibe la típica forma en 'V' para procesos de plegado que involucran dos estados y los datos pueden ser ajustados adecuadamente a la ecuación (7), con los parámetros cinéticos listados en la Tabla 4. Los resultados obtenidos de $\Delta G_{N \leftrightarrow U}^0$ y m de experimentos de cinética están razonablemente de acuerdo con los obtenidos en el equilibrio. Sin embargo la C_m calculada a partir de experimentos de cinética fue 1.0 M, significativamente menor que el valor obtenido en el equilibrio (1.3 M). Esta discrepancia puede deberse a que, en el caso de ES- β L, la fluorescencia es menos sensible a la desnaturización que la actividad (ver Figura 19A). El $\beta_{N \rightarrow \ddagger}$ (ver ecuaciones (9) y (10)) fue 0.28, implicando que el estado de transición es, en cuanto a la superficie expuesta, más cercano a N que a U. El replegado desde 2.5 M a 0.3 M de GdmCl a 20 °C seguido por fluorescencia de los Trp (excitación a

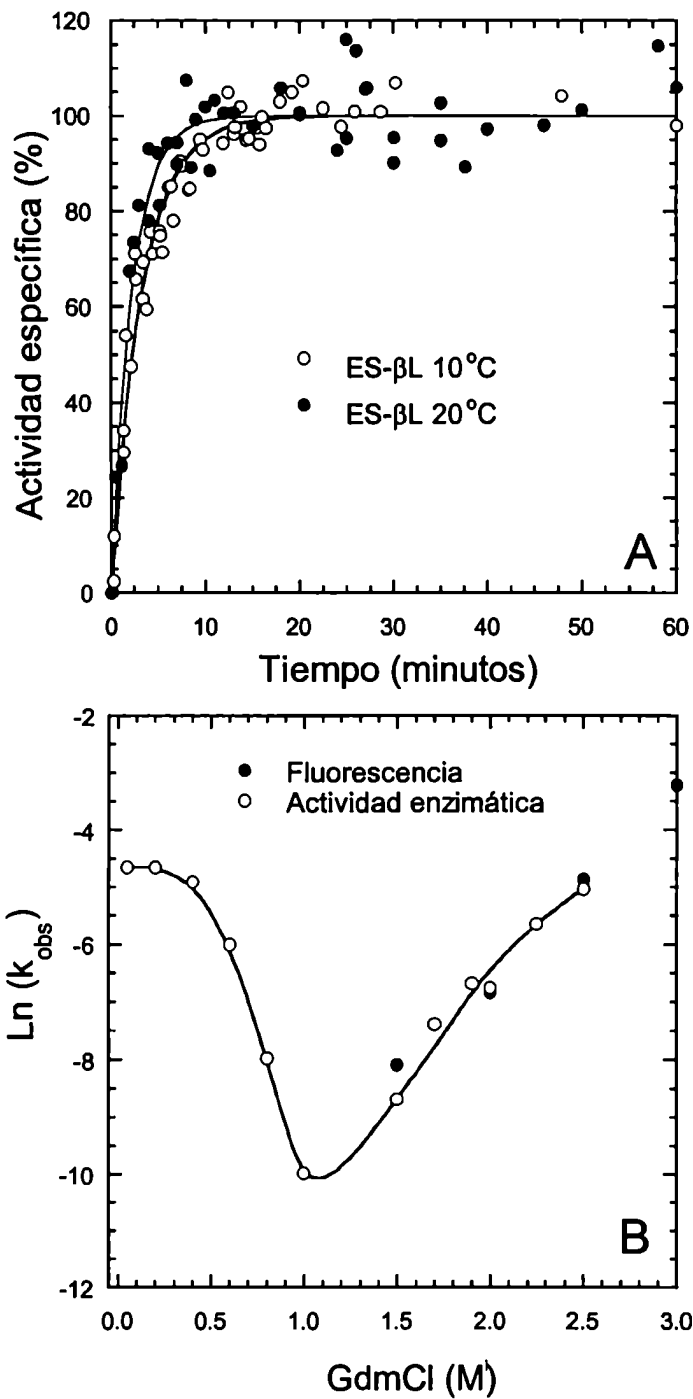


Figura 20. Cinética de plegado y desplegamiento de ES-βL. Panel A, experimento de replegado desde GdmCl, 5 M a GdmCl, 0.05 M en buffer fosfato de sodio 100 mM, pH 7 seguido por actividad enzimática. Panel B, gráfico de Chevron construido con constantes de plegado y desplegamiento seguidas por actividad enzimática. Se agregan puntos de desplegamiento seguidos por fluorescencia.

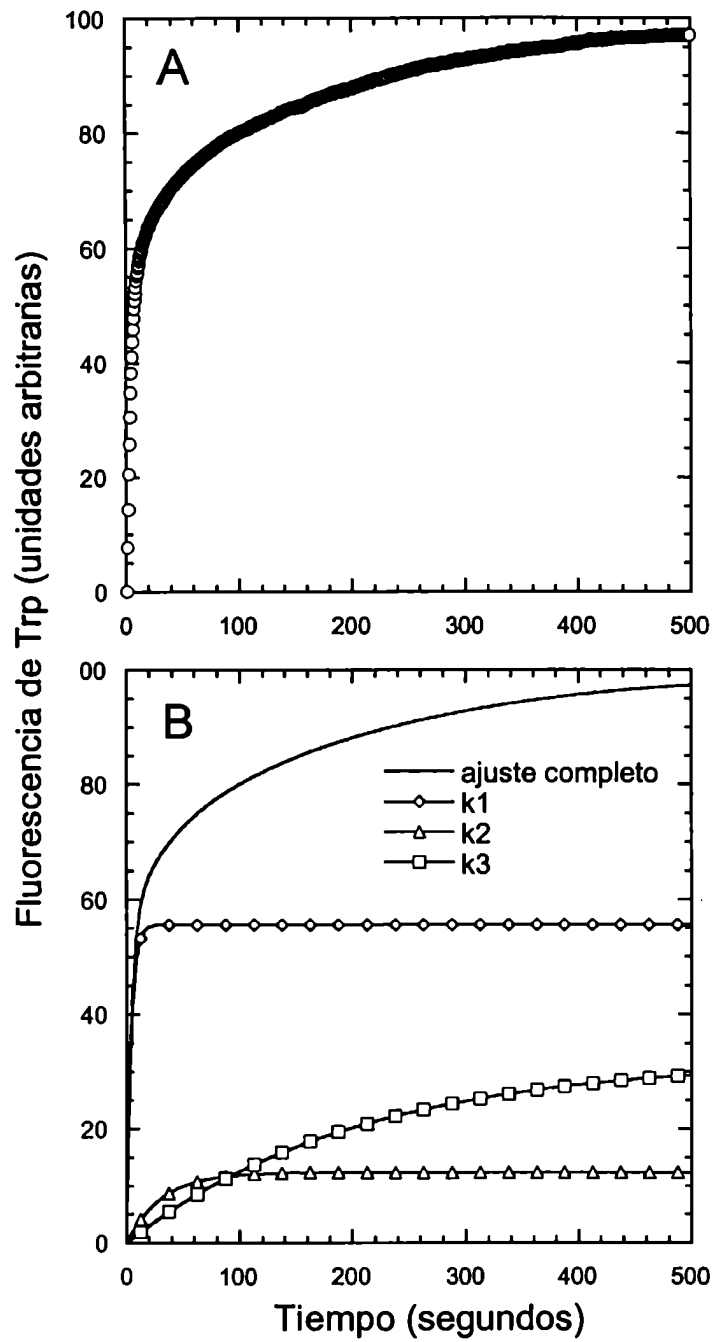


Figura 21. Plegado seguido por fluorescencia-*stopped-flow*. El replegado desde 2.5 M a 0.3 M de GdnCl a 20 °C seguido por fluorescencia de los Trp (excitación a 295 nm y emisión por encima de 320 nm) indicó un mecanismo complejo con varias fases (por lo menos tres).

295 nm y emisión por encima de 320 nm) indicó un mecanismo complejo con varias fases (por lo menos tres) pero que puede estudiarse en un 100 % de su amplitud (ver Figura 21). Una fase rápida ($k_1 = 0.25 \text{ s}^{-1}$), donde se gana más del 56 % de la fluorescencia nativa, una fase intermedia ($k_2 = 0.033 \text{ s}^{-1}$) del 12 % de amplitud, y una fase lenta ($k_3 = 0.005 \text{ s}^{-1}$) que da cuenta del resto de la amplitud y se corresponde con la aparición de actividad enzimática ($k_F, 0.4 \text{ M GdmCl} = 0.007 \text{ s}^{-1}$). Esto implica que la formación del sitio activo ocurre en un estado compacto con los residuos de Trp protegidos del solvente.

Para las β -lactamasas de *E. coli* (TEM) y *S. aureus* (PC1) [115-117] se propuso que los eventos tardíos en el plegado están relacionados con la configuración *cis* del enlace peptídico 166-167 (a pesar de que el residuo 167 no es prolina). Como ES- β L sí posee una prolina en la posición 167, una proporción de enlaces en *cis* debería ya existir en el estado desplegado, y por lo tanto se esperaría para la ganancia de actividad enzimática una fase rápida y una lenta. Sin embargo, como la curva de actividad para ES- β L sigue una exponencial simple que extrapola a cero, parece poco probable que la isomerización de prolinas fuese la limitante de la velocidad.

Equilibrio de desplegado en urea

El desplegado de ES- β L inducido por urea seguido por fluorescencia de Trp presentó más complejidad que el desplegado por GdmCl (Figura 22 y Figura 19A, respectivamente). Por lo tanto el ajuste del modelo de dos estados ($N \leftrightarrow U$) a los datos experimentales resultó inadecuado y se apeló al modelo de tres estados ($N \leftrightarrow I \leftrightarrow U$). Los parámetros termodinámicos derivados del ajuste a los datos se muestran en la Tabla 5. El experimento reveló una primer transición poco definida entre 2 y 4 M urea (transición $N \leftrightarrow I_{\text{urea } 2-4}$). El estado intermediario I posee cerca del 80 % de la fluorescencia nativa y podría

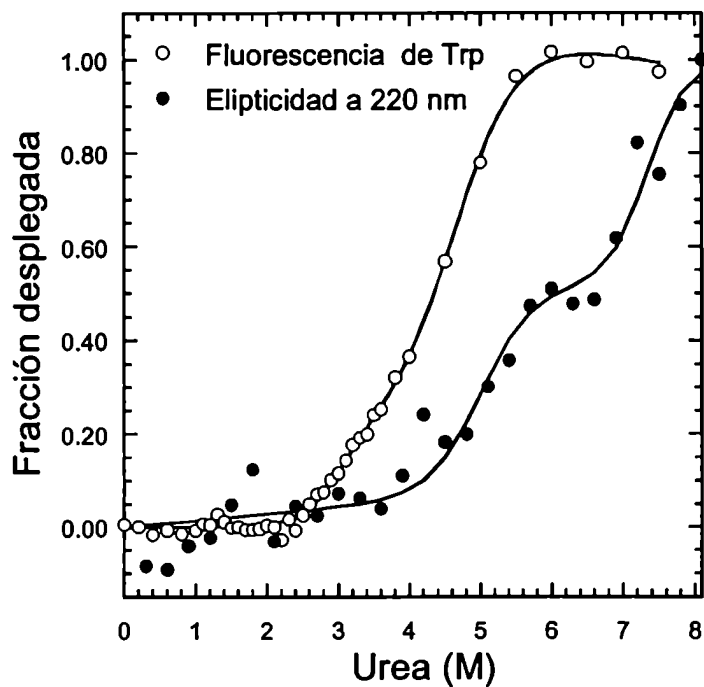


Figura 22. Equilibrio de desplegamiento de ES-βL inducido por urea, seguido manualmente por fluorescencia de triptofanos (excitación a 295 nm y emisión a 336 nm) y CD a 220 nm. Las curvas representan ajustes de modelos de tres estados (ver Capítulo. II).

Tabla 5. Propiedades termodinámicas de ES-βL y de las mutantes de cisteína

Desplegado en urea seguido por fluorescencia de Trp (tres estados, N↔I↔H)

| Variante | $\Delta G_{N\leftrightarrow I}^0$ | $m_{N\leftrightarrow I}$ | $Cm_{N\leftrightarrow I}$ | $\Delta G_{I\leftrightarrow H}$ | $m_{I\leftrightarrow H}$ | $Cm_{I\leftrightarrow H}$ |
|-------------|-----------------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| ES-βL | 7.4 | 2.5 | 3.0 | 6.4 | 1.4 | 4.6 |
| S126C ES-βL | 7.9 | 2.4 | 3.3 | 7.2 | 1.7 | 4.3 |

Desplegado en urea seguido por fluorescencia de Trp (dos estados, N↔U)

| Variante | $\Delta G_{N\leftrightarrow U}$ | $m_{N\leftrightarrow U}$ | $Cm_{N\leftrightarrow U}$ |
|-------------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| S265C ES-βL | 8.7 | 3.6 | 2.4 |
| S126C S265C ES-βL | 10.3 | 4.1 | 2.5 |

Desplegado en urea seguido por CD a 220 nm (tres estados, N↔H↔U)

| Variante | $\Delta G_{N\leftrightarrow H}$ | $m_{N\leftrightarrow H}$ | $Cm_{N\leftrightarrow H}$ | $\Delta G_{H\leftrightarrow U}$ | $m_{H\leftrightarrow U}$ | $Cm_{H\leftrightarrow U}$ |
|-------------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| ES-βL | 9.2 | 1.8 | 5.1 | 17.0 | 2.3 | 7.4 |
| S126C ES-βL | 8.8 | 1.8 | 4.8 | 16.5 | 2.3 | 7.3 |
| S126C S265C ES-βL | 9.5 | 2.8 | 3.4 | 6.5 | 1.3 | 4.9 |

Desplegado en urea seguido por CD a 220 nm (dos estados, N↔U)

| Variante | $\Delta G_{N\leftrightarrow U}$ | $m_{N\leftrightarrow U}$ | $Cm_{N\leftrightarrow U}$ |
|-------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| S265C ES-βL | 13.95 | 4.1 | 3.4 |

Las unidades de los parámetros termodinámicos calculados para el proceso de desplegado genérico $z\leftrightarrow w$ en el equilibrio son $\Delta G_{z\leftrightarrow w}$, kcal mol⁻¹; $Cm_{z\leftrightarrow w}$, M; $m_{z\leftrightarrow w}$ (kcal mol⁻¹M⁻¹). En el mecanismo de tres estados se indica la fracción de estructura presente en el intermediario. Los parámetros fueron calculados a partir de las figuras 22, 28 y 29. En el texto se describen las estructuras I y H.

corresponderse con los intermediarios compactos observados en los experimentos de desplegado en GdmCl seguido por actividad enzimática (ver más arriba). El ΔG total, considerando las dos transiciones evidenciadas por fluorescencia es de $13.8 \text{ kcal mol}^{-1}$, un valor que indica la gran estabilidad de la molécula.

Aunque ambas son bifásicas, las curvas de fluorescencia y CD claramente no coinciden (Figura 22). La estructura secundaria resultó mucho más estable que la estructura terciaria. La transición seguida por CD resulta en un cambio energético de $26.2 \text{ kcal mol}^{-1}$, un valor muy alto. Esto indica la existencia de por lo menos otro estado intermediario, diferente de I, estable a altas concentraciones de urea.

Ya hace tiempo se había descrito para la β -lactamasa de *S. aureus* PC1 un intermediario estable a 0.8 M GdmCl , el estado 'H', que posee la fluorescencia del estado desplegado pero conserva cerca del 60 % de estructura helicoidal determinada por CD [32, 110, 118]. Un estado similar (glóbulo fundido) se ha descrito en el caso de la β -lactamasa de *E. coli* RTEM [111] para el que ambas sondas, CD a 220 nm e intensidad de fluorescencia, tampoco coinciden. Vale la pena destacar que H posee una conformación más expandida que N pero menos expandida que U [69, 110], y que el incremento en las dimensiones de la molécula (monitoreado por SEC-FPLC) posee la misma dependencia con respecto a la concentración de desnaturalizante que la disminución de elipticidad a 220 nm [34]. Además el estado H no posee señal dicróica en el UV-cercano ($240\text{-}340 \text{ nm}$). Esto representa ausencia de asimetría en el entorno de los residuos aromáticos, dicho de otra manera ausencia de estructura terciaria rígida. Sin embargo H, al igual que U está conectado cinéticamente a N a través de I [69]. I no posee actividad enzimática, es más compacto que

H y tampoco posee señal dicroica en el UV-cercano. Los espectros de RMN de alta resolución demuestran que I posee una reducción dramática de interacciones terciarias.

La curva de desplegamiento por urea seguida por elipticidad a 220 nm (Figura 22) reveló por primera vez la existencia de H para ES-βL. A diferencia de la β-lactamasa PC1, que exhibe una sola transición, la curva de desplegamiento de ES-βL exhibe dos. La segunda transición implica la existencia de un segundo estado H, H_{urea 6-7}, que tiene ~50 % de la elipticidad nativa y la fluorescencia de U. El proceso de desplegamiento en el equilibrio para ES-βL, entonces, podría representarse mínimamente como el equilibrio entre las conformaciones



Variantes de cisteína

Purificación de las variantes S→C

Las tres variantes fueron purificadas en condiciones nativas utilizando el mismo protocolo que fue usado para purificar la ES-βL natural. La variante S126C ES-βL fue aislada con el mismo rendimiento que ES-βL. S265C ES-βL y S126C/S265C ES-βL mostraron durante las incubaciones a pH 5.0, una tendencia mucho mayor a la agregación, comparadas con la ES-βL.

Caracterización general de las variantes S→C

Las características hidrodinámicas (Tabla 6) y espectroscópicas (Tabla 6 y Figuras 23, 24 y 25) de las variantes S→C son prácticamente indistinguibles de las de ES-βL. Por lo tanto puede afirmarse que la ES-βL y sus variantes con cisteína poseen el mismo grado de compactación, topología, y en general el mismo empaquetamiento de las cadenas laterales de sus residuos aromáticos. Los tioles incorporados en las variantes no reaccionaron con el

Tabla 6. Propiedades generales de las variantes S→C.

| Variante | R_S (Å) | Q^a | [SH] ^b | AE^c (%) |
|-------------------|--------------|-----------|-------------------|---------------|
| ES-βL | 25.3±0.7 | 0.24±0.02 | 0.00 | 100 |
| S126C ES-βL | 25.4 | 0.26±0.01 | 1.04±0.05 | 52.0±4.5 |
| S265C ES-βL | 25.6 | nd | 1.07±0.03 | 86.0±5.6 |
| S126C S265C ES-βL | 25.5 | 0.29±0.02 | 2.08±0.06 | 53.6±2.9 |

^aEs el resultado de dos experimentos independientes. Como estándar se utilizó Trp libre en *buffer* fosfato 100 mM, pH 7.0. El cálculo y otras condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos.

^bSe calculó la relación de concentraciones molares [SH]/[proteína] en urea 6 M, pH 7.0.

^cActividad enzimática específica observada con respecto a ES-βL. El experimento se realizó a 25 °C y concentraciones saturantes de sustrato (ver Materiales y Métodos).

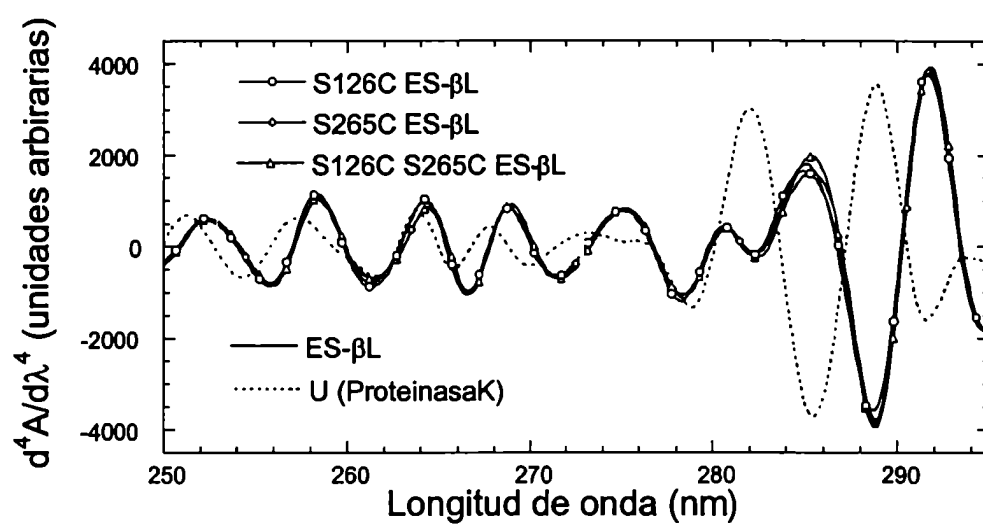


Figura 23. Cuarta derivada de espectros de absorción en el UV de las variantes S→C: comparación con ES-βL. También se muestra el espectro de la proteólisis exhaustiva de la variante ES-βL^{CA19}.

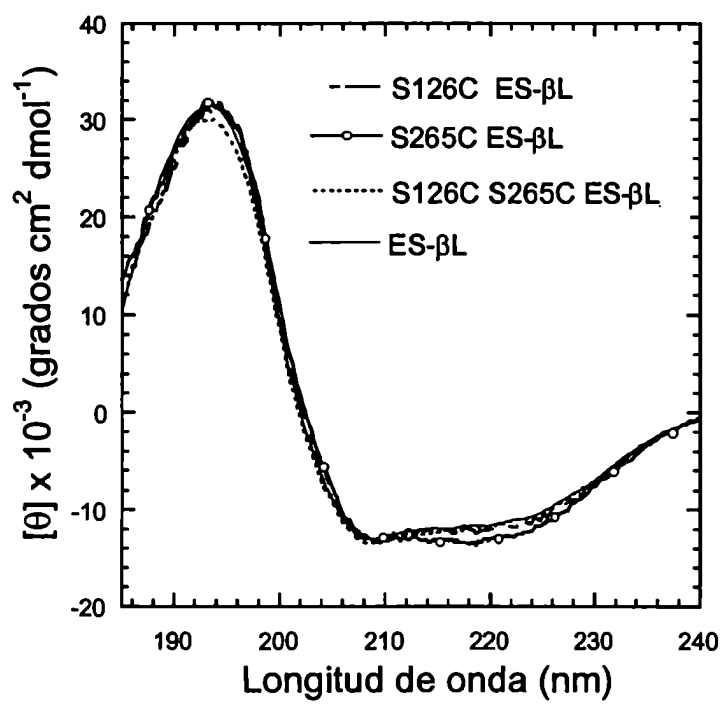


Figura 24. CD en el UV lejano de las variantes S→C: comparación con ES-βL.

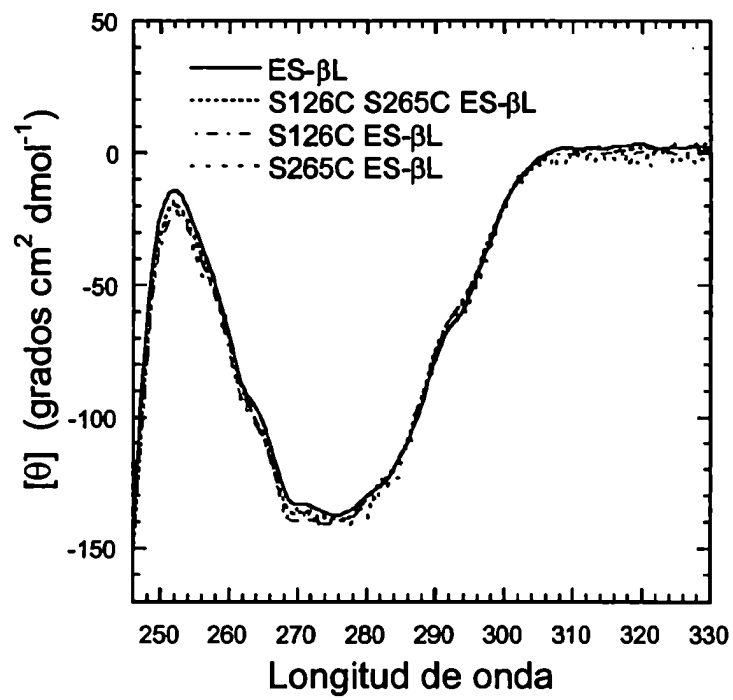


Figura 25. CD en el UV cercano de la variantes S→C.

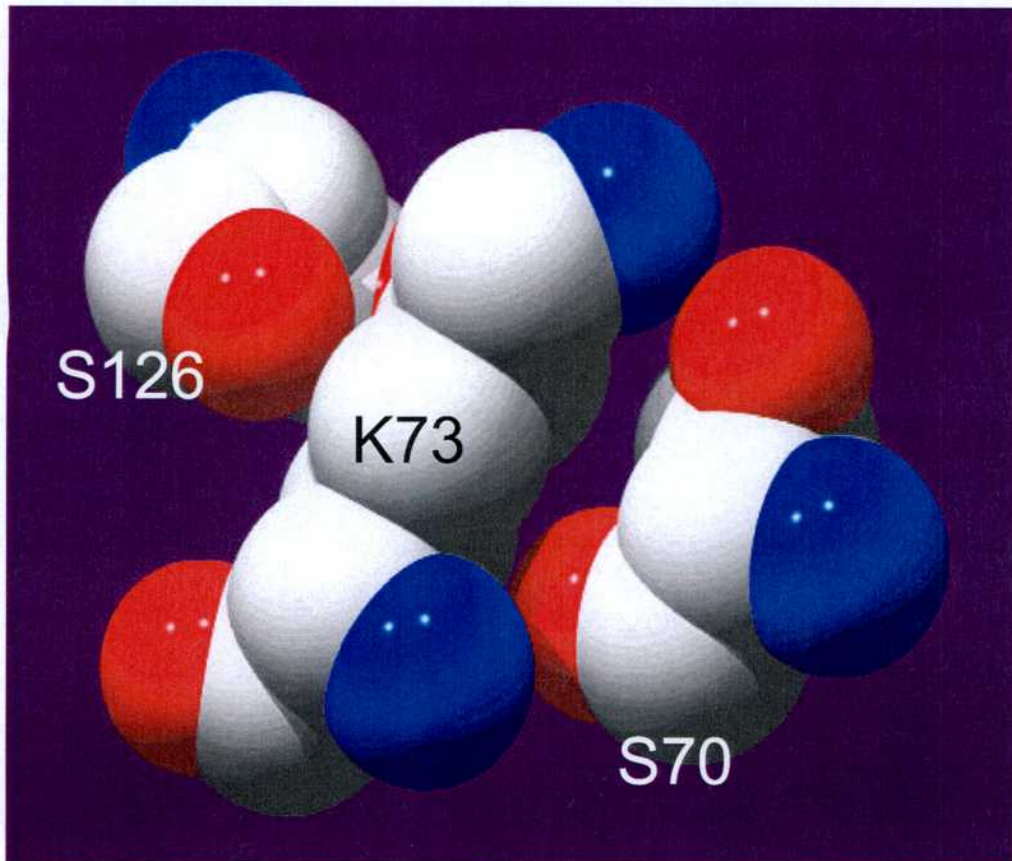


Figura 26. Empaquetamiento en la región del sitio activo. La Ser 126 está ubicada a sólo 7.44 Å (distancia entre O-O de las cadenas laterales) de la serina catalítica (Ser70).

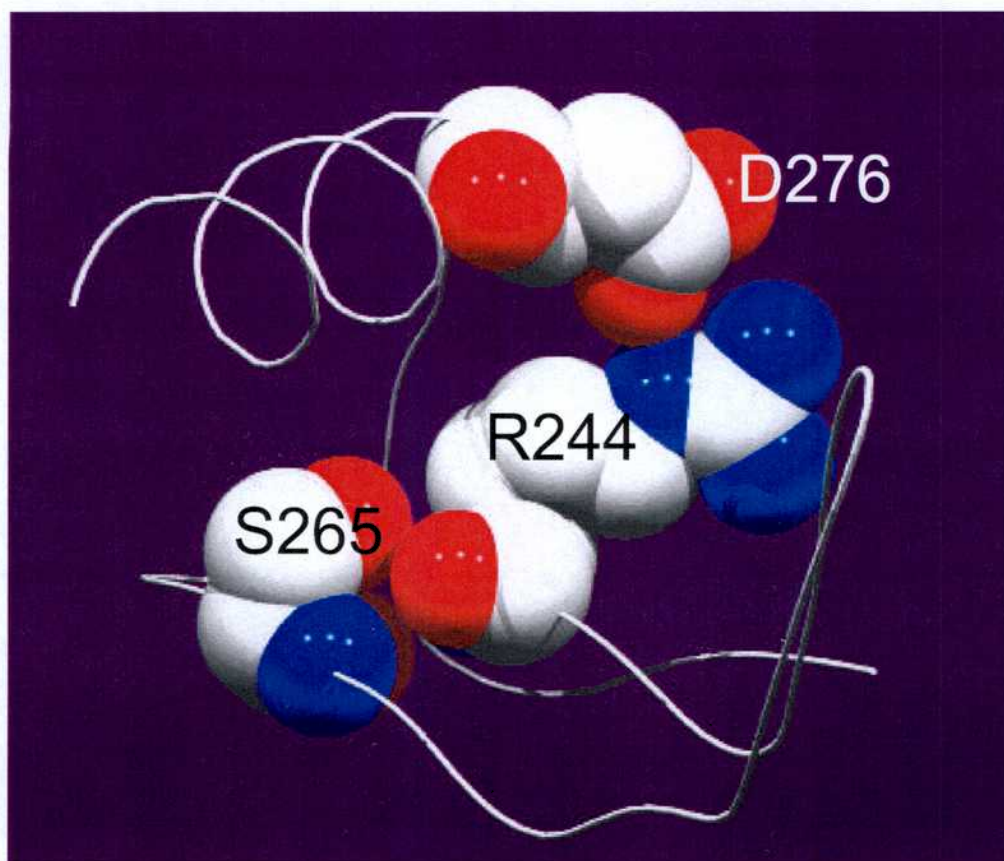


Figura 27. El -OH de la Ser 265 interacciona a través de un puente de hidrógeno con el oxígeno de Arg 244. La cadena lateral de este último residuo estabiliza a la hélice $\alpha 11$ sobre la lámina β a través de un puente salino con el Asp 276.

DTNB en condiciones nativas, sin embargo en urea 6-8 M fueron completamente accesibles al reactivo (Tabla 6). La variante S126C ES-βL posee sólo cerca del 50 % de la actividad específica de ES-βL (Tabla 6). Esta disminución probablemente esté relacionada con cambios sutiles en el empaquetamiento de residuos en la región del sitio activo (Figura 26). La serinas 126 y 70 están separadas por 7.44 Å (distancia entre oxígenos de las cadenas laterales). En cambio, la ligera disminución de actividad específica en el caso de la variante S265C ES-βL ($AE= 80-90\%$) podría estar asociada simplemente a un cambio pequeño en la dinámica general de la conformación nativa (la distancia entre O-O de las cadenas laterales es de 13.88 Å). Además, esta última variante podría contar con un puente de hidrógeno menos (Figura 27), ya que el grupo OH de la Ser 265 participa de una unión no covalente con el oxígeno peptídico de la Arg 244 y el reemplazo de oxígeno por azufre podría debilitar esa interacción.

Desplegado por urea de las variantes S→C

Para determinar el efecto termodinámico que tienen las mutaciones sobre la estabilidad global de ES-βL y sobre la estabilidad de los estados parcialmente plegados estabilizados a concentraciones intermedias de desnaturizante se realizaron experimentos de equilibrio de desnaturalización en urea. Se siguió la integridad de la estructura terciaria y secundaria por fluorescencia y CD, respectivamente (Figuras 28, 29 y 30 y en la Tabla 5). A continuación, dada la complejidad de los equilibrios, sólo se realizará un análisis semicuantitativo de los resultados. En particular, debe tenerse en cuenta que al asumir modelos, éstos son siempre los más sencillos y la elección no descarta modelos más complejos.

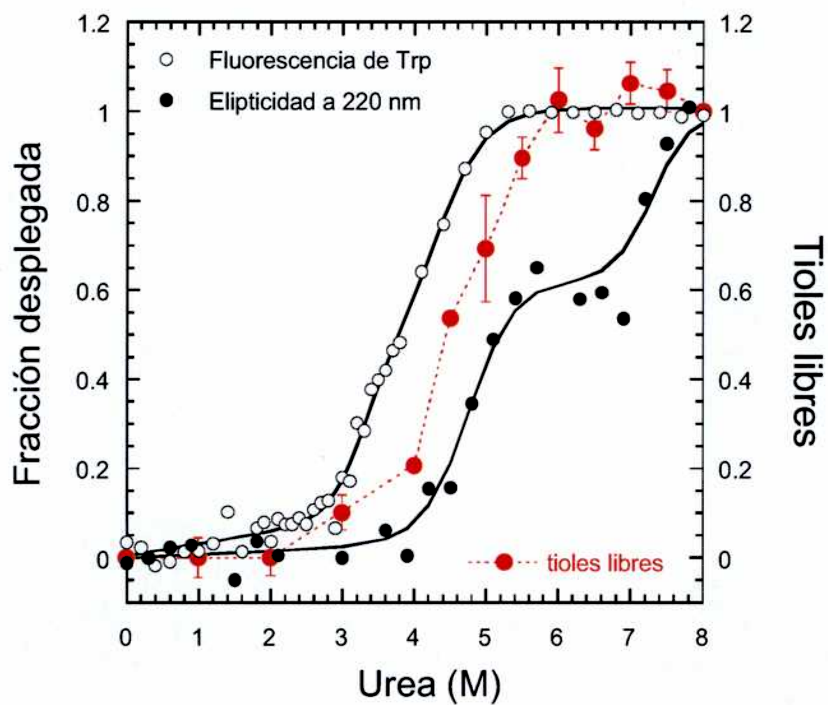


Figura 28. Equilibrio de desplegamiento de S126C ES- β L inducido por urea, seguido por fluorescencia de triptofanos (excitación a 295 nm y emisión 336 nm) y CD a 220 nm. Notar la presencia del intermediario H (por CD entre urea 5.5 y 6.5 M). Paralelamente, el desplegamiento se siguió por la accesibilidad del tiol.

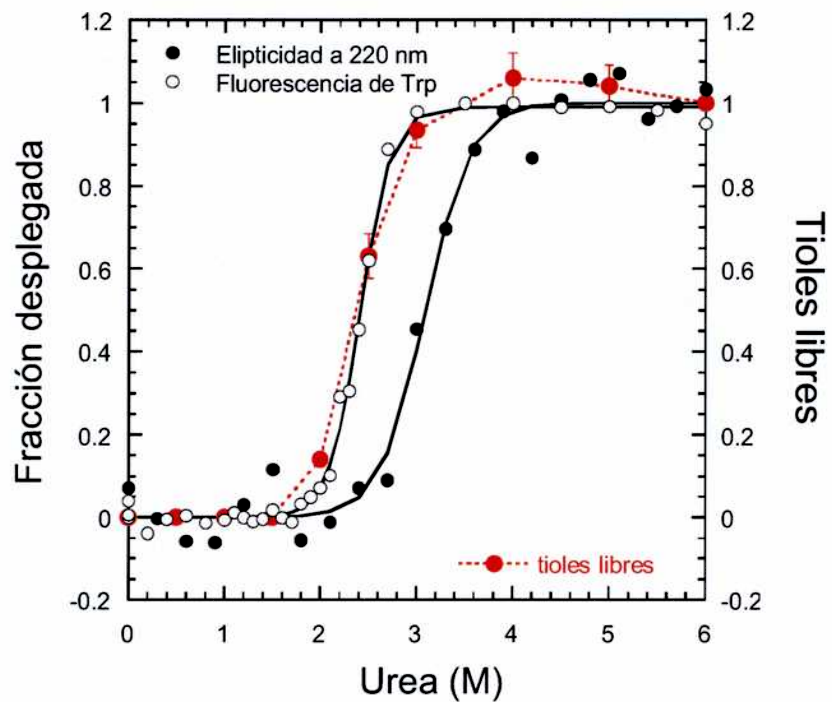


Figura 29. Equilibrio de desplegamiento de S265C ES- β L inducido por urea. Se midió la fluorescencia de triptofanos (excitación a 295 nm y emisión 336 nm) y el CD a 220 nm. Notese la falta de I_{2-4} (curva de fluorescencia) y la ausencia del intermediario H (ver figuras 22 y 28). El desplegamiento también se siguió por la accesibilidad del tiol incorporado.

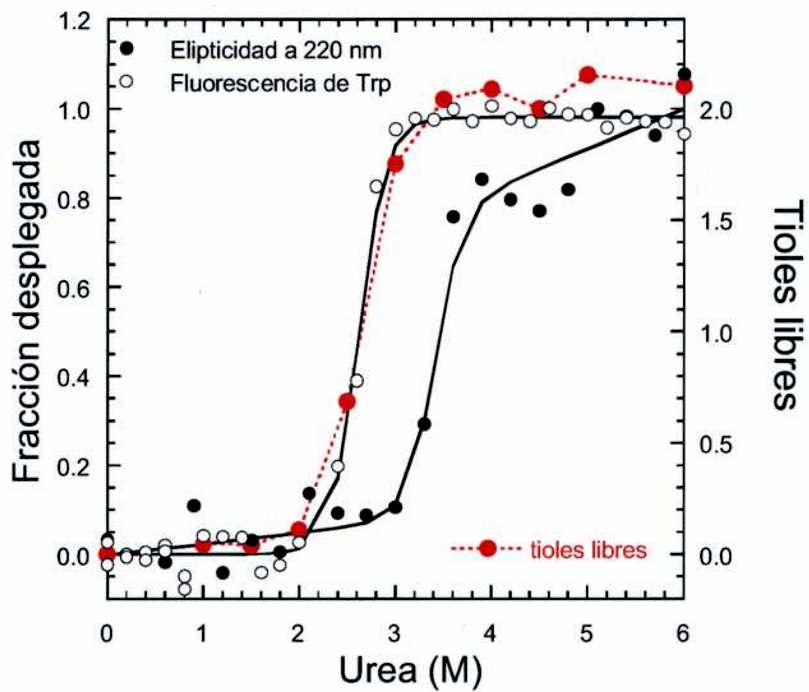


Figura 30. Equilibrio de desplegamiento de S126C S265C ES- β L inducido por urea, seguido por fluorescencia de triptofanos (excitación a 295 nm y emisión a 336 nm y CD a 220 nm y accesibilidad del tiol.

El comportamiento de la variante S126C ES-βL fue muy similar al de la proteína natural. La primer conclusión es, entonces, que la mutación S→C en la posición 126 no tiene mayores consecuencias sobre el complejo equilibrio y la estabilidad global de ES-βL.

Esta conclusión es muy importante para la interpretación de los datos de modificación química que se analizarán más adelante.

El resultado de los estudios de equilibrio para S265C ES-βL es muy diferente al observado para ES-βL y S126C ES-βL. El efecto de la mutación, por demás inesperado, es la desestabilización de los estados intermedios de plegado respecto al estado nativo. En efecto, el cambio de energía para la pérdida de estructura nativa es de $\sim 9 \text{ kcal mol}^{-1}$, prácticamente equivalente a la energía involucrada en la primer transición que sufren ES-βL y S126C ES-βL. Lo notable es que no existe una segunda transición. En S265C ES-βL, se pasa directamente a U, no se observan los estados con fluorescencia parcial, y sólo uno de los estados H es lo suficientemente estable como para ser observado por dicroísmo circular. La mutación transforma el equilibrio de plegado de tal forma que ahora el experimento puede ser explicado globalmente asumiendo solo tres estados: $N \leftrightarrow H_{\text{urea } 3-5} \leftrightarrow U$. La existencia de H, sólo se denota por el pequeño desfasaje de las curvas, ya que ambas señales, individualmente, pueden ajustarse a un mecanismo de sólo dos estados. El valor de m para las transiciones seguidas por fluorescencia y CD es, en ambos casos, cercano al m total sumado sobre toda la transformación (tres estados) que sufren ES-βL y S126C ES-βL. Esto es lo esperado, ya que el m total debe ser proporcional al cambio de área expuesto entre N y U, y confirma que en verdad, los estados intermedios en la variante S265C ES-βL están ausentes o severamente desestabilizados respecto a N y a U. Existen antecedentes de un resultado como este: el trabajo de Sideraki sobre la β-lactamasa

TEM1 de *E. coli* en el que se describe una mutación puntual natural que *in vivo e in vitro* modifica la estabilización de estados parcialmente plegados y la tendencia a la agregación sin alterar la estabilidad de la estructura final [66].

La doble mutante S126C/S265C ES-βL se comporta de acuerdo a lo esperado si el efecto de las mutaciones fuera aditivo o hubiera una ligera potenciación. Por una parte se desestabilizan los intermediarios (efecto de la mutación S265C), y por otra la diferencia entre N y U se hace energéticamente más pequeña (compárese los ΔG totales en Tabla 5). Esto último puede deberse a la inestabilización de N o a la estabilización de U. No pudiéndose distinguir con los datos actuales, cuál de estas dos posibilidades es la más probable. Parece extraño hablar de la estabilización de U, un estado en el que teóricamente no habría interacciones específicas, sin embargo la definición experimental de U es muy diferente de la teórica (ver Capítulos I y V).

Teniendo en cuenta los equilibrios observados para la proteína natural y las mutantes S→C se puede concluir que en los estados parcialmente plegados de ES-βL el residuo 265 establece interacciones específicas, presumiblemente mediadas por un puente de hidrógeno. Estas interacciones desaparecen en la mutante S265C, presumiblemente por debilitamiento de dicho puente de hidrógeno. La observación del modelo 3D de la ES-βL indica que el puente de hidrógeno antedicho, en el estado nativo, depende de un contacto de largo alcance, es decir de la presencia de estructura terciaria. Se puede especular sobre la posibilidad de formación de un puente de hidrógeno no nativo en los estados parcialmente plegados de ES-βL. No obstante el principio de parsimonia recomienda pensar que lo que se observa en los estados parcialmente plegados de ES-βL es la persistencia de estructura nativa alrededor de la serina 265. En el mismo sentido, existen otros ejemplos en la

literatura, los resultado de RMN en el caso la nucleasa de *S. aureus* [119] indican que a concentraciones tan altas de desnaturalizante como urea 8 M el estado desplegado posee elementos con estructura y topología nativa. Para la barnasa se ha detectado en el estado desplegado por métodos computacionales y por RMN estructura secundaria e interacciones terciarias fluctuantes [4].

Los datos de modificación química de las cisteínas sirven para explorar más profundamente el grado de preservación de estructura terciaria en los estados parcialmente plegados de ES-βL. La reactividad de un tiol proteico frente a un reactivo como el DTNB depende principalmente de la accesibilidad al solvente. En forma secundaria participan otros factores como las carga del entorno y su hidrofobicidad.

En el caso de S126C ES-βL, resulta muy claro de la inspección de la Figura 28 que la cisteína permanece parcialmente oculta en $H_{\text{urea } 3-5}$ y que se expone completamente antes de que ocurra la última transición, $H_{\text{urea } 6-7} \rightarrow U$. Estrictamente, pues, el modelo de desplegado de esta variante debe ser ampliado para incluir un nuevo intermediario: $N \leftrightarrow I_{\text{urea } 2-4} \leftrightarrow H_{\text{urea } 3-5} \leftrightarrow H_{\text{SH}} \leftrightarrow H_{\text{urea } 6-7} \leftrightarrow U$. Siendo H_{SH} un intermediario con alto contenido de estructura secundaria, en el cual el residuo 126 se encuentra expuesto. En este caso resulta que el residuo 126 recién se expone cuando los triptofanos están parcialmente solvatados, precediendo ligeramente a la formación de $H_{\text{urea } 6-7}$. Para ES-βL S265C, el tiol se hace accesible concomitantemente a la exposición de los triptofanos (Figura 28), en total acuerdo con la propuesta esbozada más arriba de la desestabilización de los estados parcialmente plegados. Por último, la modificación química de la doble mutante prueba nuevamente la desestabilización de los estados parcialmente plegados por la mutación S265C. Como era de esperar, los dos residuos de cisteína son accesibles aquí en forma

coincidente con la curva de fluorescencia. Indicando que el único intermediario observable en esta variante es H₂ (H_{urea 6-7} en la variante salvaje), pero que en este estado ambos tioles son accesibles.

Resumiendo los estudios de equilibrio y modificación química se puede concluir que los intermediarios tempranos de plegado de ES-βL identificados en este trabajo conservan cierto grado de estructuración, presumiblemente nativa, alrededor de los residuos 126 y 265. Los resultados no permiten una elaboración más fina: no se puede determinar cuál de estas dos estructuras residuales es más resistente a la desnaturalización. Sin embargo sí es posible descartar el modelo simple de desplegado por dominios: A-B→U-B→U-U. La no aplicabilidad de este modelo surge de la existencia de por lo menos seis estados en el desplegado de la β-lactamasa, el modelo de desplegado por dominios incluye sólo tres. Cuando se pensaron estos experimentos se supuso que el modelo de desplegado por dominios originaría una curva bifásica para la accesibilidad de los tioles de la doble mutante. Esto no fue así, sin embargo la desestabilización de los intermediarios causada por la mutación S265C impide usar la inexistencia de una curva bifásica como argumento en contra del desplegado por dominios. Por lo tanto, nuestra única evidencia contra este último modelo descansa por el momento en la existencia de por lo menos cuatro estados parcialmente plegados.

Topología y estados parcialmente plegados

La relación entre complejidad topológica, plegado, y superficies energéticas de la estructura proteica es indudable. Los parámetros que describen la topología (por ejemplo el orden de contacto) se correlacionan muy bien con la velocidad de plegado [41, 120, 121]. Las estructuras proteicas no secuenciales (con dominios no continuos, como la ES-βL), más

intrincadas que las que poseen dominios continuos tendrían más ‘inconvenientes’, por lo menos desde un punto de vista entrópico, durante el proceso de plegado (por ejemplo por estabilización de estados no nativos parcialmente plegados, ‘cuasi-topómeros’, ver Capítulo I y trampas cinéticas), por lo que contarían, seguramente, con embudos de plegado más rugosos (ver Figura 31) [108]. Por último, la posibilidad de modificar la superficie del embudo de plegado sin modificar la topología final de la estructura proteica podría tener relevancia desde un punto de vista biotecnológico. La predicción de las interacciones que se deben remover o reforzar para modular el plegado, posibilitaría simplificar sustancialmente el estudio básico del plegado y realizar ‘ingeniería racional de proteínas’ para impedir, por ejemplo, la agregación en procesos industriales de producción.

Predicción de módulos estables e interacciones

A lo largo de los últimos años se han desarrollado distintos tipos de algoritmos de búsqueda de módulos, un ejemplo muy interesante es el desarrollado por Nussinov y col., *Anatomy*, [61, 62] que se describió en Modelos de Plegado, Capítulo I. Este algoritmo se basa en la búsqueda de unidades estables con ciertas propiedades de hidrofobicidad, ‘aislabilidad’ y grado de compactación. La aplicación del algoritmo a ES- β L se muestra esquemáticamente en la Figura 32. Otro ejemplo es el algoritmo de búsqueda de unidades de plegado autónomo, *RAFT*, desarrollado por S. Marqusee y col. [55]. En este caso, el resultado está fundamentado en la hipótesis de que un segmento, con predominio de contenido de interacciones entre sus propios átomos y bajo contenido de interacciones con otros fragmentos, podría tener plegado autónomo y estable en forma aislada. En otras palabras, *RAFT* cuantifica la independencia estructural de cada fragmento, comparándolo con una biblioteca de fragmentos de longitud idéntica. El resultado de aplicar el algoritmo *RAFT*

sobre, la β -lactamasa de *S. aureus* (ver 3blm y 1alq en el PDB) se muestra en la Figura 33. La estructura residual presente en el estado H descrito en este capítulo podría corresponderse con esta unidad de plegado. Futuros experimentos de NMR podrían contribuir a identificar las regiones estructuradas, las interacciones más importantes en estos estados conformacionales y tal vez los determinantes de la topología general de la molécula.

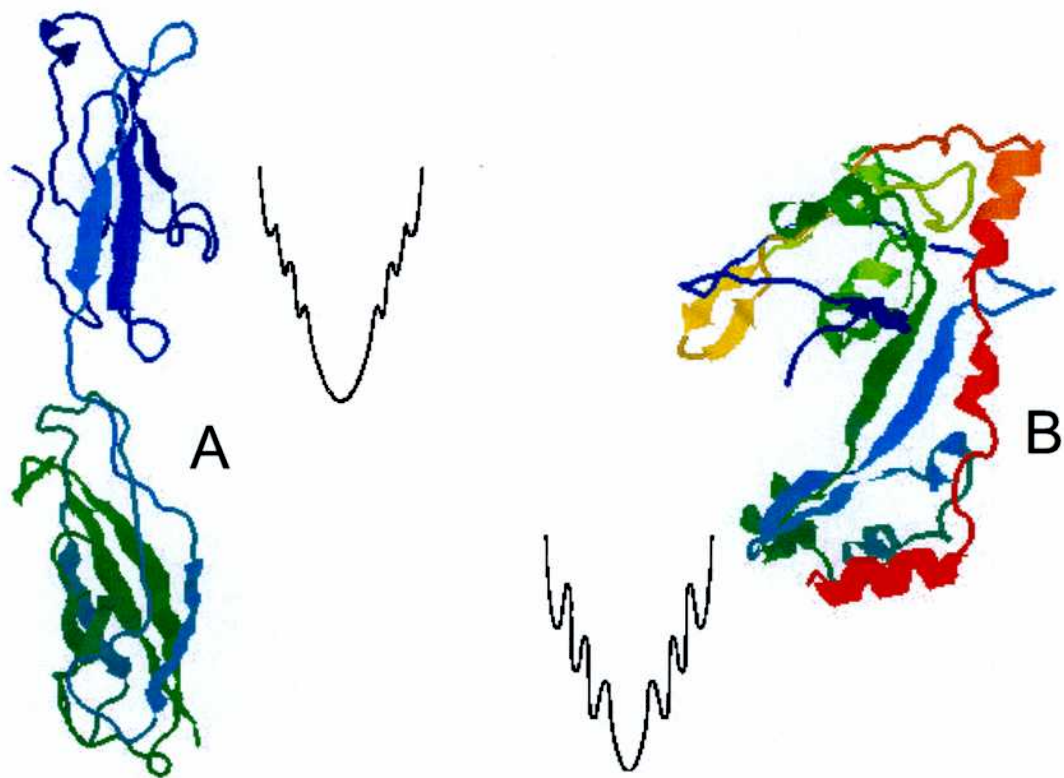


Figura 31. Hipótesis de Chun-Jung Tsai sobre la relación entre complejidad topológica y la superficie de los embudos conformacionales, basada en consideraciones entrópicas [108]. (A) una proteína con 'dominios continuos' (secuenciales), (B) una proteína con dominios discontinuos (no secuenciales), esta última contaría con un embudo conformacional más rugoso, con trampas más profundas y una cinética de plegamiento más compleja.

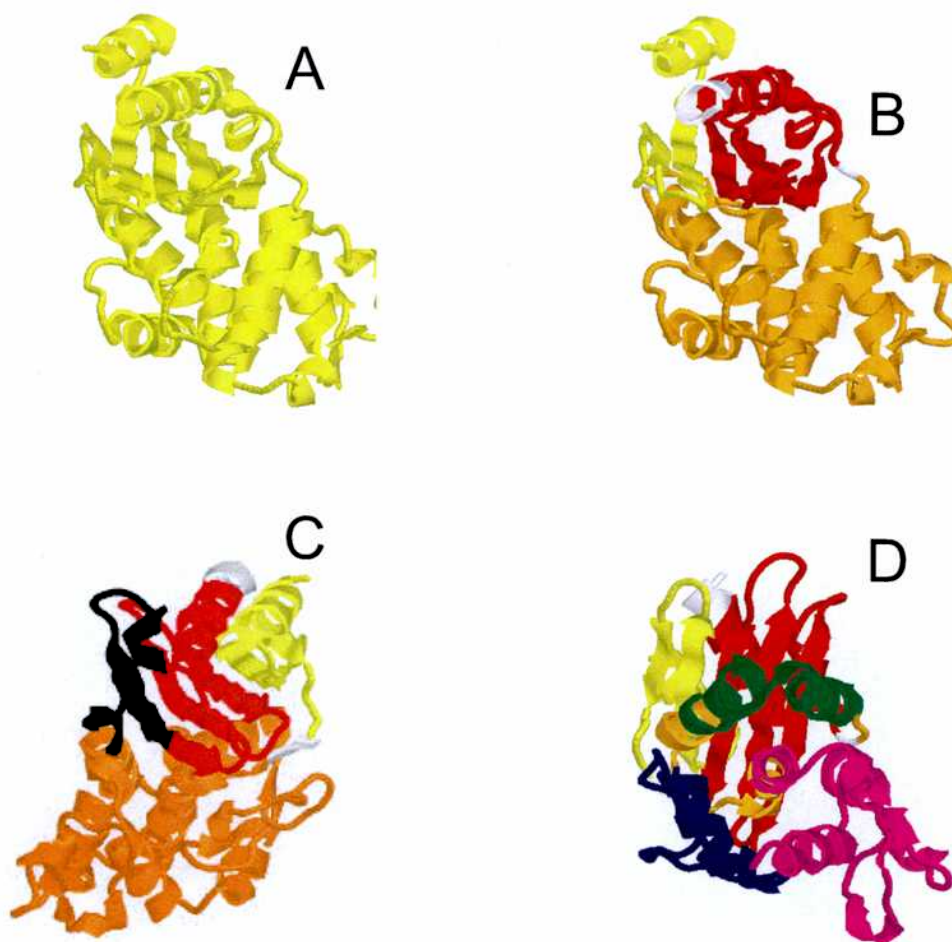
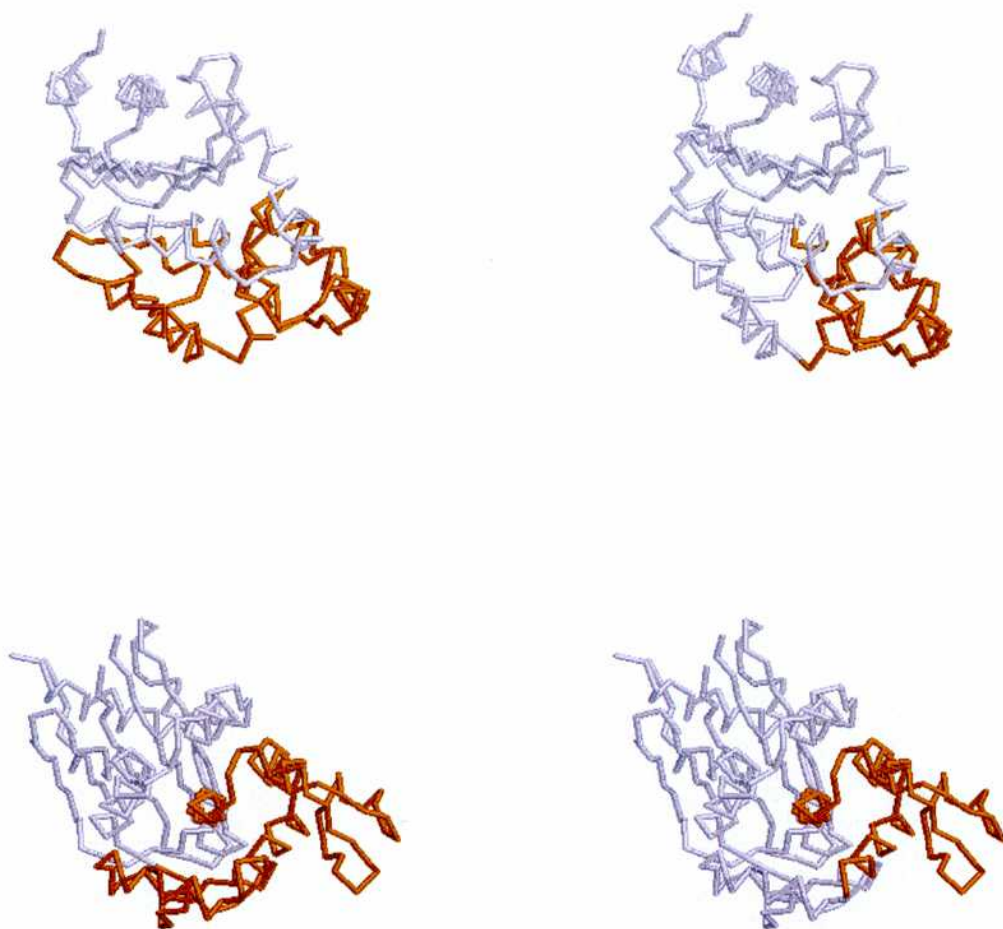


Figura 32 Bloques de plegado obtenidos mediante la implementación del algoritmo desarrollado por Tsai y colaboradores [61]. De acuerdo con el modelo de plegado en bloques la conformación nativa es el resultado del ensamblado por combinación de un conjunto de fragmentos contiguos (para más detalles ver en el Capítulo I, Modelos de plegamiento). (A) Primer nivel, se trata de la proteína nativa; (B) La primer división genera dos unidades hidrofóbicas de plegado. Una primer unidad compuesta por los residuos 1-33 (amarillo) y 184-252 (rojo), y una segunda unidad más estable compuesta por los residuos 36-182 (naranja); (C) La región C-terminal rinde en una nueva etapa dos bloques 178-202 (negro) y 203-252 (rojo), ambos inestables. (D) La unidad 36-182 puede dividirse en tres bloques, 45-111 (magenta), 111-148 (azul) y 155-180 (verde) de los que el más estable es 45-111 (magenta). Por razones de claridad no se muestra el último nivel de corte sobre esta última unidad.



RAFT Score: 21.67

Figura 33 Resultado de la implementación del algoritmo RAFT sobre la β -lactamasa circularmente permutada de *S. aureus* (homóloga estructural de ES- β L) [45]. El panel de la izquierda muestra la unidad de plegado autónoma de máxima longitud y mayor RAFT score. El panel de la derecha una unidad menor que posee 70 residuos (residuos color naranja) con un RAFT score de 21.67 que también predice un fragmento estable en forma aislada.

CAPÍTULO IV

ESTUDIO DEL CÓDIGO DE PLEGADO PROTEICO

INTRODUCCIÓN

Conceptos generales y estrategia

Desde un punto de vista estático, la conformación proteica muestra niveles jerárquicos: la *estructura secundaria*, o periodicidad local de la cadena polipeptídica (hélices- α y cordones β); los *motivos de plegado* o arreglos topológicos de elementos de estructura secundaria; y la estructura terciaria que está definida por el conjunto de interacciones fijas resultantes de la asociación entre estos motivos o bloques.

Desde el punto de vista dinámico, para comprender el mecanismo de plegado, es importante agregar dos niveles jerárquicos intermedios más: Las 'unidades autónomas de plegado' y el 'topómero'.

Las unidades autónomas de plegado son, por definición, subestructuras o módulos que tienen capacidad de plegarse en ausencia del resto de la proteína. Son más pequeñas que lo que normalmente se considera como un dominio proteico y están estabilizadas por interacciones locales.

El concepto de topómero fue creado para definir el recorrido espacial de la cadena polipeptídica con prescindencia del empaquetamiento terciario de las cadenas laterales [122]. Así una proteína puede adquirir una conformación aproximadamente nativa sólo a nivel de la cadena principal, el topómero nativo, antes de que se fijen en el espacio las interacciones terciarias de las cadenas laterales, y aún antes de que se establezcan los puentes de hidrógeno de la estructura secundaria. Este concepto tiene gran valor teórico y sirve como explicación de un buen número de resultados experimentales [120, 122].

En principio, para estudiar la interdependencia de los niveles jerárquicos de estructura en el proceso de plegado se puede manipular la secuencia de la proteína utilizada. Es decir, se puede eliminar información que codifique para alguno de los niveles jerárquicos, deteniendo la reacción de plegado en los distintos niveles de complejidad estructural. En este contexto resulta fundamental averiguar el grado de 'degeneramiento' de cada nivel de estructura: ¿cuál es la correspondencia entre secuencia y estructura para cada nivel? Un ejemplo permite aclarar mejor esto. Si bien muchas secuencias permiten la formación de hélices, la correspondencia entre la estructura terciaria completa es unívoca con respecto a la secuencia. Por otra parte, sería deseable saber cómo está codificada esta información para cada nivel de organización conformacional.

En este trabajo de tesis se adoptó como estrategia experimental la manipulación de la información conformacional mediante la eliminación de residuos. Por razones de factibilidad, las eliminaciones fueron en el extremo de la cadena. La remoción de ciertas interacciones terciarias podría impedir el progreso de la reacción de plegado por lo menos en dos niveles: eventos tempranos de plegado, afectando la formación de unidades autónomas y por consiguiente impidiendo la formación del topómero o, en las etapas finales de la reacción, impidiendo el progreso desde el topómero nativo hacia la estructura terciaria rígida.

Como se señaló en el Capítulo I, ya existen antecedentes de que el acortamiento de la cadena polipeptídica estabiliza conformaciones no nativas. Pero también se conocen secuencias que pueden ser removidas sin alterar la conformación del resto de la cadena polipeptídica. Dado que en la mayor parte de los casos los extremos N y C son superficiales [123], la eliminación de información por acortamiento moderado de la cadena no produce

cavidades internas o impedimentos estéricos que puedan complicar aún más la interpretación de los experimentos. La superficie expuesta como consecuencia del recorte puede ser evaluada usando modelos moleculares. Si la superficie está balanceada en términos de hidrofobicidad, los efectos observados en el proceso de plegado pueden ser adjudicados a la pérdida de los contactos locales y/o terciarios que fueron removidos por la escisión. Ésta parece ser entonces, una excelente herramienta para identificar regiones o unidades de información conformacional cruciales para el plegado [86, 121, 124, 125].

El objetivo específico de los experimentos descritos en este capítulo fue la evaluación del contenido de información para el plegado de ES- β L codificado por la hélice α C-terminal.

Las interacciones de la hélice α 11

El dominio $\alpha + \beta$ de ES- β L (Figura 34) está compuesto por los extremos terminales N y C de la cadena polipeptídica (las hélices α 1 y α 11), y la hélice 10. Estas hélices superficiales tienen sus caras hidrofóbicas en contacto entre sí, y con la superficie hidrofóbica formada por una lamina β de cinco cordones (que a su vez está formada por piezas de la secuencias N y C terminales). La lámina y las hélices α 1 y α 10 forman una especie de contenedor, donde los costados y el piso de la hélice 11 (formada por los residuos 276-295) quedan protegidos del solvente. Los primeros cinco residuos (31-35) y los últimos cuatro (292-295), están desordenados en la estructura de difracción determinada por rayos-X [126]. De acuerdo al programa AGADIR (programa que calcula la propensión de un péptido a formar estructura α helicoidal en solución [127, 128]) la hélice α 11 es inestable y presumiblemente se pliega sólo mediante la interacción con las hélices que la flanquean y con la lámina β subyacente.

Para estudiar el papel de la hélice $\alpha 11$ se diseñaron, prepararon y caracterizaron tres variantes de ES- β L recortadas en nueve, catorce y diecinueve residuos desde el C-terminal: ES- β L^{CA9}, ES- β L^{CA14} y ES- β L^{CA19}, respectivamente (ver Figura 35).

En el caso de ES- β L^{CA19} la remoción de la hélice $\alpha 11$ completa produce un incremento del área apolar local del 33 % (ver Tabla 7), incremento que podría desestabilizar a la molécula de manera significativa. Se genera además una gran cavidad en la superficie molecular. Es de suponer, en este caso, que el dominio podría reorganizarse conduciendo a un plegado, erróneo.

En el caso de ES- β L^{CA14} se eliminan 10 de los 16 residuos de la hélice $\alpha 11$ y los últimos cuatro residuos desordenados de la cadena polipeptídica. La inspección del modelo molecular revela que el área no polar local expuesta se incrementa en un 21 %. La interacción del péptido removido con el cuerpo de la enzima está mediada por 86 contactos de van der Waals (2.5-4.5 Å). No hay ni puentes de hidrogeno ni puentes salinos estabilizando la interacción. La mayor parte de los contactos de van der Waals son C-C (72 %) y del tipo de largo alcance, y se los puede agrupar en tres grupos de distancias centradas en 30, 65, y 250 residuos. Todos estos datos indican que los residuos removidos en ES- β L^{CA14} están firmemente integrados al cuerpo de la enzima.

Por último, la remoción de 5 de los 16 residuos (una vuelta y media de hélice) y los cuatro residuos desordenados rinde ES- β L^{CA9}, con un incremento del área apolar expuesta localmente del 21 %. El péptido removido en ES- β L^{CA9} participa en la mayor parte de las interacciones con la lámina β , pero sólo en una de las interacciones interhelicoidales (Met 287-Trp 229).

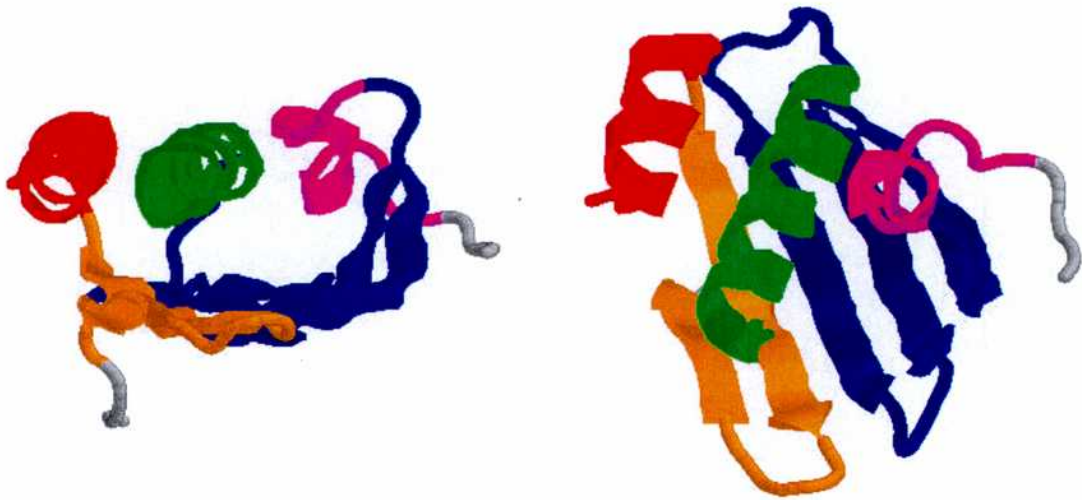


Figura 34. Modelo de cintas del Dominio $\alpha+\beta$ de la β -lactamasa de *B. liceniformis*. Se muestra la hélice $\alpha 1$, residuos 31-41 (rojo), la hélice $\alpha 10$, residuos 216-226, (magenta), hélice $\alpha 11$ residuos 276-296 (verde) y la lámina β formada por dos cordones N terminales, residuos 42-61 (naranja) y tres cordones C-terminales residuos 275-227 (azul).

| | |
|-----------------------|---|
| ES-βL | ...LAVLSSRDKKDAKYDD <u>KLIAEATKVV</u> MKALNMNGK |
| ES-βL ^{CΔ9} | ...LAVLSSRDKKDAKYDDKLIAEATKVV |
| ES-βL ^{CΔ14} | ...LAVLSSRDKKDAKYDDKLIAE |
| ES-βL ^{CΔ19} | ...LAVLSSRDKKDAKYDD |

Figura 35. La variante ES-βL y sus tres variantes recortadas desde el C-terminal de manera incremental, en nueve, catorce y diecinueve, respectivamente. La hélice α11 (C-terminal) abarca los residuos subrayados, y los últimos cuatro residuos de la cadena están desordenados en la estructura cristalográfica.

Tabla 7. Análisis del cambio hipotético de área accesible al solvente (ASA) en las variantes acortadas de ES-βL.

| Variante | Cambio en la superficie expuesta ^a (%) |
|-----------------------|---|
| ES-βL ^{CΔ9} | +21 |
| ES-βL ^{CΔ14} | +21 |
| ES-βL ^{CΔ19} | +33 |

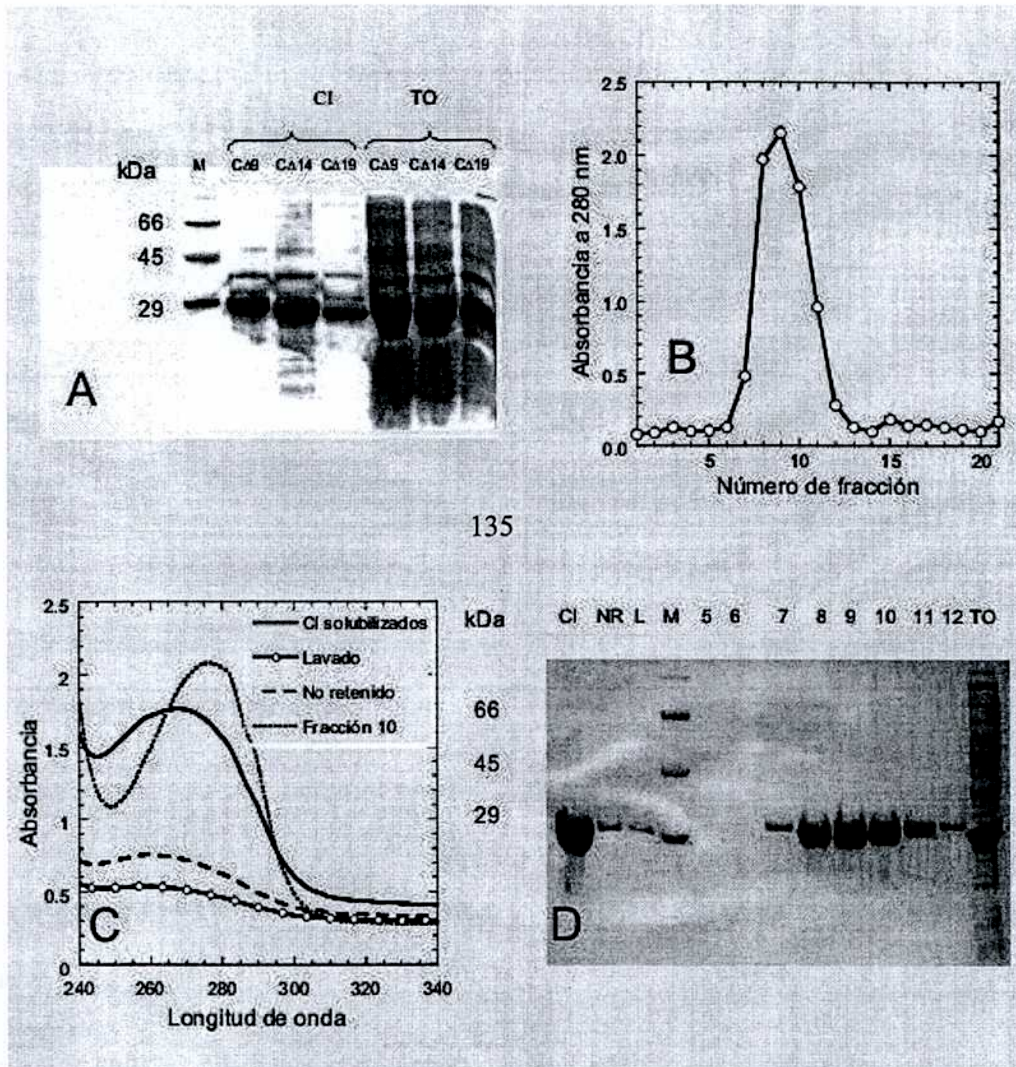
^a Los cálculos fueron realizados con el programa ACCESS y el archivo 4BLM del PDB. Los porcentajes son respecto del área expuesta por el péptido removido en la estructura de la proteína de longitud completa. El cambio en el área apolar expuesta por la remoción se calculó como: $100 \times [S_{ap} \text{ES-}\beta\text{L}^{C\Delta n} - (S_{ap} \text{ES-}\beta\text{L} - S_{ap} C\Delta n)] / S_{ap} C\Delta n$, donde $S_{ap} \text{ES-}\beta\text{L}$ es el área apolar total de ES-βL, $S_{ap} \text{ES-}\beta\text{L}^{C\Delta n}$ es el área apolar total de la variante acortada en n residuos, y $S_{ap} C\Delta n$ es el área apolar total expuesta en el estado nativo por el péptido removido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Expresión, purificación y replegado preliminar

El nivel de expresión de las variantes ES- β L^{CA9}, ES- β L^{CA14} y ES- β L^{CA19} fue cercano a 80 mg por litro de cultivo. Los lisados de *E. coli* (BL21) sin transformar y los lisados de bacterias expresando ES- β L^{CA19} no presentaron actividad β -lactamasa. Por el contrario, dicha actividad sí fue detectada en lisados conteniendo ES- β L^{CA9} o ES- β L^{CA14}, demostrando de manera preliminar que, en estos dos últimos casos, una fracción de las moléculas, puede adquirir estructura nativa. Para las tres variantes acortadas, la mayor parte de la proteína producida aparece en cuerpos de inclusión, agregados insolubles que se acumulan en el citoplasma (ver Figura 36A). Esta es la primer prueba experimental de que, *in vivo*, los residuos eliminados juegan un papel importante en el proceso de plegado.

Con el objetivo de purificar las proteínas para analizar su comportamiento *in vitro*, los cuerpos de inclusión de las variantes se disolvieron en urea concentrada (6.5 M) y luego de una cromatografía de intercambio iónico se obtuvieron una pureza cercana al 98 % y un rendimiento del 80-90 %. En la Figura 36 se muestra, como ejemplo, el resultado del proceso de purificación de ES- β L^{CA9}. Las fracciones del intercambio iónico (ver Materiales y Métodos) fueron analizadas por espectroscopia UV (Figuras 36B y 36C) y por SDS-PAGE (Figura 36D). Este paso de purificación permitió no sólo eliminar otras proteínas presentes en los cuerpos de inclusión, sino también, trazas de ácidos nucleicos contaminantes. A pH 3.5, el DNA y el RNA no se retienen en la columna (*SP-sepharose*),



135

Figura 36. Expresión y purificación de variantes acortadas. (A) Fracciones totales (TO) después de la lisis de las bacterias. Después de una serie de extracciones (ver Materiales y Métodos) se obtienen los cuerpos de inclusión (CI). (B) Cada variante se purificó en su forma desplegada (urea 6.5 M). Se muestra una purificación de ES- β L^{CA9}. Absorción a 280 nm de las fracciones de intercambio iónico. (C) Espectros de absorción UV de muestras recolectadas durante el proceso de purificación. (D) Análisis por SDS-PAGE de la purificación. CI, cuerpos de inclusión; NR, no retenido; L, lavado; 5 -12, fracciones; TO, total (lisis de las bacterias inducidas).

mientras que la proteína de interés sí lo hace (el punto isoeléctrico teórico de las variantes va desde 5.15 a 4.91).

La identidad y la estructura covalente de las proteínas purificadas, fue corroborada por espectrometría de masa. Las masas de ES-βL, ES-βL^{CA9}, ES-βL^{CA14}, ES-βL^{CA19} fueron 29,373.9±1.1, 28,383.8±1.7, 27,887.9±0.7, y 27,333.1±1.7 dalton, respectivamente. Estos valores difieren en no más de dos dalton con respecto a los valores calculados a partir de la secuencia. Un segundo componente en los espectros de masa (30 a un 50 %), correspondió a la masa molecular esperada más 131.2 Da. Este resultado indica que la remoción de la metionina iniciadora de la traducción de las tres variantes acortadas fue incompleta.

De manera preliminar, se probó el replegado de las variantes desnaturalizadas (urea 6.5 M) por diálisis (16 h, 4 °C) contra buffers fosfato de sodio. A juzgar por la actividad específica y por la masa de proteína soluble (SDS-PAGE) obtenidas, tanto la concentración inicial de proteína, como la temperatura fueron variables a considerar. Para poder comparar a ES-βL con el resto de las variantes, todas fueron sometidas a las mismas condiciones óptimas de replegado, las actividades específicas relativas obtenidas fueron 100, 10, y 0.1 % para ES-βL, ES-βL^{CA9}, y ES-βL^{CA14} respectivamente. El replegado de ES-βL^{CA19} no rindió actividad enzimática.

También se ensayó el replegado de las variantes acortadas por dilución (20-100 veces) en buffer fosfato de sodio a 20 °C. La variante ES-βL^{CA9}, triplicó la actividad específica obtenida por diálisis, llegando a un máximo (~30 % de la actividad de ES-βL) en aproximadamente 24 h. A 4 °C el replegado fue extremadamente lento (después de 24 h la reacción progresó linealmente un ~2 %). Por el contrario la variante ES-βL^{CA14} no mostró un incremento del rendimiento de replegado con respecto al observado por diálisis y por

último, en la solución de replegado de ES- β L^{CA19} no se detectó actividad enzimática β -lactamasa.

Propiedades hidrodinámicas y resistencia a la tripsinólisis

La baja actividad enzimática específica, con respecto a ES- β L, observada después del replegado de ES- β L^{CA9} podría indicar que coexisten moléculas activas e inactivas, o que se trata de una población homogénea con una alteración menor en la estructura del sitio activo. Para poder distinguir entre estas dos posibilidades, la mezcla de replegado obtenida mediante diálisis (4 °C por 16 h) de cada variante acortada fue analizada por SEC (Figura 37 y Tabla 8). A diferencia de ES- β L (Figura 13, capítulo III), ES- β L^{CA9} eluyó en varias fracciones correspondientes a monómero, dímero y agregados de mayor grado. Las variantes ES- β L^{CA14} y ES- β L^{CA19} se comportaron de manera similar a ES- β L^{CA9}, pero en estos casos, la fracción monomérica fue indetectable. Las fracciones diméricas y los agregados carecieron de actividad enzimática y la proporción de ambas especies fue muy variable entre experimentos. Por el contrario, las actividades enzimáticas específicas de ES- β L y de la fracción monomérica de ES- β L^{CA9} fueron similares.

Una de las características sobresalientes de la forma nativa de ES- β L es su resistencia a la proteólisis enzimática (ver Figura 38A). Por lo tanto, las mezclas de replegado de las variantes acortadas se sometieron a tripsinólisis controlada para estudiar la flexibilidad de la cadena polipeptídica y la integridad estructural de la proteína replegada. Tanto ES- β L^{CA14} como ES- β L^{CA19} fueron degradadas inmediatamente (primeros 5 min de reacción). La variante ES- β L^{CA9} también fue mayoritaria degradada; no obstante, una fracción (8 %)

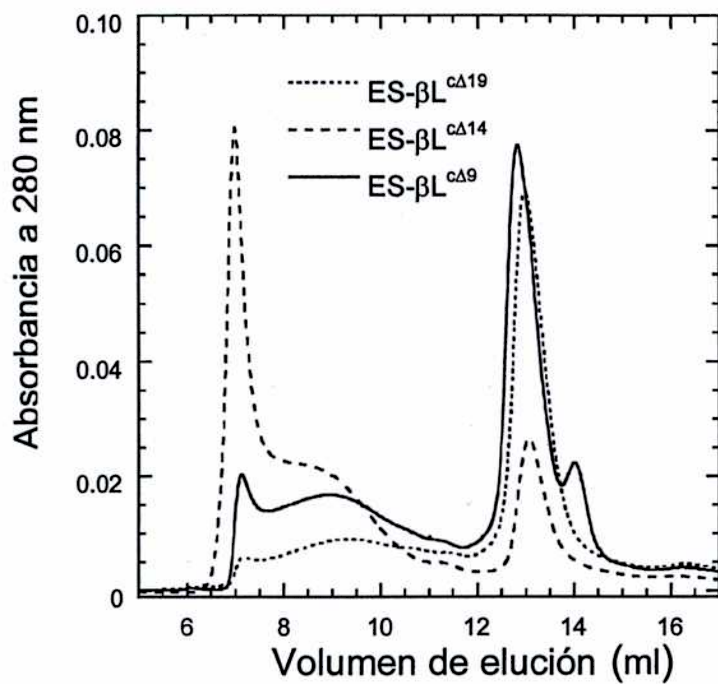


Figura 37. Análisis por SEC-FPLC de las variantes ES-βL^{Δn} después de ser replegadas por diálisis a 4 °C por 16 h. Se usó una columna Superosa 12 a un flujo de 0.5 ml/min equilibrada a 20 °C con buffer fosfato de sodio 100 mM, pH 7.0.

Tabla 8. Propiedades hidrodinámicas de las variantes acortadas de β -lactamasa^a

| Variante | Monómero | Dímero |
|---|-----------------------|------------------------------------|
| ES- β L ^{CΔ9} nativa | 25.4 \pm 0.6 (24.5) | nd ^b |
| I _p ES- β L ^{CΔ9} | nd | 31.2 \pm 0.6 (31.7) |
| ES- β L ^{CΔ14} | nd | 30.7 \pm 0.5 (31.5) |
| ES- β L ^{CΔ19} | nd | 31.1 \pm 0.7 (31.3) |
| ES- β L | 25.3 \pm 0.7 (24.9) | 33.0 \pm 0.5 (32.0) ^c |

^aLos R_s fueron determinados por SEC-FPLC (ver texto y Fig. 37). Las unidades son angstroms. En paréntesis se muestran los valores calculados asumiendo una forma esférica [34]. ^bNo determinado. ^ctrazas.

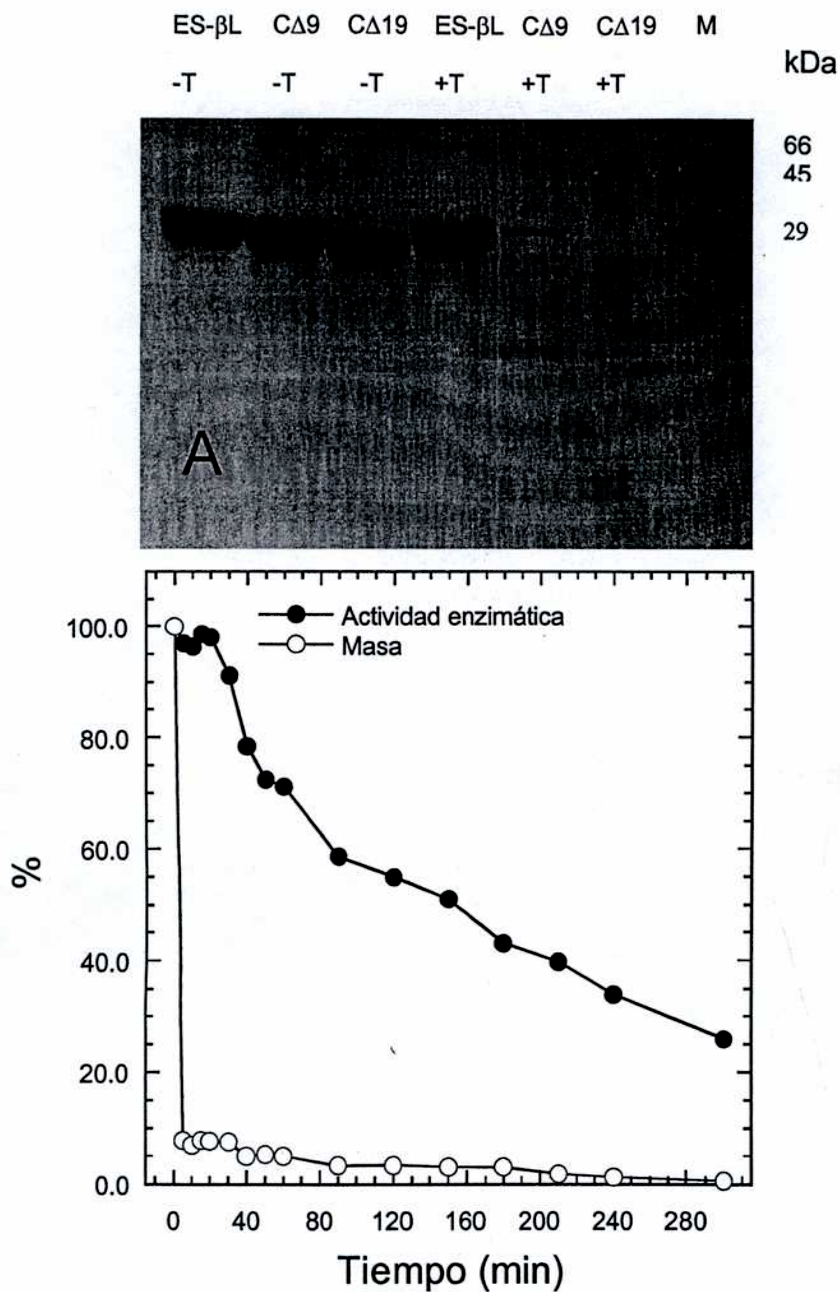


Figura 38. Resistencia a la proteólisis enzimática (250:1, proteína:tripsina) de las variantes acortadas. (A) Las variantes ES-βL^{CΔ14} y ES-βL^{CΔ19} son completamente degradadas en minutos (la variante ES-βL^{CΔ14}, que no se muestra, se comporta de manera idéntica a ES-βL^{CΔ19}). En cambio una fracción de ES-βL^{CΔ9} resiste el tratamiento. -T, incubación sin tripsina; +T, con tripsina. ES-βL permanece inalterable por a juzgar por SDS-PAGE después de 16 hs de tripsinólisis. (B) La resistencia a la tripsinólisis de ES-βL^{CΔ9} fue seguida por actividad enzimática y SDS-PAGE. Durante los primeros 20 min de proteólisis la actividad enzimática permaneció constante, sin embargo la fracción de moléculas resistente es sólo un 8 % del total.

fue resistente (ver Figura 38). La resistencia a la tripsinólisis de ES- β L^{CA9} sugiere su correcto plegado. De acuerdo con estos resultados en este trabajo se referirá a esta fracción como ES- β L^{CA9} nativa.

Estudio de los estados conformacionales alternativos de ES- β L^{CA9}

Aislamiento

Para estudiar detalladamente las características fisicoquímicas de la forma ES- β L^{CA9} nativa y de sus estados parcialmente plegados se generaron dos protocolos de purificación.

En el primero, las especies parcialmente plegadas fueron selectivamente degradadas con tripsina y la ES- β L^{CA9} nativa fue aislada por cromatografía de intercambio iónico (Figura 39A). La purificación fue seguida por actividad enzimática y SDS-PAGE. ES- β L^{CA9} nativa se obtuvo con una pureza ≥ 98 % por esta vía y la masa del producto activo fue corroborada por espectrometría indicando que ES- β L^{CA9} nativa no sufrió ningún tipo de modificación en su estructura covalente después de este tratamiento. También fueron verificadas sus dimensiones hidrodinámicas (SEC-FPLC Figura 39A, inserto) y los parámetros catalíticos. ES- β L^{CA9} nativa posee una actividad específica del 76 ± 5 % respecto a ES- β L. La K_M ES- β L^{CA9} es 0.16 ± 0.03 mM (para ES- β L la $K_M = 0.18 \pm 0.05$ mM). Estos valores indican que ES- β L^{CA9} nativa posee un sitio activo correctamente estructurado, similar al de la proteína natural.

Con el segundo protocolo, la fracción de ES- β L^{CA9} nativa fue purificada de los agregados por SEC preparativa a 4 °C (Figura 39B). Este procedimiento además permitió el aislamiento de la fracción 'dimérica', y de los agregados observados previamente por

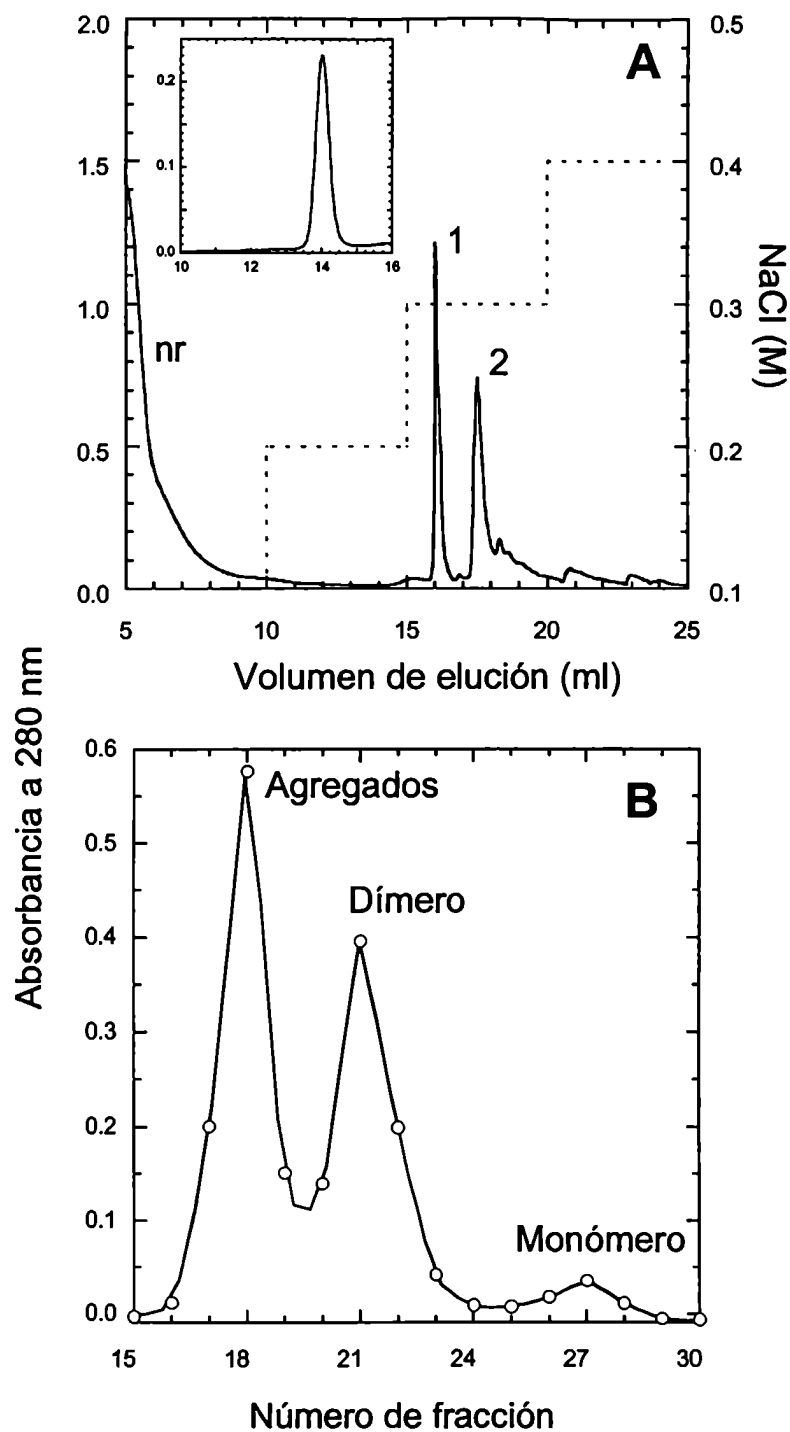


Figura 39. Aislamiento de los distintos estados conformacionales de ES- β L^{CΔ9}. (A) Purificación de la fracción nativa por proteólisis-intercambio iónico. En el inserto se muestra el análisis del pico 1 por SEC, con el correcto tamaño de ES- β L^{CΔ9} monomérica; nr, no retenido, 1 es la fracción enzimáticamente activa, 2 un fragmento inactivo. (B) El aislamiento de una fracción dimerica parcialmente plegada fue realizado por cromatografía de exclusión molecular preparativa en la que se sembró el producto de replegado por diálisis a 4 °C, 16 h. Este procedimiento permitió también separar la fracción nativa y agregados de alto peso molecular. El dímero así obtenido fue estable a 4 °C por lo menos por 48 h.

FPLC-SEC analítico. La fracción dimérica será denominada en este trabajo I_P ES- β L^{CA9} (I_P de intermediario 'productivo'), ya que como se verá mas adelante, en condiciones adecuadas, se pliega rindiendo ES- β L^{CA9} nativa.

Para corroborar el estado de agregación de I_P ES- β L^{CA9} (su naturaleza dimérica), se efectuaron experimentos de entrecruzamiento químico con glutaraldehído seguido por SDS-PAGE (Figura 40). A juzgar por el análisis de las imágenes digitalizadas de los geles, I_P ES- β L^{CA9} presentó más de un 30 % de dímero estabilizado covalentemente, mientras que en el caso de ES- β L sólo se observaron trazas. Los agregados de ES- β L^{CA9} (Figura 39B) generaron productos de muy alto peso molecular, en correspondencia con los pequeños volúmenes de elución observados en experimentos analíticos de SEC-FPLC (ver Figura 37). Por otro lado, los perfiles de SEC a 4 °C de I_P ES- β L^{CA9} purificado o preparado por dilución (ver más adelante) fueron consistentes con un equilibrio lento, dímero \leftrightarrow monómero, dependiente de la concentración de proteína. El carácter lento del equilibrio se infiere de la habilidad de la cromatografía para resolver las especies presentes (Figura 41). La proporción relativa de cada especie, en función de la concentración total de proteína (entre 1.5 y 28.4 μ M) sugiere un valor de K_D de \sim 5 μ M. A 25 °C se obtuvieron resultados similares, aunque a esta temperatura la conversión entre especies fue más rápida y los picos fueron menos definidos. En ambos casos (4 y 25 °C), ni el monómero ni el dímero contaron con actividad enzimática. El pico correspondiente al monómero fue mucho más ancho que el correspondiente a la forma dimérica sugiriendo que la disociación lleva a un conjunto de estados con una amplia distribución de valores de R_S . El aislamiento exitoso de ambos estados conformacionales de ES- β L^{CA9}, nativo e I_P [dímero \leftrightarrow monómero], posibilitó la caracterización espectroscópica detallada que se describe a continuación.

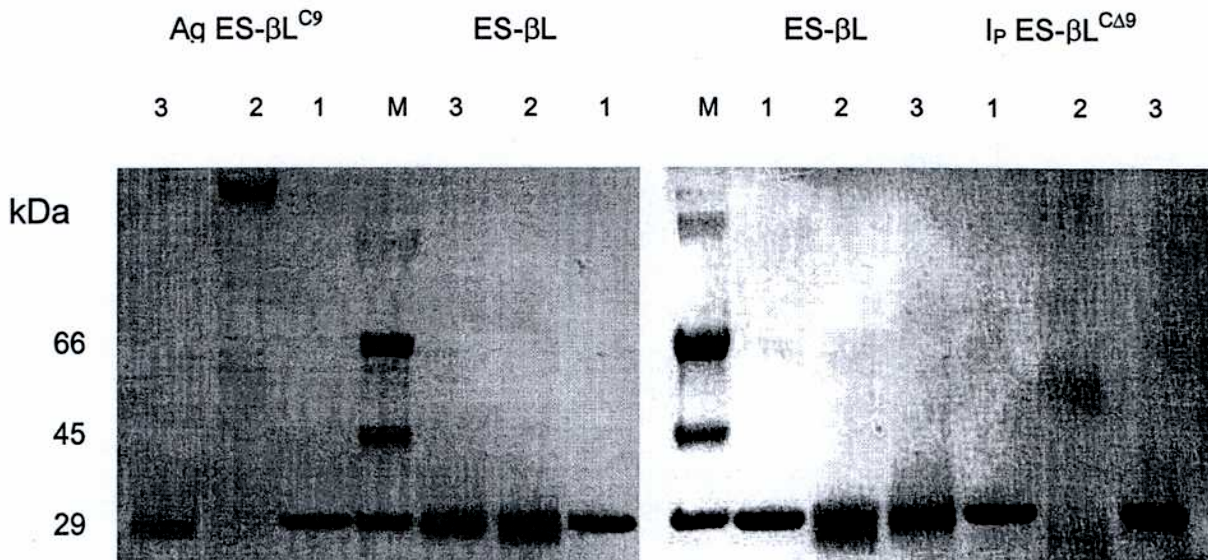


Figura 40. Entrecruzamiento químico con glutaraldehído.

I_p ES- $\beta L^{C\Delta 9}$ y los agregados de ES- $\beta L^{C\Delta 9}$ (Ag ES- $\beta L^{C\Delta 9}$) se obtuvieron por SEC (ver Figura 39). La reacción de entrecruzamiento se detuvo con buffer muestra para el SDS-PAGE (ver Capítulo II). 1. Muestras incubadas en ausencia de glutaraldehído. 2. Muestras incubadas con glutaraldehído. 3. Muestras a las que se les agregó buffer muestra antes de la adición de glutaraldehído. M. Marcadores de peso molecular. Obsérvese que el glutaraldehído estabilizó la forma dímica de I_p ES- $\beta L^{C\Delta 9}$ en una proporción ~30 %.

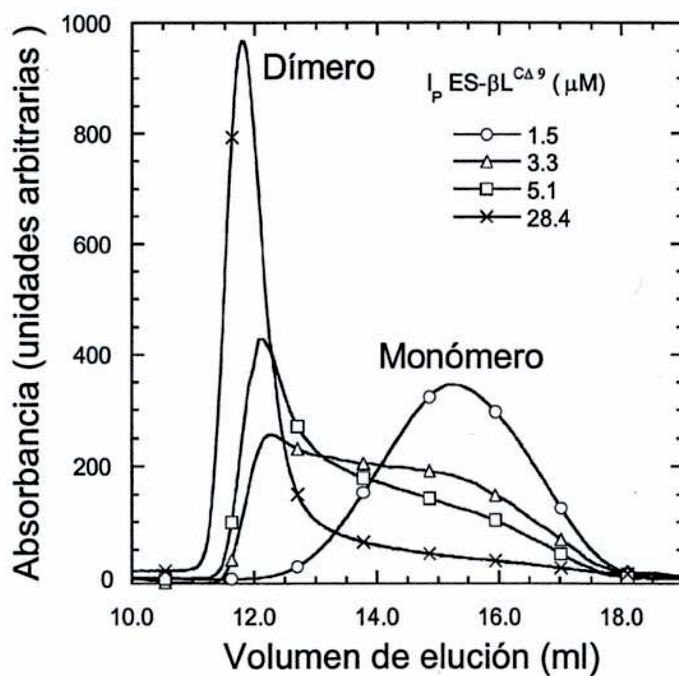


Figura 41. Caracterización del equilibrio dímero-monómero de I_p ES- β L^{CA9} por SEC-FPLC. La columna cromatográfica fue equilibrada a 4 °C. ES- β L^{CA9} desplegada fue diluida a 20 °C en buffer de repliegado y a distintas concentraciones finales de proteína e inmediatamente inyectada.

Espectroscopía de ES-βL^{CA9} nativa e I_p ES-β^{CA9}

Absorción UV

Se aprovechó la sensibilidad de la cuarta derivada (ver Figura 15, Capítulo III) para estudiar los estados conformacionales I_p ES-βL^{CA9} y ES-βL^{CA9} nativa (Figura 42). ES-βL^{CA9} nativa, posee un espectro prácticamente superponible al de ES-βL (Figura 42A). En cambio en I_p ES-βL^{CA9} claramente se pierden las características típicas del estado nativo (banda a 280.7 nm) y la exposición de los residuos aromáticos es menor que la observada para el estado desplegado (Figura 42B, corrimiento parcial de bandas de triptofano y tirosina 291.9→290 nm, 285→282.9 nm, respectivamente hacia el azul). Cuando ES-βL^{CA9} nativa se lleva a 45 °C se evidencia un proceso de desplegado parcial (ausencia de la banda a 280.7 nm, incremento en la exposición al solvente de los residuos de Trp (291.9→291.4 nm)).

Dicroísmo circular

El contenido de estructura secundaria y terciaria de los estados conformacionales de ES-βL^{CA9} se estudió por CD. ES-βL^{CA9} nativa exhibió un espectro de CD-lejano muy similar a ES-βL (Figura 43A). Las diferencias en intensidad fueron muy pequeñas como para cuantificar cambios en el contenido de estructura secundaria. En cambio I_p ES-βL^{CA9} presentó un espectro claramente distinto. Los espectros diferencia entre las distintas variantes y ES-βL (Figura 44) permitieron conjeturar una disminución en el contenido de α-hélice relativo a estructura β para I_p ES-βL^{CA9}. La presencia de mínima estructura secundaria residual en I_p ES-βL^{CA9} se dedujo por comparación con el espectro de ES-βL desplegada térmicamente (80 °C). De acuerdo con los resultados de SEC (ver Figura 41),

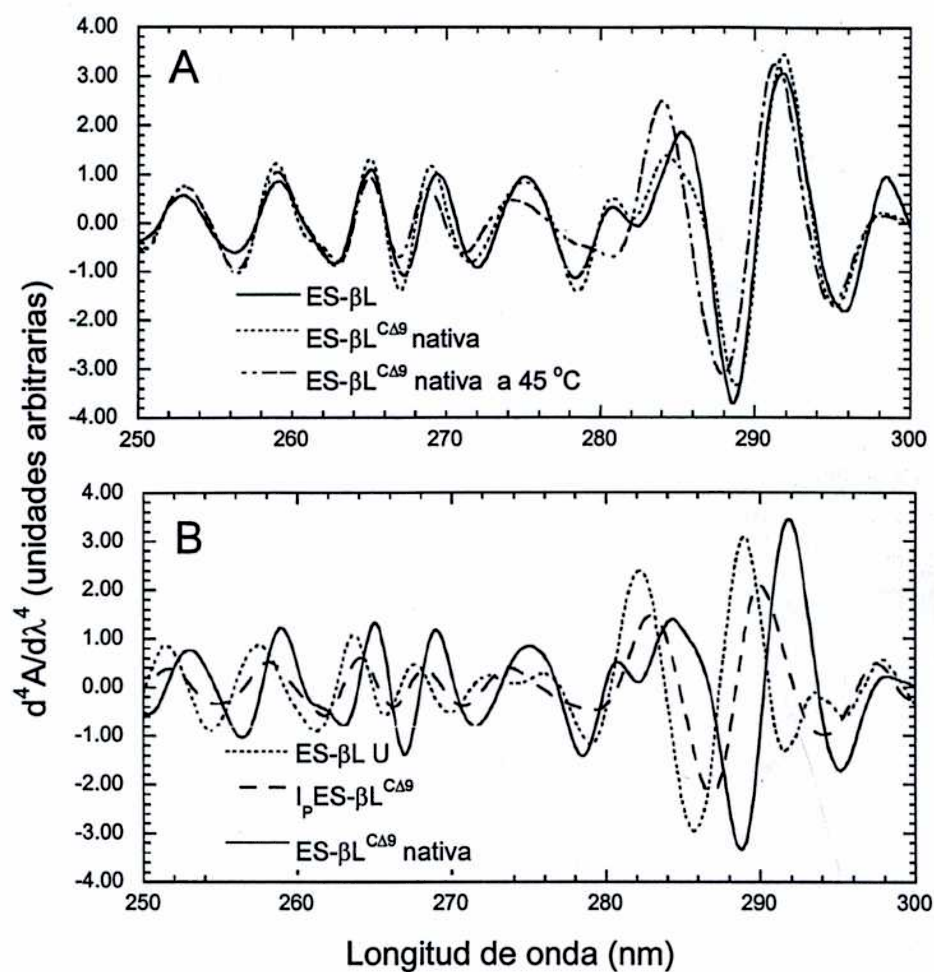


Figura 42. Cuarta derivada de espectros de absorción UV de ES-βL^{CΔ9}. La forma nativa de ES-βL^{CΔ9} fue obtenida por proteólisis-intercambio iónico, I_p ES-βL^{CΔ9}, fue obtenido por SEC preparativa. El estado U (desplegado) de ES-βL fue simulado por combinación de espectros como se describe en Materiales y Métodos. Después del calentamiento a 45 °C la muestra de ES-βL^{CΔ9} no presentó agregados macroscópicos.

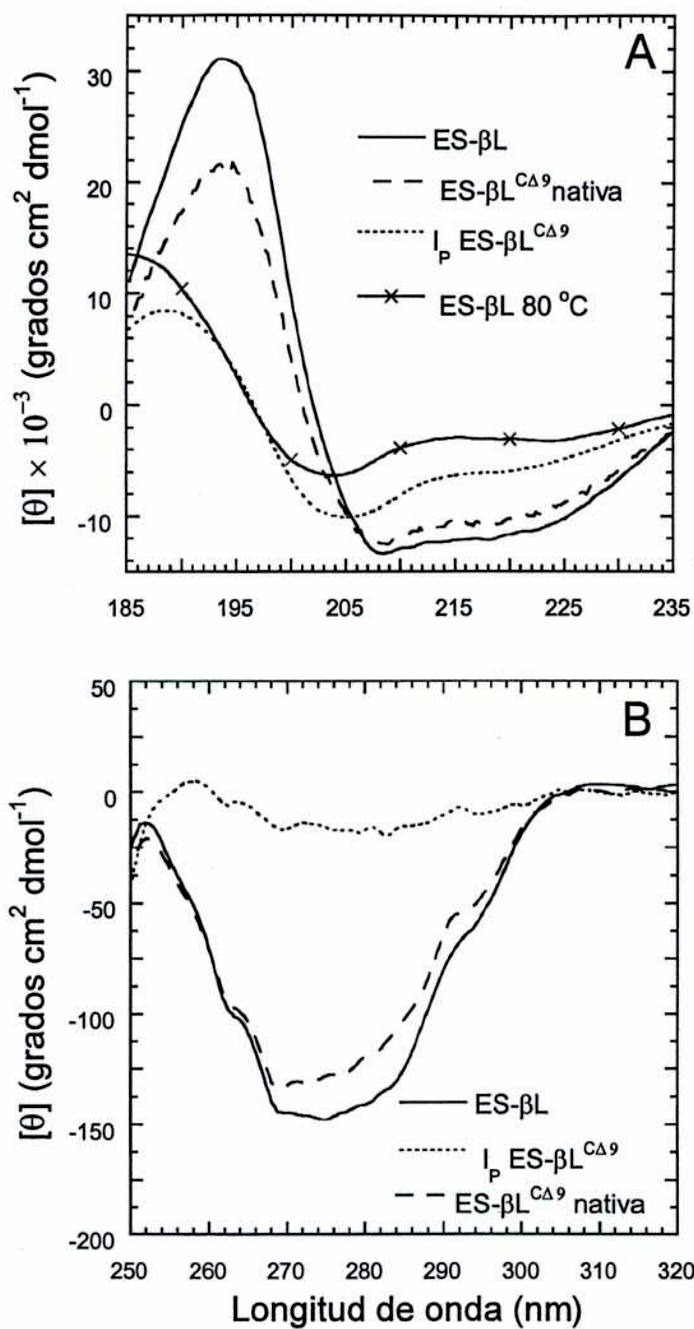


Figura 43. CD de los estados conformacionales de ES-βL^{CA9}. (A) CD en el UV lejano a una concentración de proteína de 1.5 μM y a 20 °C. Como modelo de estado desplegado se utilizó ES-βL a 80 °C, nótese sin embargo que puede observarse estructura residual. (B) CD en el UV cercano. La concentración de proteína fue de 15 μM.

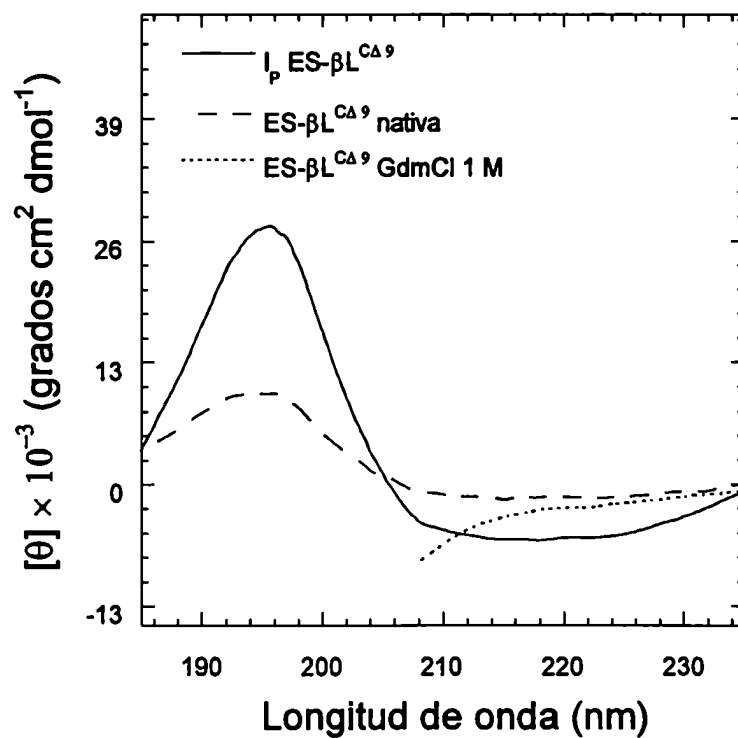


Figura 44. Espectros CD diferencia respecto a ES- β L (ver Figura 43). Como espectro referencia de ausencia de estructura secundaria ordenada, la forma nativa de ES- β L^{CA9} fue desplegada durante 3h en GdmCl, 1M.

bajo las condiciones de CD en el UV-lejano (concentración de proteína = 1.5 μ M), I_p ES- β L^{CA9} se encuentra en estado monomérico. Es importante mencionar que los espectros de CD en el UV lejano, obtenidos por dilución de ES- β L^{CA9} desde 5 a 0.05 M de GdmCl, fueron superponibles a los obtenidos de experimentos de diálisis y purificación.

Los espectros de CD en el UV cercano de ES- β L^{CA9} nativa y ES- β L (Figura 43B) fueron muy similares sugiriendo no sólo que la variante acortada puede alcanzar una estructura terciaria rígida, sino que posee el mismo arreglo espacial de los aminoácidos aromáticos que la variante de longitud completa. En oposición, I_p ES- β L^{CA9} mostró ausencia de estructura terciaria. Por razones técnicas (sensibilidad) el UV cercano requiere concentraciones 10 veces mayores que el UV lejano, por lo que la mayor parte de las moléculas de I_p ES- β L^{CA9} se encuentran en estado dimérico.

Fluorescencia de triptofano

El máximo de emisión de fluorescencia y el rendimiento cuántico para ES- β L^{CA9} fue 337 nm y 0.22 ± 0.02 , respectivamente (Figura 45), ambos valores son cercanos a los observados en el caso de ES- β L, confirmando la presencia de estructura terciaria y rigidez en el entorno de Trp. Si bien el acortamiento no remueve ningún Trp, el Trp 229 (ver Figura 46) se ubica en el estado nativo a distancias de van der Waals de la Met 287, uno de los residuos eliminados. Por lo tanto, la pequeña diferencia en la fluorescencia de ES- β L y ES- β L^{CA9} nativa podría reflejar una perturbación en el entorno de este último residuo. I_p ES- β L^{CA9} también presentó el máximo de fluorescencia centrado a 337 nm, sin embargo, su intensidad fue mínima comparada con ES- β L^{CA9} nativa. Q para I_p ES- β L^{CA9} fue 0.14 ± 0.02 ,

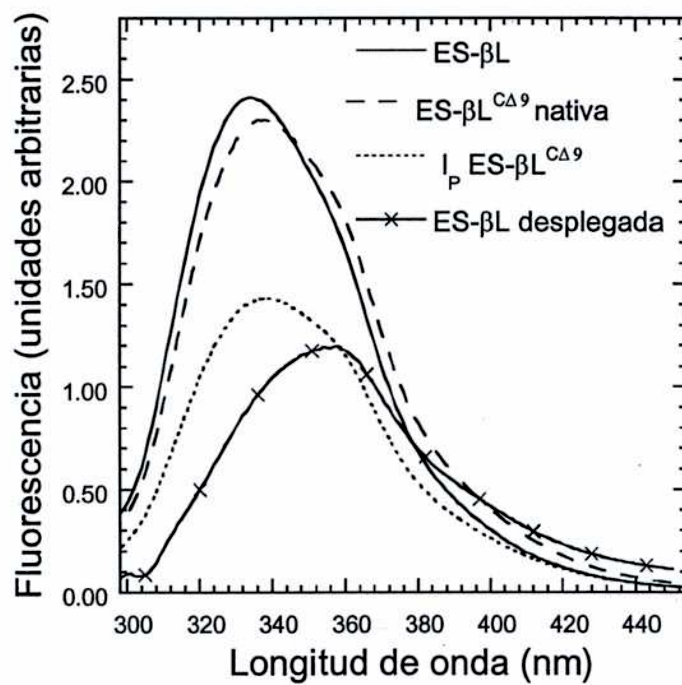


Figura 45. Fluorescencia de Trp de los estados conformacionales de ES-βL^{CA9}. La excitación fue a 295 nm, el ancho de banda de 8 nm, y los datos fueron adquiridos a intervalos de 1 nm entre 250 nm y 450 nm.

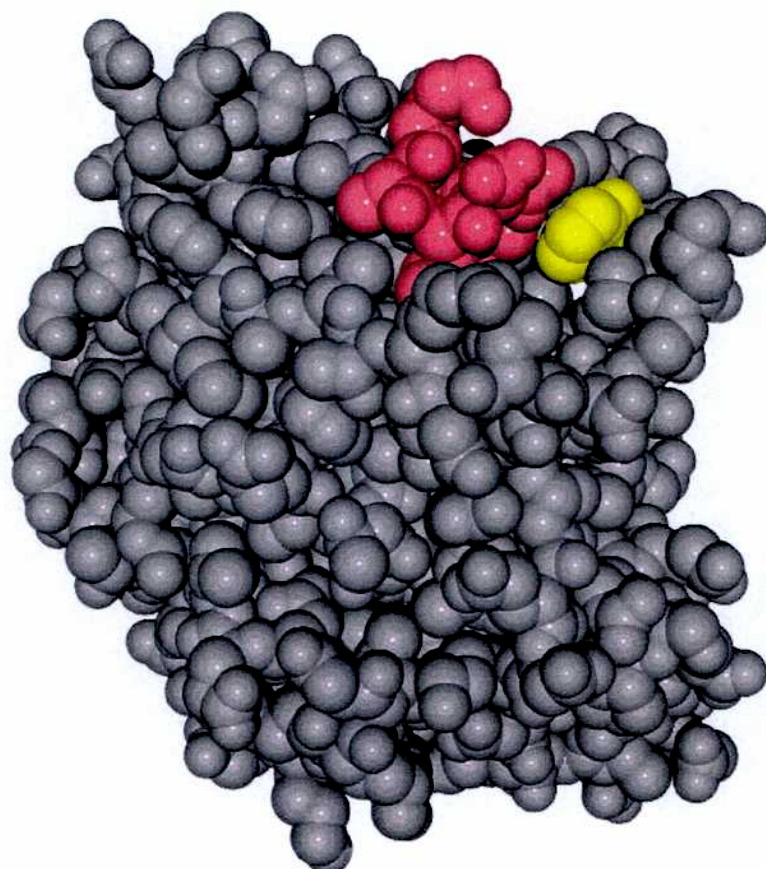


Figura 46. Ubicación espacial del Trp229. Se muestran en un modelo de ES-βL (4BLM) cinco de los nueve residuos eliminados en la variante ES-βL^{CΔ9} (en rojo) y su cercanía (distancia de VDW) al Trp229 (amarillo).

lo que corresponde al Q de Trp libre (a fines comparativos se muestra también el espectro ES- β L desplegada en GdmCl, 5 M). Estos resultados permiten concluir que los residuos de triptofano en I_P ES- β L^{CA9} están protegidos del solvente (λ_{max}) pero adoptan una conformación no nativa. En esta conformación se incrementa el decaimiento de fluorescencia por vías no radiativas, debido, probablemente, a un aumento de la flexibilidad por la pérdida de interacciones terciarias. En el experimento de fluorescencia la concentración de proteína fue 4 μ M y las formas monoméricas y diméricas de I_P ES- β L^{CA9} estuvieron igualmente representadas.

Unión de ANS

El ANS se une a proteínas que presentan cavidades hidrofóbicas accesibles al solvente [14]. La interacción produce un fuerte incremento del rendimiento cuántico del fluoróforo y un corrimiento del máximo de emisión hacia el azul (480 nm). De la misma manera que la mayor parte de las proteínas, la β -lactamasa en sus estados nativo y desplegado no une ANS. Como se muestra en la Figura 47A, ES- β L^{CA9} nativa no une ANS. Este resultado indicó, como fue anticipado por los datos de CD y proteólisis, que ES- β L^{CA9} posee estructura terciaria bien formada. En contraste, I_P ES- β L^{CA9} produjo un fuerte incremento de la fluorescencia del ANS (Figura 47A). Asumiendo estequimetría 1:1, la constante K_D calculada de los datos en la Figura 47B fue de 38 μ M, un valor compatible con la unión a un *molten globule* [129].

Estabilidad de ES- β L^{CA9} nativa y de I_P

El equilibrio de desplegado de ES- β L^{CA9} en GdmCl reveló que su actividad enzimática se pierde en una forma no sigmoidea con el incremento en la concentración de desnaturalizante (Figura 48). El hecho de que la curva de actividad no tenga carácter

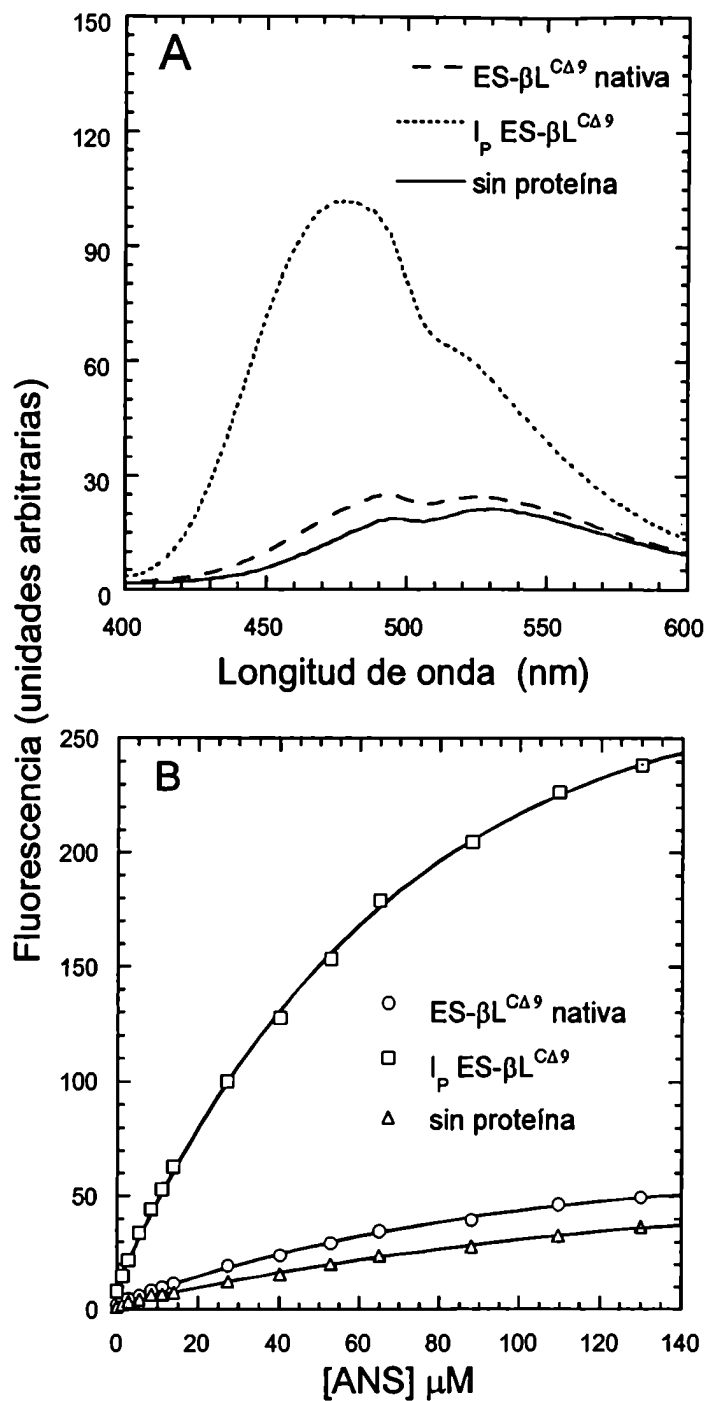


Figura 47. Unión de ANS a ES-βL^{CΔ9} nativa y a I_p ES-βL^{CΔ9} seguida por fluorescencia. (A) Espectros de emisión de ANS 53 μM en presencia o en ausencia de las variantes indicadas. (B) Soluciones de proteína fueron tituladas con ANS y la emisión fue medida a 480 nm. Asumiendo una estequiometría de 1:1, se ajustó una curva de saturación a los datos (después de restar la fluorescencia del ANS libre) permitiendo el cálculo de ligando unido en función de ligando libre y de una K_D ~38 μM. La concentración de proteína fue 3 μM en *buffer* fosfato de sodio 100 mM, pH 7. La excitación fue realizada a 350 nm.

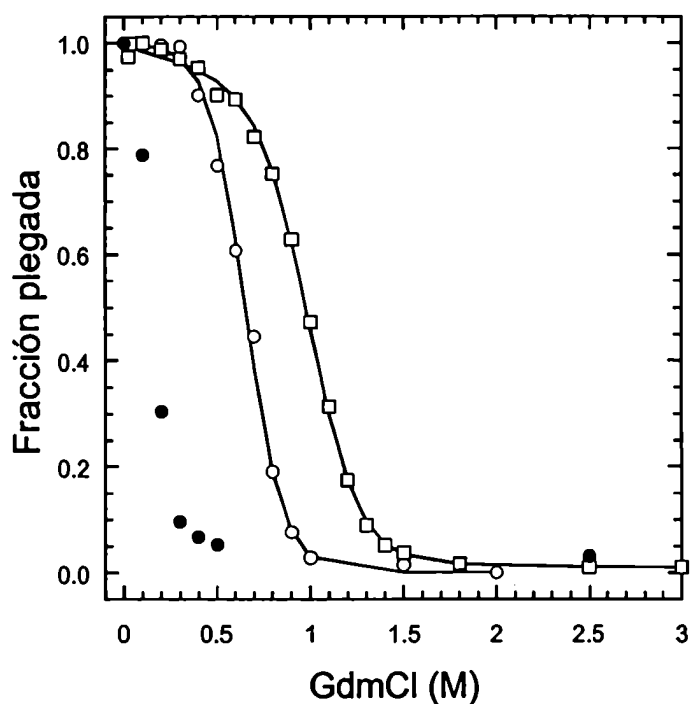


Figura 48. Estabilidad de ES-βL^{CA9} nativa. Tubos con la misma concentración de proteína en estado nativo fueron equilibrados por 5 h en presencia de distintas concentraciones de GdmCl, con o sin el agregado de sulfato de sodio (0.00 o 0.25 M, círculos y cuadrados, respectivamente). Posteriormente se calculó la fracción nativa en base a la intensidad de fluorescencia de Trp (símbolos vacíos), excitación a 295 y emisión a 335 nm o a la actividad enzimática (símbolos llenos), hidrólisis de penicilina.

sigmoideo, sugiere un proceso de desactivación que podría comprender sólo un pequeño cambio en área expuesta. En contraste, la variación en la fluorescencia, se produce a concentraciones mayores de GdmCl e indica un cambio cooperativo (Figura 48 y Tabla 9) con $\Delta G^0_{N\leftrightarrow U}=3.78 \text{ kcal mol}^{-1}$, $m=5.79 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ y $C_m=0.65 \text{ M}$. A concentraciones de GdmCl cercanas a 0.5 M se advierte un estado conformacional singular ($I_{\text{Gdm-0.5 ES-}\beta\text{L}^{\text{CA9}}}$) que, a diferencia de $I_{\text{P ES-}\beta\text{L}^{\text{CA9}}}$, posee fluorescencia (intensidad y λ_{max}) nativa pero es enzimáticamente inactivo. El agregado de sulfato de sodio (250 mM) desplazó la curva de fluorescencia hacia concentraciones mayores de desnaturizante (por desestabilización del estado desplegado) sin incrementar la actividad específica y permitió corroborar el carácter cooperativo de la transición (Figura 48).

Para juzgar la estabilidad de $\text{ES-}\beta\text{L}^{\text{CA9}}$ nativa se analizó el desplegado inducido por temperatura seguido por cambios en la elipticidad a 220 nm, como medida del contenido de estructura secundaria del tipo α -hélice. Para poder estimar correctamente la capacidad calorífica a presión constante, ΔC_p en el proceso de desnaturalización (ecuación (6) en Materiales y Métodos), el experimento se realizó a tres valores de pH distintos, 6, 7 y 8 [42] y se hizo un ajuste múltiple en el que el parámetro mencionado se calcula simultáneamente para los tres experimentos. El mismo procedimiento se utilizó para $\text{ES-}\beta\text{L}$.

La contribución de hidratación al parámetro ΔC_p (ΔC_p^{HIDR}) se correlaciona con el ΔASA , la variación de superficie accesible al solvente [130] y puede calcularse en forma teórica [130-132]. Además, se puede generar una cota superior para ΔASA (realizando el cálculo de ΔASA de la proteína extendida) y una inferior (realizando el cálculo de ΔASA sobre fragmentos aislados). Esto permite establecer un rango para el ΔASA [133, 134]. En definitiva este procedimiento permitiría calcular un intervalo de confianza para ΔC_p .

Los valores obtenidos experimentalmente de ΔC_p para ES- β L y ES- β L^{CA9} son similares, ~ 4 kcal/K, y dado que la contribución de la hidratación sobre el parámetro es mayoritaria (~ 95 %) [132], se puede concluir que en ambos casos se produce una variación similar de área entre los estados N y U.

No hay razones para sospechar que el estado U difiera significativamente entre las variantes ES- β L y ES- β L^{CA9}, y de acuerdo con los experimentos de SEC, descritos más arriba, ES- β L^{CA9} sería tan compacta como ES- β L. Por otro lado, el desplegado parecería ser global ya que el valor teórico de ΔC_p^{HIDR} para la ES- β L es de 3 a 5 kcal/K. Para el cálculo teórico de ΔC_p^{HIDR} se usaron los valores tabulados para péptidos N=17 y para las formas extendidas de la cadena [134], y se aplicaron las ecuaciones de Myers y colaboradores [130].

En la Figura 49 se muestra la curva de desplegado por temperatura para ES- β L^{CA9} nativa a pH 7.0. A este pH el $\Delta G_{N \leftrightarrow U}$ tiene su máximo (3.09 kcal mol⁻¹) a 23.1 °C (Tabla 10). La pequeña discrepancia con el valor calculado para el desplegado por GdmCl seguida por fluorescencia (3.78 kcal mol⁻¹) podría estar relacionada con la presencia de una transición adicional en la última fase del desplegado de ES- β L^{CA9} por temperatura. Por otro lado, la curva de desnaturalización de I_p ES- β L^{CA9} presenta por lo menos dos transiciones. Primero una desnaturalización por frío (con un T_m cercano a los 10 °C), y una segunda transición (calentamiento) muy poco cooperativa con una T_m cercano a los 53 °C. La observación de

Tabla 9. Parámetros termodinámicos y cinéticos para el desplegamiento de ES-βL^{CΔ9}

| | $\Delta G_{N \leftrightarrow U}^0$ (kcal mol ⁻¹) ^c | m (kcal mol ⁻¹ M ⁻¹) | C_m ^d (M) | k_u^0 (s ⁻¹) | k_f^0 (s ⁻¹) | m_u (kcal mol ⁻¹ M ⁻¹) | m_f (kcal mol ⁻¹ M ⁻¹) | $\beta_{N \rightarrow \ddagger}$ ^e (kcal mol ⁻¹ M ⁻¹) |
|-------------------------------------|--|--|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--|--|--|
| SO₄Na₂ | | | | | | | | |
| 0.00 M | | | | | | | | |
| Equilibrio ^a | 3.78 ^f | 5.79 | 0.65 | | | | | |
| Cinética ^b | 0.84 | — | — | 6.43×10 ⁻⁶ | 3.00×10 ⁻⁵ | 2.01 | — | — |
| SO₄Na₂ | | | | | | | | |
| 0.25 M | | | | | | | | |
| Equilibrio | 4.37 | 4.37 | 1.0 | | | | | |
| Cinética | 3.1 | 3.87 | 0.8 | 3.7×10 ⁻⁷ | 7.52×10 ⁻⁵ | 2.35 | 1.51 | 0.39 |
| SO₄Na₂ | | | | | | | | |
| 1.00 M | | | | | | | | |
| Equilibrio | nd | nd | nd | | | | | |
| Cinética | 8.09 | 4.08 | 1.98 | 9.34×10 ⁻⁹ | 0.01 | 2.24 | 1.85 | 0.45 |

^aEl desplegamiento fue inducido por GdmCl a 20 °C y seguido por fluorescencia de triptofanos (ver Figura 48).

^bLa cinética de plegado y desplegamiento fue monitoreada por actividad enzimática (ver Figura 53). Los datos cercanos al punto medio de la transición fueron ajustados mediante la ecuación (7). k_f^0 es la constante de velocidad observada a 50 mM GdmCl.

^c $\Delta G_{N \leftrightarrow U}^0$ es el cambio de energía libre a 0 M GdmCl.

^dLa concentración de desnaturante que causa el 50 % de desplegamiento fue calculada como $\Delta G_{N \leftrightarrow U}^0/m$.

^e m y $\beta_{N \rightarrow \ddagger}$ fueron calculados con las ecuaciones (9) y (10) respectivamente.

^fEl error en los parámetros estimado por el método Monte Carlo fue del 10 % o menos [104].

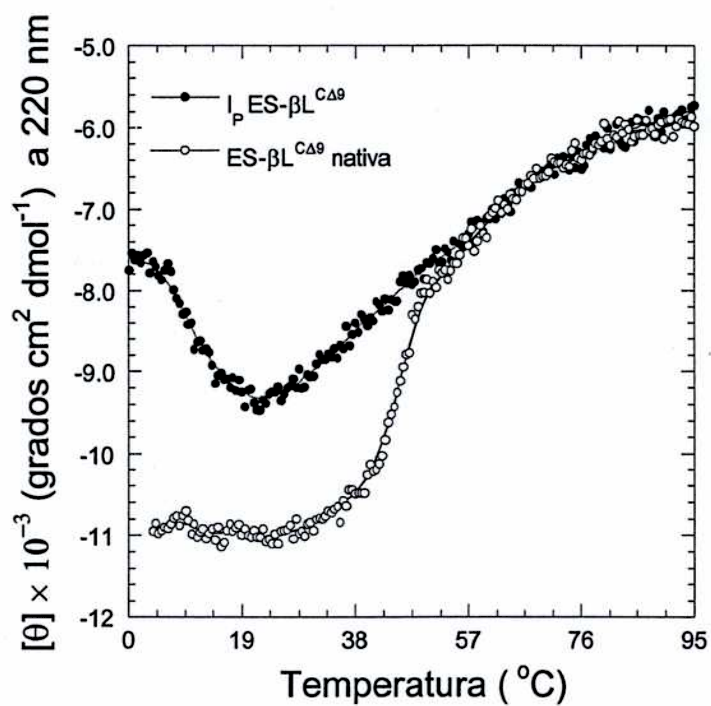


Figura 49. Desnaturalización inducida por temperatura a pH 7. I_P ES- $\beta\text{L}^{\text{C}\Delta 9}$ fue preparado por dilución desde 5 a 0.05 M de GdmCl. La forma nativa fue obtenida por proteólisis-intercambio iónico. La forma ES- $\beta\text{L}^{\text{C}\Delta 9}$ nativa tiene un desplegado cooperativo mientras que I_P ES- $\beta\text{L}^{\text{C}\Delta 9}$ no. La concentración de proteína fue 1.5 μM . La muestra se equilibró a 0-4 °C llevándola posteriormente a 95 °C con una variación de 2 °C / min.

Tabla 10. Estabilidad de la estructura secundaria de ES- β L^{C Δ 9} nativa .

| pH | $\Delta H_{N \leftrightarrow U}$ (kcal mol ⁻¹) | $\Delta C_P_{N \leftrightarrow U}$ (kcal/K) | Tm (°C) | $\Delta G_{N \leftrightarrow U}$ (kcal mol ⁻¹) |
|----|---|--|------------|---|
| 6 | 93.4 | 3.96 | 48.8 | 3.33 (26 °C) |
| 7 | 89.4 | 3.96 | 45.2 | 3.09 (23.1 °C) |
| 8 | 78.9 | 3.96 | 41.4 | 2.44 (22 °C) |

Las transiciones, seguidas por el cambio de elipticidad a 220 nm se indujeron con una variación de 2 °C por minuto entre 4 y 95 °C. La concentración de proteína fue 1.5 μ M. ΔC_P fue calculado a partir del ajuste simultáneo de los tres experimentos (pH 6.0, 7.0 y 8.0). La curva de ES- β L^{C Δ 9} a pH 7.0 se muestra en la Figura 49.

desplegado por frío a temperaturas mayores que 0 °C, es típico de proteínas severamente desestabilizadas. En general la desnaturalización por calor de estructuras tipo *molten globule* se caracterizan por alto ΔC_p (alto grado de compactación) y bajo ΔH debido posiblemente a la disminución de interacciones terciarias estabilizadoras en el estado parcialmente plegado.

Variantes truncadas S→C

Para avanzar en la caracterización de los estados conformacionales de ES- β L^{CΔ9} se prepararon variantes acortadas en las que se introdujo por mutagénesis un residuo de cisteína reemplazando una serina (Figura 10, Capítulo II y Tabla 2). Las cisteínas, usadas como sondas químicas permiten caracterizar la accesibilidad del solvente a su entorno.

Para explorar si el extremo C-terminal de la cadena polipeptídica de ES- β L^{CΔ9} nativa y de I_P ES- β L^{CΔ9} está ubicado sobre la lámina β , se hizo el reemplazo S265C. Como se vio en el capítulo anterior, en S265C ES- β L nativa, el tiol está completamente oculto en la interfase que se forma entre los dos elementos de estructura secundaria pero se expone en S265C ES- β L desplegada con GdmCl o urea reaccionando con el DTNB en un 100 % y con velocidades similares al BME.

La variante S265C ES- β L^{CΔ9}, nativa es enzimáticamente activa, compacta ($R_S=25.5\text{Å}$) y su residuo de cisteína no es reactivo frente al DTNB. I_P S265C ES- β L^{CΔ9}, en cambio, reacciona rápida y completamente (relación molar [SH]/[proteína] = 1).

Estos resultados indican que el subdominio formado por la hélice corta y la plataforma β , de ES- β L^{CΔ9} nativa y de la ES- β L tienen probablemente arreglos similares. En cambio,

la conformación de S265C I_PES-βL^{CA9} expone al tiol, revelando una conformación no nativa, abierta o fluctuante por lo menos en el entorno de la cisteína introducida.

Resultados idénticos fueron obtenidos con la segunda variante estudiada, S126C ES-βL^{CA9}, revelando que el subdominio α helicoidal permanece plegado en la forma troncada nativa y se encontraría desorganizado en S126C I_PES-βL^{CA9}.

Antes de extrapolar las conclusiones obtenidas a la estructura de I_PES-βL^{CA9} hay que verificar que las mutaciones S→C no tengan efecto severo sobre la estabilidad de esta forma conformacional. Los resultados del desplegamiento térmico de las variantes mostrados en la Figura 50 indican que la estructura residual de I_P no estaría significativamente desestabilizada como consecuencia de los reemplazos efectuados. Estudios cinético futuros podrían ayudar a clarificar este punto [42] y a definir la participación de estos residuos en el estados de transición en las distintas reacciones de plegado (por ejemplo: I_P→N).

Cinética de plegado de ES-βL^{CA9}

La incubación de I_PES-βL^{CA9} a 20-25 °C produce ES-βL^{CA9} enzimáticamente activa, dejando ver que I_PES-βL^{CA9} está conectado con la forma nativa (Figura 51A). El efecto más impactante del acortamiento de la hélice C-terminal de ES-βL es el enlentecimiento del plegado: ES-βL se pliega en segundos, ES-βL^{CA9} en horas. Al plegado de ES-βL^{CA9} le sigue un proceso de desnaturalización, posiblemente por agregación, cuya amplitud es fuertemente dependiente de la temperatura y que puede ser explicado por una serie de reacciones sucesivas [42] (Figura 51B). A 20 °C, se optimiza la velocidad de plegado con mínima desnaturalización posterior.

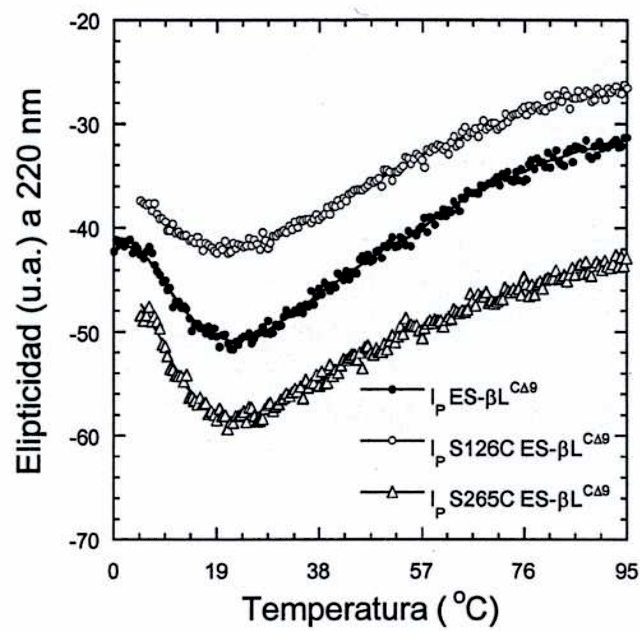


Figura 50. Efecto de los reemplazos S126C y S265C sobre la estabilidad térmica de las variantes indicadas. Las condiciones fueron idénticas a las utilizadas en el experimentos de la Figura 49.

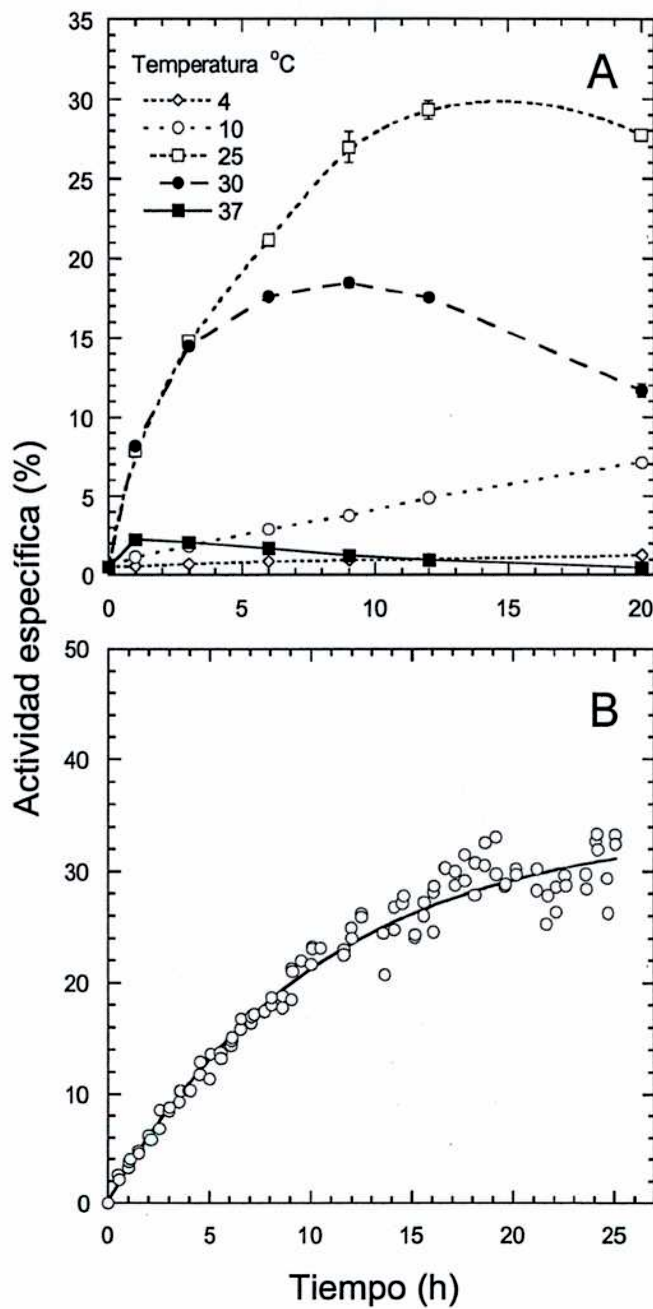


Figura 51. Plegado de ES- β L^{CA9}. (A) Ensayos preliminares de replegado de ES- β L^{CA9} a distintas temperaturas a partir de I_P preparado por SEC-preparativa. (B) Plegado de ES- β L^{CA9} a 20 °C por dilución 1:100 desde 5 M de GdmCl. El proceso fue seguido por actividad enzimática.

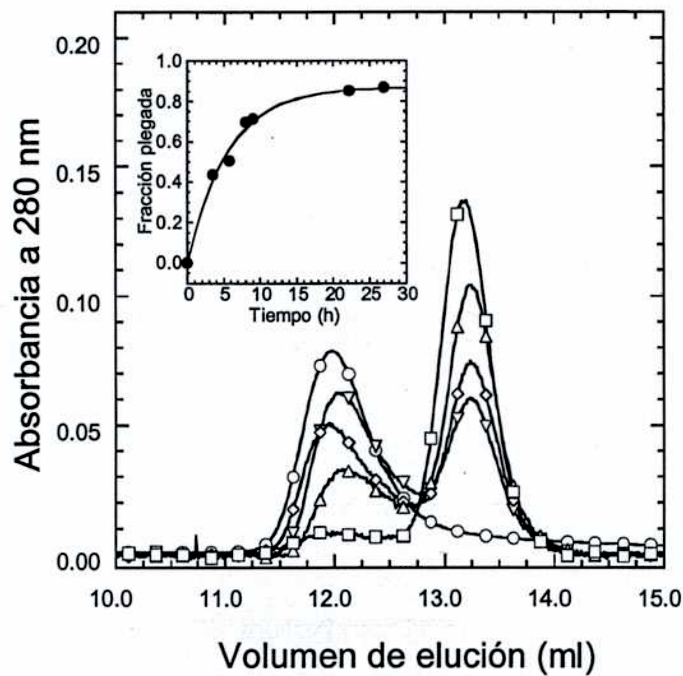


Figura 52. Conversión de I_p ES- βL^{CA9} (dimérico) en la forma ES- βL^{CA9} nativa seguida por SEC-FPLC a 20 °C. La reacción fue frenada por enfriamiento a 4 °C a tiempo 0 (○), 3 (▽), 6 (◇), 8 (△) y 22 h (□) e inyección en una columna Superosa 12 equilibrada a la misma temperatura. La fracción plegada (inserto) fue calculada como la fracción de área que eluye a ~13.2 ml (volumen de elución nativo). La concentración de proteína durante el plegado fue 8 μ M.

El plegado de ES- β L^{CA9} por dilución a 20 °C desde 5 a 0.05 M GdmCl (Figuras 51B y 53) se pudo describir con una amplitud de 30 % (la actividad específica final fue del 30 % de ES- β L) y un tiempo de relajación de 589 min. El agregado de sulfato de sodio 250 mM duplicó el rendimiento de plegado (60 % de las moléculas llegaron a la conformación enzimáticamente activa con compactación nativa (SEC-FPLC). Además, el agregado de sulfato de sodio 250 mM quintuplicó la constante de velocidad de la reacción (ver Figura 53). En contraste, el agregado de sulfato de sodio no afectó la velocidad de plegado de ES- β L.

La conversión de I_P ES- β L^{CA9} dímérico en la forma monomérica ES- β L^{CA9} nativa se estudió además por SEC-FPLC (Figura 52A). El tiempo de relajación fue de 575 min, probando que la aparición de actividad enzimática y la formación de monómero compacto ocurren con la misma velocidad.

El equilibrio dímérico \leftrightarrow monómero de I_P ES- β L^{CA9} y su efecto en velocidad de replegado.

En segundo término se estudió el efecto de la concentración de proteína sobre la velocidad de la transformación de I_P ES- β L^{CA9} en ES- β L^{CA9} nativa (Figura 54). A altas concentraciones se favorece la formación de I_P ES- β L^{CA9} dímérico y si la conversión dímérico \rightarrow monómero fuese el paso limitante en la reacción de plegado, esto debería verse reflejado en una disminución de la velocidad de aparición de moléculas enzimáticamente activas.

Entre 0.3 y 5 μ M, la velocidad permanece constante y el rendimiento aumenta. De acuerdo a la K_D calculada (Figura 41), ambos, dímico y monómero, están presentes en todo el rango

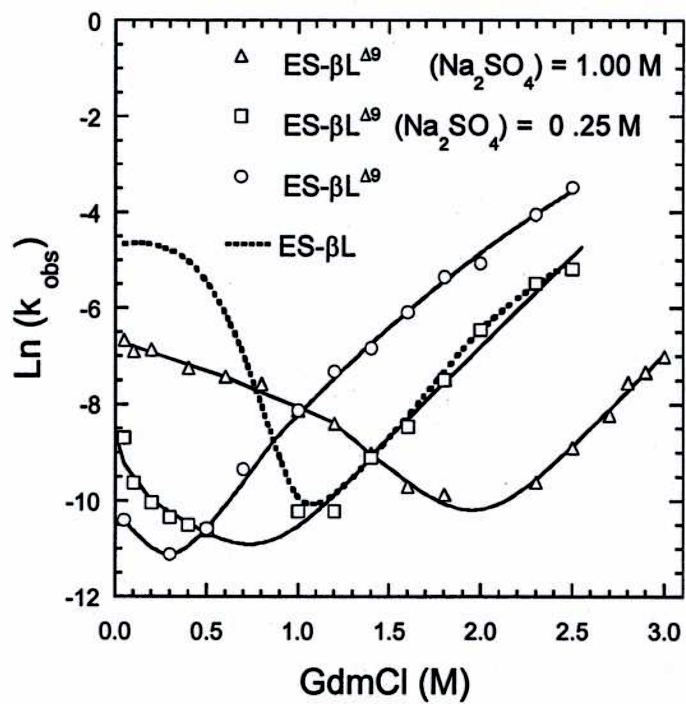


Figura 53. Gráfico de Chevron para ES- $\beta\text{L}^{\text{CA}9}$ y efecto del sulfato de sodio.

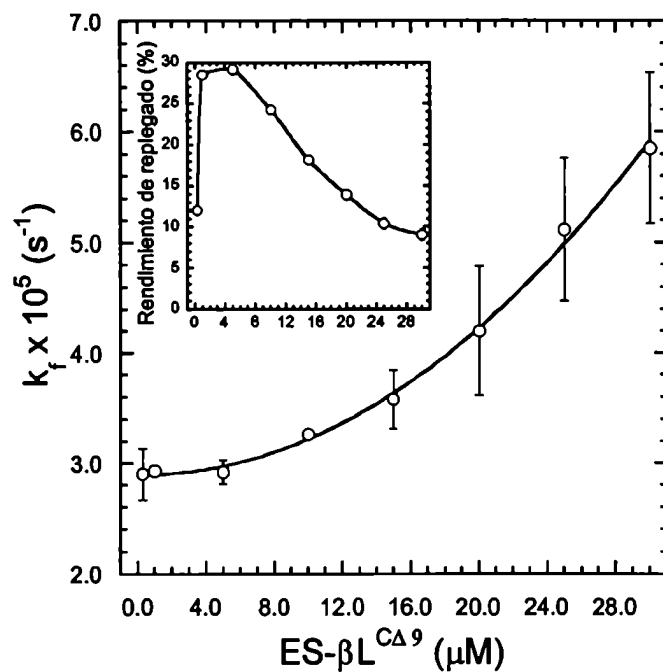


Figura 54. Velocidad del plegado de I_P ES-βL^{CA9} → ES-βL^{CA9} en función de la concentración de proteína. La reacción se realizó a 20 °C, pH 7.0 y fue seguido por actividad enzimática. En el inserto se muestra el rendimiento de ES-βL^{CA9} nativa en función de la misma variable

de concentraciones, con una proporción de dímero incrementándose desde 10 a 50 %. Este experimento sugirió que la disociación del dímero no limita la aparición de moléculas activas y que ambas formas pueden plegarse al estado nativo con velocidades similares.

A altas concentraciones la velocidad de replegado aumenta y el rendimiento decrece significativamente. Paralelamente, se observó por SEC-FPLC un fuerte incremento en la proporción de agregados de alto peso molecular (muy probablemente formas parcialmente plegadas). El aumento de la velocidad de plegado con la concentración no es fácil de explicar y posiblemente requiera investigación adicional para aclarar su mecanismo.

Gráficos de Chevron

Para la variante ES- β L^{CA9} (Figura 53) no fue posible realizar una comparación exhaustiva entre los resultados de cinética y los de equilibrio de desnaturalización porque la "V" del gráfico de Chevron está notablemente desplazada hacia muy bajas concentraciones de desnaturalizante. No obstante, se pudo estimar el $\Delta G_{N \leftrightarrow U}^0$ utilizando k_{obs} a concentraciones de desnaturalizante cercanas a cero y k_u^0 obtenida por extrapolación del brazo derecho del gráfico. El valor de $\Delta G_{N \leftrightarrow U}^0$ obtenido (cercano a las 0.5 kcal mol⁻¹) fue menor que el calculado a partir de los experimentos de equilibrio. La discrepancia entre las transiciones seguidas por actividad y por fluorescencia, como fue sugerido anteriormente, probablemente sea consecuencia de la presencia de estados parcialmente plegados, inactivos pero muy compactos (por ejemplo: I_p e $I_{0.5M}$).

Los valores de m_f calculados a partir de la representación de Chevron, en ausencia y en presencia de sulfato de sodio, sugieren que la barrera de activación involucra un importante cambio en la superficie molecular accesible. Una evidencia de esto fue un incremento de ~40 veces en k_f (en replegado desde 5 a 0.05 M GdmCl) de ES- β L^{CA9} en presencia de

sulfato de sodio 1 M. Como se dijo anteriormente, esto contrasta con la falta de efecto del osmolito sobre la velocidad de plegado de ES-βL. El efecto desestabilizador de los osmolitos es proporcional al área expuesta de las molécula. Por ende puede deducirse que en el caso de ES-βL no hay un gran cambio de área expuesta entre el estado de transición (T_{\ddagger}) y el estado que le precede inmediatamente (pre T_{\ddagger}). Por lo mismo puede decirse que sí existe un cambio de área al pasar de pre T_{\ddagger} a T_{\ddagger} en el caso de ES-βL^{CA9}. Este cambio es muy probablemente una disminución de área ya que puede mostrarse fácilmente en un diagrama de energías que esta es la única posibilidad que lleva a la aceleración de la reacción por el agregado de osmolito.

Las consideraciones que se acaban de hacer sugieren que pre T_{\ddagger} es una forma expandida y que I_p ES-βL^{CA9} debe expandirse (desplegarse) para producir el intermediario pre transición. A concentraciones de desnaturalizante por arriba de C_m los estados parcialmente plegados deberían ser mucho menos estables que U, dando lugar muy probablemente a cinéticas de desplegamiento desde N a U. De acuerdo con esto, los experimentos de SEC-FPLC en el equilibrio a 1 M GdmCl revelaron únicamente la presencia de las formas ES-βL^{CA9} nativa (3 %) y U (97 %) con R_S de 25.15 y 40.47 Å, respectivamente (resultados no mostrados).

Dentro del error experimental, las representaciones de Chevron de ES-βL y ES-βL^{CA9} arrojan valores muy similares para la pendiente del brazo derecho (desplegado). Como la superficie expuesta de la forma nativa debería ser similar para ambas variantes, las transiciones $N \rightarrow T_{\ddagger}$ deberían involucrar cambios similares en el área expuesta, por lo que el estado T_{\ddagger} de ES-βL^{CA9} debería ser relativamente compacto, más cercano a N que a U, tal como fue descrito para ES-βL.

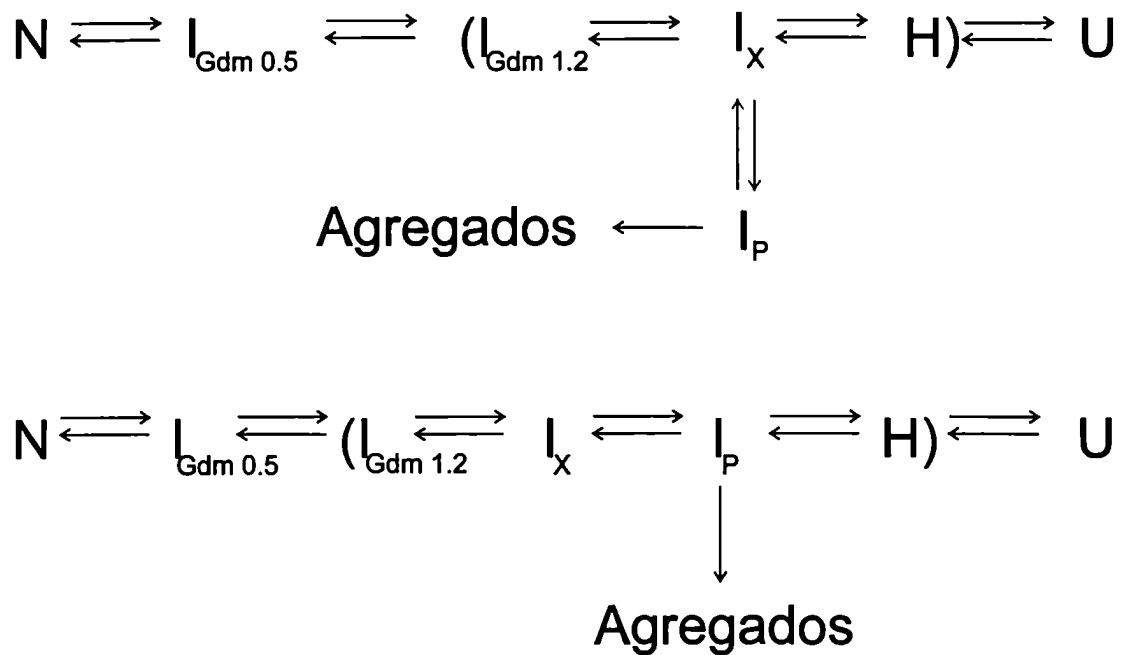


Figura 55. Modelos hipotéticos mínimos de reacción de plegado de ES-βL^{CA9} con intermediarios cinéticos y de equilibrio descritos en el texto. El equilibrio entre I_PES-βL^{CA9} e I_XES-βL^{CA9} podría proveer la explicación más simple para describir por si mismo el lento replegado de ES-βL^{CA9}. En el modelo superior, I_PES-βL^{CA9} se encuentra fuera de la vía principal de plegamiento (*off pathway*).

En la Figura 55 en base a los resultados experimentales, se proponen dos modelos para el plegado de ES- β L^{CA9}. Estos modelos asumen la existencia de un intermediario que será llamado provisoriamente I_X ES- β L^{CA9}. Durante el replegado desde U, podría establecerse un equilibrio relativamente rápido entre I_X ES- β L^{CA9} e I_P ES- β L^{CA9}. La mayor parte de las moléculas permanecerían temporalmente atrapadas en la forma I_P ES- β L^{CA9}.

Especulando, I_X ES- β L^{CA9} podría ser un estado similar al estado H ya mencionado [76, 110, 118]. Por otra parte desde un punto de vista cinético I_X ES- β L^{CA9} podría ser similar al estado I descrito para la β -lactamasa TEM que está en la vía de plegado hacia el estado nativo y es el punto de bifurcación hacia la vía de los agregados [135, 136]. En el caso de ES- β L, como en el caso de I, la transformación en N sería mucho más rápida que la formación de un I_P hipotético, por lo que este último no tendría chances de acumularse.

El equilibrio entre I_P ES- β L^{CA9} e I_X ES- β L^{CA9} podría proveer la explicación más simple y trivial para justificar, por si mismo, el lento plegado de ES- β L^{CA9}. Si este fuera el caso, el equilibrio puede ser incluido en las ecuaciones cinéticas [42] (ver Materiales y Métodos)

mediante la ecuación (11)

$$\frac{\partial N}{\partial t} = D \frac{k_f^0}{\frac{1}{K_{eq}} + 1} \quad (11),$$

donde D es la concentración molar de I_P ES- β L^{CA9} más I_X ES- β L^{CA9}. La constante de equilibrio y la k_{obs} se describen como

$$\frac{I_X}{I_P} = K_{eq} \quad (12) \quad k_{obs} = \frac{k_f^0}{\frac{1}{K_{eq}} + 1} \quad (13)$$

en esta situación

$$\ln(k_{obs}) = \ln \left[\frac{k_f^0}{\frac{1}{K_{eq}} + 1} \times \exp\left(-\frac{m_f}{RT} [\text{GdmCl}]\right) + k_u^0 \exp\left(-\frac{m_u}{RT} [\text{GdmCl}]\right) \right] \quad (14)$$

Como en la ecuación (15) la K_{eq} es función de la concentración de desnaturalizante, es necesario modificarla para tener en cuenta su efecto en el gráfico de Chevron. Para ello,

$$K_{eq} = \exp\left(-\frac{\Delta G}{RT}\right) \quad (15)$$

$$\Delta G = \Delta G^\circ - m \times [\text{GdmCl}] \quad (17)$$

$$K_{eq} = \exp\left(-\frac{\Delta G^\circ - m \times [\text{GdmCl}]}{RT}\right) \quad (18)$$

Aquí m es proporcional al aumento de área al pasar de las formas I_P ES- β L^{CA9} a I_X ES- β L^{CA9}. Se considera que el área aumenta porque I_P ES- β L^{CA9} es muy compacto y I_X ES- β L^{CA9} es más expandido que el estado T_{\ddagger} (ver más arriba). La ecuación (18) se puede introducir en la (15), con lo que es posible simular el efecto de un preequilibrio como el descrito para todas las concentraciones de cloruro de guanidinio utilizadas en el gráfico de Chevron. Los valores de k_f , k_u , m_f , m_u pueden asumirse a partir de la Tabla 9. Los valores de ΔG°_{IP-IX} y m_{IP-IX} pueden ser estimados mediante suposiciones: (a) La estabilidad termodinámica de I_P ES- β L^{CA9} es menor que la de ES- β L^{CA9} nativa (ver Figura 49), por lo tanto $\Delta G^\circ_{IP-IX} < 3.8$ kcal/mol (ver tabla 4, página 96); (b) m tiene que ser una fracción del m_{kin} estimado en Tabla 9, y por lo tanto se puede representar como m_{IP-IX}/m_{kin} variando entre cero y uno.

Estas restricciones permiten fijar el límite inferior para la velocidad de plegado en presencia del equilibrio I_P ES- β L^{CA9} \leftrightarrow I_X ES- β L^{CA9} y por lo tanto simular el brazo izquierdo del gráfico de Chevron (Figura 56).

Es importante remarcar que la simulación se hace sólo a los fines de estimar cuánto podría enlentecer la reacción de plegado un equilibrio I_P ES- β L^{CA9} \leftrightarrow ES- β L^{CA9} de ocurrir este en

el contexto de una reacción en la que el estado de transición fuera el mismo para el caso de ES-βL y ES-βL^{CΔ9}. Las únicas evidencias experimentales que sugieren que esto es así son: (a) Las pendientes del brazo de desplegado del gráfico de Chevron, dentro del error experimental, son idénticas, como sería de esperar si ambos estados de transición tuvieran un área expuesta similar. (b) El agregado de sulfato de sodio, como se vio antes confirma la forma general del gráfico de Chevron en 'V' en la región cercana a $k_f=k_U$. También provee pendientes compatibles con un mecanismo similar de plegado para ambas variantes. (ver Figura 53).

La simulación también implica que el equilibrio $I_X \text{ ES-}\beta\text{L}^{\text{C}\Delta 9} \leftrightarrow I_P \text{ ES-}\beta\text{L}^{\text{C}\Delta 9}$ se alcanza mucho más rápido que el replegado a N. Esta premisa es compatible con la inexistencia de un retardo inicial (ver Figura 51).

La simulación produce una familia de curvas para el gráfico de Chevron (Figura 56A) y revela que: (a) la existencia de un preequilibrio curva el brazo izquierdo del gráfico de Chevron, de acuerdo con resultados experimentales obtenidos anteriormente [137], (b) el preequilibrio induce menor curvatura a altas concentraciones de desnaturalizante, (c) en presencia del preequilibrio, si se hace una extrapolación a cero desnaturalizante se subestima el verdadero valor de k_f^0 .

Para relacionar estos efectos con los datos experimentales la ecuación (14), fue ajustada a los mismos (Figura 56B). El ajuste converge solo si k_f^0 no excede 0.02 s^{-1} . Si se fuerza a k_f^0 de ES-βL^{CΔ9} a adoptar el valor observado para ES-βL (0.29 s^{-1}) se produce ajuste sólo si se aumenta ΔG_{IP-IX}^0 por encima de 5.5 kcal/mol , lo que está muy por encima del valor de estabilidad de $I_P \text{ ES-}\beta\text{L}^{\text{C}\Delta 9}$.

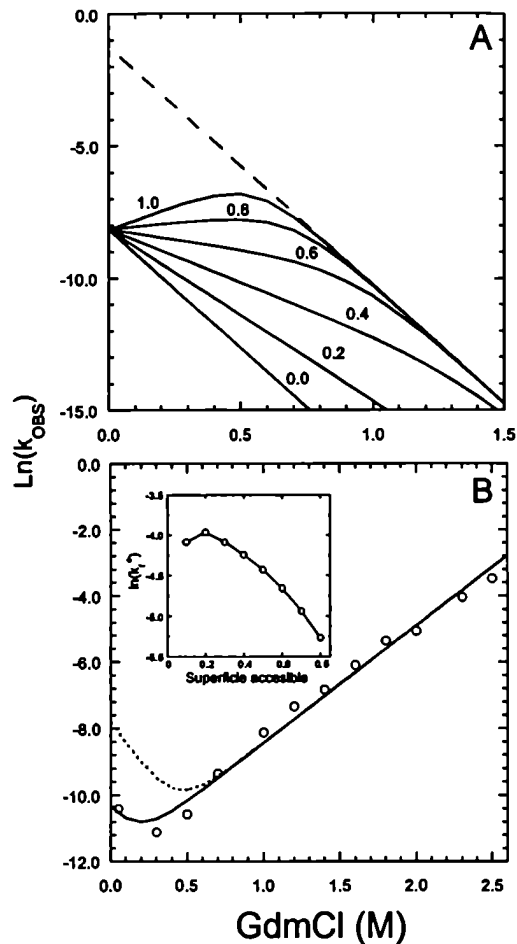


Figura 56. Simulación de la rama izquierda del gráfico de Chevron en presencia de un equilibrio hipotético $I_P \text{ ES-}\beta\text{L}^{\text{CA9}} \leftrightarrow I_X \text{ ES-}\beta\text{L}^{\text{CA9}}$ (ver Figura 55 y ecuaciones (7), (11-18)). Se asumió un $\Delta G^0_{I_P-I_X}=3.8$ kcal/mol para el equilibrio mencionado (ver texto). Las líneas llenas representan distintas relaciones entre $m_{I_P-I_X}$ y m_{kin} . La forma de estas curvas está de acuerdo con el efecto *roll over* encontrado experimentalmente [137] y atribuido a la existencia de equilibrios como el mencionado. La línea de rayas es la simulación asumiendo que $K_{eq}=1 \times 10^6$, en cuyo caso no existirían concentraciones significativas de $I_P \text{ ES-}\beta\text{L}^{\text{CA9}}$ y el resultado reproduce lo observado para la cinética de plegado de ES- β L.

Panel B: ajuste de la ecuación (15) modificada (ver texto) a los datos experimentales del desplegado y plegado de ES- $\beta\text{L}^{\text{CA9}}$. En el inserto se muestra que la relación $m_{I_P-I_X}/m_{kin}$ que maximiza la velocidad de plegado es ~ 0.2 . Por lo tanto el ajuste de la parte principal de la figura se hizo usando esa relación. Los parámetros k_u , m_f y m_u se tomaron de la Tabla 9 y se mantuvieron fijos. La línea llena indica el resultado de fijar $\Delta G^0_{I_P-I_X}=3.8$ kcal/mol. En este caso k_f^0 converge a un valor de 0.019 s^{-1} . La línea de puntos muestra el resultado de fijar $k_f^0=0.29 \text{ s}^{-1}$ (la constante de velocidad de ES- β L).

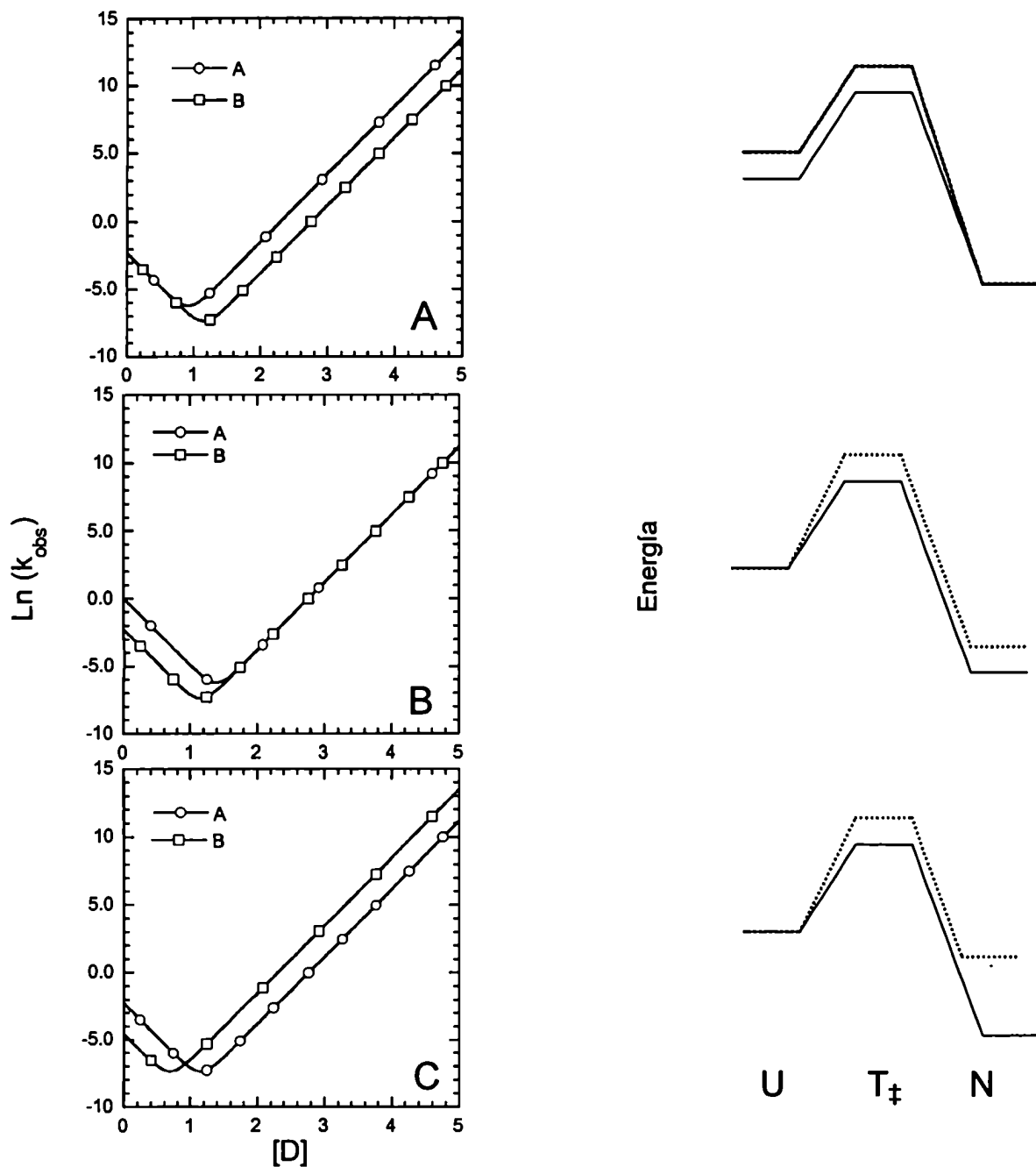


Figura 57. Comparación cualitativa de gráficos teóricos de Chevron. Panel A, igual desestabilización de U y del estado de transición (T_{\ddagger}). Panel B, igual desestabilización de T_{\ddagger} y N. Panel C, T_{\ddagger} se desestabiliza menos que N. Este último caso es el que concuerda con lo observado para ES- β L y descarta los casos anteriores.

En conclusión, la simulación sugiere que la reducción en la velocidad de replegado podría ser explicada sólo parcialmente por un preequilibrio hipotético entre I_X ES- β L^{CA9} e I_P ES- β L^{CA9}.

La parte explicable por un eventual preequilibrio I_X ES- β L^{CA9} \leftrightarrow I_P ES- β L^{CA9} en el descenso de la constante de velocidad va desde 0.02 a $3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. La reducción desde 0.29 a 0.02 s^{-1} debe ser, entonces, resultado de efectos directos del acortamiento de la hélice C-terminal sobre el estado de transición de la reacción de plegado.

En base a lo expuesto, los gráficos de Chevron de ES- β L y ES- β L^{CA9} (Figura 53) pueden ser comparados cualitativamente para especular sobre si los residuos eliminados forman o no parte de una región estructurada en el estado de transición.

Para una concentración determinada de desnaturalizante, las velocidades de replegado y desplegado, para ES- β L^{CA9} son mayores y menores respectivamente que las velocidades de ES- β L generando un patrón con brazos paralelos (en 'W') (Figura 57C). Este patrón descarta que la escisión pueda afectar igualmente la estabilidad del estado nativo y estado de transición (Figura 57A) y del estado desplegado y estado de transición (Figura 57B). Cualquiera de esas dos posibilidades requiere superposición de un brazo. Según el análisis clásico del plegado para moléculas con dos estados, un patrón de 'W' es sólo compatible con un Φ positivo y fraccionario [42]. En nuestro caso si ES- β L y ES- β L^{CA9} poseen el mismo estado de transición los residuos 287-295 deberían estar parcialmente estructurados desestabilizando en menor medida al estado de transición que a la forma nativa.

En resumen los resultados y consideraciones teóricas de este capítulo sugieren que los residuos 287-295 podrían participar en el plegado ES- β L codificando información en múltiples niveles: (a) modulando localmente la preferencia a formar estructura secundaria;

(b) codificando estructura nativa indirectamente, desfavoreciendo trampas cinéticas que podrían involucrar asociación errónea de unidades de plegado; (c) acelerando el pasaje a través del estado de transición; (d) estabilizando al estado nativo.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

La organización modular de la β -lactamasa

Estados parcialmente plegados, curvas de desnaturalización no coincidentes, transiciones multifásicas, *cores* resistentes e intermediarios cinéticos de la β -lactamasa son compatibles con un mecanismo de ensamblado modular o plegado por partes. La presencia de módulos estructurales en la β -lactamasa fue sugerida hace tiempo [138]. Aunque inicialmente la no coincidencia de distintas sondas en los experimentos de desplegamiento en el equilibrio fue interpretada como evidencia a favor del modelo *framework* [138], en rigor no se puede descartar que la topología de los módulos o subdominios pueda estar relativamente definida en estos intermediarios. En este trabajo de tesis doctoral, para estudiar la organización modular de la β -lactamasa se realizó una caracterización fisicoquímica de los estados parcialmente plegados, se midió la accesibilidad de cisteínas ubicadas en distintas partes de la cadena polipeptídica y se estudió el efecto de la eliminación de información (secuencia) sobre el ensamblado de la estructura nativa. Del conjunto de estos estudios se desprende la existencia de regiones moleculares con diferentes estabilidades. La reactividad parcial de los tioles permitió demostrar la existencia de un intermediario en urea 4 M con un *core* que incluye a la Cys126. Este intermediario no posee estructura terciaria pero sí presenta estructura secundaria. Por otro lado el estado parcialmente plegado $H_{urea\ 6-7}$, (que en este trabajo se caracterizó por primera vez para ES- β L) posee la Cys126 100 % accesible al solvente.

También pudo determinarse que el reemplazo de Ser265→Cys265 tiene consecuencias importantes para el plegado. Como se mencionó en el Capítulo III, el efecto desestabilizador sobre intermediarios con estructuras compactas como $I_{urea\ 2-4}$ y $H_{urea\ 3-5}$, indica que la interacción removida formaría parte de las interacciones terciarias presente en

estos estados y que por lo tanto $I_{\text{urea } 2-4}$ y $H_{\text{urea } 3-5}$ podrían contar con un dominio $\alpha+\beta$ estructurado.

Por otro lado, cabe consignar que el efecto desestabilizador en la variante S265C podría deberse no sólo a la ausencia de una interacción específica sino también a la diferencia de volumen o a la diferencia en la polaridad del grupo -SH con respecto al grupo -OH en las condiciones experimentales. En cualquiera de estos casos el resultado implica un efecto sobre el empaquetamiento y en definitiva sobre la estructura terciaria en la región S265 en N, en $I_{\text{urea } 2-4}$ y en $H_{\text{urea } 3-5}$.

Es importante recalcar que el reconocimiento de la organización modular de proteínas con complejidad topológica podría simplificar sustancialmente el análisis del problema del plegado, y podría tener implicancias en la forma en que se distribuye la información para el plegado en la secuencia primaria. Por consiguiente, parece clave no tan sólo el estudio de proteínas pequeñas con plegado rápido sino también como en este caso, el estudio de fragmentos o unidades autónomas de plegado de proteínas de mayor tamaño y complejidad.

Distribución de la información para el plegado en la secuencia de la β -lactamasa

La eliminación de los residuos 287-295 afecta dramáticamente la velocidad de replegado de la β -lactamasa: $ES-\beta L^{CA9}$ se pliega 10^4 veces más lentamente que $ES-\beta L$. Mientras que $ES-\beta L$ forma un monómero activo en segundos, $ES-\beta L^{CA9}$ forma primero $I_P ES-\beta L^{CA9}$, con todas las características de un *molten globule* y que puede estabilizarse formando un dímero.

Luego, $I_P ES-\beta L^{CA9}$, muy lentamente, se repliega generando la conformación nativa de $ES-\beta L^{CA9}$ y agregados solubles e insolubles de alto peso molecular. Dado su impacto en la

cinética, es muy probable que algunas de las interacciones removidas en ES- β L^{CA9} estén formadas en el estado de transición de ES- β L. Probablemente el posicionamiento de la hélice α 11 sobre la lámina β estabilice en parte al dominio α + β en el estado de transición. Ip ES- β L^{CA9} es una trampa cinética en el plegado de ES- β L^{CA9}, un valle profundo en la superficie del embudo conformacional. ES- β L^{CA9} es capaz de salir del valle y alcanzar el estado nativo, por lo tanto contiene toda la información necesaria para determinar el estado nativo.

Un aspecto de los resultados del acortamiento de la cadena polipeptídica de ES- β L merece especial atención por su impacto teórico y práctico. Los residuos removidos en ES- β L^{CA9} establecen un número elevado de interacciones con otros residuos distantes en secuencia. En el campo del plegado proteico el papel de las interacciones de este tipo en la determinación de la estructura terciaria de las proteínas concitó un enorme interés. Por un lado estas interacciones son el paradigma del problema del plegado, ya que su formación implica una búsqueda conformacional muy compleja y distingue a la estructura proteica por su carácter intrincado y aperiódico. Por otro lado, desde el punto de vista teórico, el enorme costo entrópico de establecer contactos específicos de largo alcance como forma de definir el plegado resulta muy difícil de justificar. Los resultados del acortamiento de ES- β L sugieren fuertemente un rol secundario del orden de contactos (ver Capítulo I) en el establecimiento de la topología nativa, en fuerte contraste con el rol central de estas interacciones en la cinética de replegado [41].

Otro aspecto general de los resultados presentados es que el contenido de información es muy variable a lo largo de la cadena polipeptídica y que algunas partes de la cadena no llevan información para la estructura 3D del resto de la molécula. El caso de los últimos

9-14 residuos de ES-βL no es particular. Una variante corta de ES-βL, en la que se han eliminado 14 residuos del extremo N-terminal (la hélice α1 completa), también exhibe actividad enzimática (actividad específica=1.5 %, $K_M=0.16$), indicando que una pequeña fracción de las moléculas también alcanza estructura 3D nativa (JS et. Al, resultados no publicados). Por otro lado, por cristalografía de rayos-X se demostró que una variante de β-lactamasa de *S. aureus* en la que se ha eliminado un segmento no terminal de 16 residuos posee una estructura muy similar a la enzima salvaje [67]. En su conjunto, estos datos indican que ~20 % o más de la secuencia podría no ser requerida para especificar el plegado de β-lactamasa. Por último, trabajos en nuestro laboratorio muestran que el fragmento 'core' (el dominio α de ES-βL) retiene la información para la adquisición de estructura secundaria nativa (V. A. Risso y colaboradores, en preparación) pero posee características de *molten globule* como unión de ANS y falta de estructura terciaria bien definida.

Otros ejemplos en la literatura

La existencia de porciones de secuencia sin información esencial para la estructura 3D parece ser muy común. Por ejemplo, una variante de adenilato kinasa en la que se han eliminado 25 residuos internos es tan estable térmicamente como la proteína salvaje y retiene el 7 % de su actividad enzimática [139]. De la ribonucleasa H fueron eliminados 81 residuos generando un *core* de 74 residuos con información suficiente para su correcto plegado [140]. Un fragmento C-terminal de la termolisina, que comprende solo el 20 % de la secuencia, posee estructura terciaria nativa [141]. Del mismo modo, han sido preparadas una mini mioglobina con estructura helicoidal nativa por CD [142, 143] y una mini barnasa (residuos 1-25, 52-110) con plegado cooperativo y en dos estados (nativo↔desplegado) tal

como lo muestran experimentos de CD, RMN y equilibrio de desplegado [144, 145]. El caso de la barnasa ha sido estudiado en forma detallada y su organización modular también ha sido investigada mediante dinámica molecular [146]. Una variante en la que se han eliminado 15 residuos de su extremo C-terminal (el 13.6 % de la secuencia) posee características generales nativas determinadas por fluorescencia, CD y RMN y reacción de desplegado cooperativa [124]. También pudo observarse un proceso de desplegado cooperativo y estructura nativa en el caso de una variante en la que se eliminaron 23 residuos (21 %) de su extremo N-terminal (hélice α_1) [147]. A esta altura es importante resaltar que en conjunto en el caso de la barnasa se ha eliminado en etapas por lo menos el 58 % de la secuencia sin afectar drásticamente la formación de estructura nativa.

Un fragmento pequeño (residuos 2-66) en el que se ha eliminado el 40 % de la secuencia del represor Trp exhibe desnaturalización térmica en tres estados con un intermediario dímérico, revelando que este fragmento conserva la capacidad de plegarse en un dímero con estructura nativa.

Otro ejemplo de interés es el de la variante de la IFABP (17-SG) en la que se ha sustituido la hélice α de 16 residuos (residuos 15-31) por el dipéptido Ser-Gly y a pesar de esto alcanza un estado nativo. Los espectros de RMN bidimensionales de 17-SG revelaron patrones muy similares a los observados para la variante salvaje de IFABP, excepto por la ausencia selectiva de resonancias e interacciones asignadas a la parte helicoidal [148, 149].

Los 20 residuos N-terminales de la ferredoxina I forman un *beta-hairpin* en el contexto nativo pero las interacciones nativas locales no son capaces de estabilizar la estructura plegada del péptido en solución (CD, RMN). En este caso el agregado de bajas concentraciones de cosolventes orgánicos promueve la formación del *beta-hairpin* nativo

sugiriendo una propensión intrínseca del péptido a formar esta estructura. La estructura del péptido aislado, incluyendo el registro de interacciones puentes de hidrógeno intercatenario parece entonces estar enteramente codificado en la secuencia local de aminoácidos [150].

Cabe destacar que la eliminación de secuencia no ha sido la única estrategia para estudiar el contenido de información para el plegado de la cadena polipeptídica. Baker y colaboradores pudieron obtener el dominio SH3 nativo reduciendo de veinte a sólo cinco los tipos de cadena lateral que lo conforman indicando que las interacciones que estabilizan el estado nativo inducen una superficie de energía libre del embudo conformacional que alcanza como guía para que la cadena adquiera su conformación correcta [151, 152].

No se puede dejar de reconocer que, existen numerosos casos donde la eliminación de secuencia impide el plegado. Ello ocurre con algunos fragmentos de la barnasa (por ejemplo: residuos 37-110) y con una variante de IFABP Δ 3 en la que la eliminación de los últimos tres residuos (129-131), rinde un *molten globule* [86]. La eliminación de la hélice C-terminal de la apoflavodoxina genera un *molten globule* sin interacciones terciarias bien definidas pero estabilizado cooperativamente [153]. La variante de β -lactamasa ES- β L^{CA19} (producida y estudiada en este trabajo de Tesis) se agrega a la lista. Además, cabe contabilizar diversas variantes de DHFR (dihidrofolato reductasa) [154] y la mayor parte de los fragmentos del inhibidor CI2 (la familia completa de fragmentos de CI2 y sus características estructurales han sido descriptas en las referencias [155-159]).

Es razonable pensar que en muchos de estos casos en los que no se alcanza la estructura nativa, se esté eliminando información esencial para la adquisición de la topología y la estructura 3D. En general, esta ha sido la interpretación. Alternativamente, la información necesaria podría estar disponible, pero algún bloque o módulo podría participar ahora, en el

nuevo escenario (más rugoso y con trampas), de interacciones no nativas [62], llevando a la mayor parte de las moléculas a adquirir estructura parcial y ‘estancarse’ en conformaciones alternativas.

En algunos de los casos mencionados anteriormente no puede ser descartada totalmente la adquisición de estructura nativa en un porcentaje bajo de las moléculas que escaparía a los niveles de detección. De hecho una de las razones en la elección de ES-βL como modelo en el presente trabajo fue la capacidad para detectar fracciones muy pequeñas (menores al 0.5 %) de moléculas en estado nativo o quasi nativo por medición de su actividad enzimática.

Un mecanismo general de ensamblado de la matriz proteica

Los ejemplos y los resultados presentados aquí, sugieren un escenario en el que la estructura 3D está codificada principalmente por información conformacional local.

El mecanismo propuesto está basado en el concepto de subdominios o módulos (compartimentalización de la información) capaces de adquirir estructura nativa independientemente, concepto que ha sido propuesto anteriormente y de maneras muy distintas (Capítulo I). Estos módulos han recibido diversos nombres: ‘unidades de plegado autónomo’ (*AFUs*) [55], ‘unidades hidrofóbicas de plegado’, los ‘*building blocks*’ [61, 62], ‘*clusters* rígidos’ [160], ‘*Foldons* o unidades independientes de plegado’ [56], etc. Para su identificación se han utilizado distintos criterios: grado de compactación, hidrofobicidad, contactos entre residuos dentro del fragmento, fracción de área no polar oculta, densidad de puentes de hidrógeno y energías de VDW.

El plegado quedaría determinado por la complementariedad de las superficies generadas por estos bloques de topología nativa y las leyes de *binding* entre bloques determinarían la formación de unidades autónomas y luego de dominios. La estructura de unos, en general, no sería inductora de estructura en los otros, sino que ambas estructuras preexistentes podrían estabilizarse definitivamente con la formación de una estructura de mayor jerarquía como una unidad autónoma de plegado. Un concepto similar fue introducido con el modelo de Martín Karplus y David L. Weaver (*Diffusion-Collision*). Los resultados y conclusiones presentados en este trabajo de tesis sugieren módulos con estructura y topología nativa en equilibrio con formas desplegadas y *clusters* de interacciones no nativas. Si esto es así, se requeriría sólo un mínimo de transmisión de información entre módulos. Conceptualmente, esta visión es opuesta al modelo de ajuste inducido, en el que para producir la complementariedad de superficies se requiere información de un módulo sobre otro. La observación de que gran parte de la secuencia puede ser eliminada sin afectar la estructura 3D final tiende a reducir al mínimo la posibilidad de cambios concertados entre las distintas partes de la molécula para producir la estructura final.

El mecanismo es suficientemente robusto porque las interacciones de largo alcance serían consecuencia de un proceso de unión, y no el requisito para la formación de estructura 3D. Por otra parte los módulos podrían ubicarse en el lugar adecuado siguiendo vías alternativas. La eliminación al azar de un módulo, en una parte importante de los casos, no impediría la unión del resto. Esto no debe llevar a sobresimplificaciones y a descartar la existencia de algunos bloques críticos en el sentido en que fueron definidos por Kumar y colaboradores [62]. Esos bloques podrían ser críticos por sus relaciones topológicas con otros (por ejemplo: aquellos que interaccionan con muchos otros simultáneamente).

La eliminación de un bloque crítico podría frustrar el plegado (trampas cinéticas, impedimento topológico, etc.) y esto podría explicar porqué muchas variantes acortadas de proteínas no logran acceder al estado nativo (primer caso). Sin embargo, el mismo comportamiento podría observarse después de la eliminación de elementos no críticos si la estructura resultante estuviera significativamente desestabilizada (segundo caso).

La diferencia fundamental entre los dos casos presentados arriba es que el segundo representa estructuras que poseen la información mínima para plegarse correctamente y lo harían de introducirse mutaciones compensatorias, o si el solvente es modificado para estabilizar el estado nativo o para desestabilizar algún estado parcialmente plegado. Un ejemplo paradigmático es el fragmento 1-103 de la nucleasa de *S. aureus* forma espontáneamente un *molten globule*. Ciertas mutaciones en este fragmento remueven el defecto de plegado y le permiten arribar a una estructura 3D estable [161]. Asimismo, en presencia de Ca^{2+} y de un inhibidor análogo del sustrato, aún el fragmento salvaje adopta una conformación 3D nativa. Un caso similar ocurre con la variante corta de la cloranfenicol acetiltransferasa en la que se han eliminado residuos de su extremo C-terminal: una mutación supresora y estabilizadora corrige defectos en el plegado y conduce a la formación de estructura nativa [162].

Información topológica localmente codificada

El carácter local de la información topológica para el plegado ha sido estudiado en pequeños péptidos, un ejemplo es el péptido AAGDYY-NH₂, que forma un *beta-turn* en su contexto nativo (en el inhibidor de la β -lactamasa TEM1) pero también forma dicha estructura libre, en solución (caracterizado por CD, FT-IR, RMN) [163]. Del mismo modo, un péptido de 24 residuos (64-88) que forma parte de la proteína celular de unión a ácido

retinóico (CRABP I) también adopta en solución acuosa estructura nativa [164]. Asimismo, el análisis computacional sistemático de conformaciones de hexapéptidos de IFABP mostró que existen regiones con alta tendencia a adquirir estructura 3D local nativa en el estado desplegado [3]. La importancia de las interacciones locales también ha sido estudiado en elementos transplantados de un entorno 3D a otros entornos proteicos [165] y por ingeniería de motivos estructurales [166]. Los estados desplegados también podrían conservar localmente una parte de la topología nativa tal como lo muestran los experimentos de RMN de baja resolución realizados por Shortle y colaboradores con la nucleasa, en los que se conserva topología nativa en urea, 8 M. En este caso, los autores concluyen que “la estructura en proteínas desplegadas está codificada primariamente por interacciones locales (estéricas) entre cadenas laterales y el esqueleto del polipéptido” [119]. Los experimentos computacionales de dinámica molecular del estado desplegado realizados por Wong y colaboradores, con la barnasa, también señalan la presencia de estructura secundaria y terciaria residual y fluctuante. Una gran parte de la cadena está desestructurada pero las regiones estructuradas reducen notablemente el espacio de conformaciones accesible por la cadena polipeptídica [4]. La presencia de estructura en el microentorno de triptofano en la espectrina, en condiciones fuertemente desnaturizantes, [167] y la persistencia de señales de CD en el UV cercano en el estado desplegado por urea de la IFABP (resultados no publicados de E. M. Clérico y M. R. Ermácora) también indican estructura terciaria residual fluctuante o *clusters* de residuos que podrían tener consecuencias en el proceso de plegado. El hecho de que ciertos fragmentos arriben a estados parcialmente plegados sin estructura terciaria fija pero cuenten con la información necesaria para formar un topómero, con volumen y gran parte de las características topológicas del estado nativo y otros fragmentos alcancen el estado nativo prueba el

carácter local de la información topológica [17], dicha búsqueda local podría, en algunos casos, estar asociada de alguna manera a un colapso del polipéptido que a su vez podría imponer restricciones tanto sobre la movilidad de las cadenas laterales como del *backbone*.

Inducción de topología por contexto


Hay evidencias experimentales de que, por lo menos en algunos casos, los determinantes de la estructura no estarían codificados localmente. Esto muestra nuevamente la complejidad del tema abordado. Un ejemplo es el *loop* GH de la proteína VP1 del virus aftosa, formado por los residuos Gly132 a Ser162. Este péptido no adquiere estructura apreciable en solución, el agregado de cosolventes no estabiliza su estructura nativa, sino una estructura alternativa. En este caso los determinantes estructurales estarían codificados en el contexto proteico, interacciones del *loop* con otras regiones de la macromolécula y no por la información local en la secuencia de aminoácidos del péptido [168]. La estructura del péptido también puede 'inducirse' mediante la interacción con anticuerpos. Las secuencias camaleón o ambivalentes son otro ejemplo de inducción de conformación por contexto [169]. Estas últimas adquieren estructura α o β , dependiendo de la estructura de la matriz proteica en la que se encuentran, sugiriendo que las interacciones terciarias de largo alcance son las determinantes de la estructura secundaria y de la topología de estos péptidos.

Nuevos experimentos

Del estudio del plegado de la β -lactamasa realizado en este trabajo de tesis se deduce en primera instancia su complejidad. Encontrar en trabajos futuros unidades autónomas de plegado en la lactamasa y estudiar el plegado de estos fragmentos podría ayudar a comprender su mecanismo de plegado. La RMN podría ser fundamental en este sentido [4, 124]. La asignación RMN de fragmentos de ES- β L y sus fragmentos permitirá estudiar la

dinámica del *backbone* y la existencia de interacciones nativas. Otras metodologías como la utilización de inteínas [170] podrían también ser valiosas para estudiar el plegado de un fragmento en diferentes contextos proteicos. También resulta muy atractiva la posibilidad de realizar complementación entre fragmentos [171-173] y estudiar aspectos cinéticos del proceso de asociación-plegado para cada fragmento. Estos experimentos pueden permitir la identificación de los determinantes del proceso de asociación y de la complementariedad de superficies de bloques en el proceso de plegado.

La eliminación de secuencias internas mediante permutación circular y acortamiento de la cadena polipeptídica generada en combinación con el estudio del estado desplegado y la dinámica molecular de fragmentos proteicos permitirá acumular pruebas sobre el tipo de distribución de información en la secuencia y tal vez, postular un mecanismo para el plegado proteico en general. En el laboratorio del director de esta tesis, se realizaron experimentos de este tipo. Existen ya más de veinte variantes cortas de β -lactamasa permutadas circularmente. La caracterización de estas variantes se ha iniciado recientemente y permitirá en el futuro identificar secuencias con alto contenido de información para el plegado [Gebhard y col., resultados no publicados].


JAVIER SANTOS



DR MARIO R. ERMACORA
PROFESOR TITULAR DE BIOQUÍMICA

RESUMEN

Las propiedades biológicas de las proteínas dependen de su estructura tridimensional (3D).

Hoy sabemos que el plegado proteico permite la conversión de la información existente en la secuencia de aminoácidos en información 3D, pero no sabemos cómo se lleva adelante este proceso. Tampoco se conoce la lógica con que se distribuye la información 3D en la secuencia y no existe una opinión unificada sobre el grado de estructura presente en los estados parcialmente plegados ni sobre el papel de estos últimos en el plegado proteico.

Sí existen algunas pruebas de que la información conformacional no estaría distribuida homogéneamente en la secuencia proteica. En una misma cadena polipeptídica existen fragmentos o bloques que pueden ser eliminados sin producir alteraciones en el plegado final, por lo que no formarían parte del conjunto de residuos determinantes de la estructura 3D nativa. Por el contrario, otros fragmentos aparentemente no pueden ser removidos sin abortar el proceso de plegado.

En este trabajo de tesis se utilizó a la β -lactamasa de *Bacillus licheniformis*, ES- β L como modelo experimental para estudiar el proceso de conversión de información 1D \rightarrow 3D e investigar la existencia de módulos de información para el plegado.

Se eligió a ES- β L como modelo principalmente porque a) la existencia de proteína correctamente plegada (nativa) es fácilmente detectable por actividad enzimática, aún en trazas; b) se conoce su estructura cristalográfica con gran resolución; c) no posee puentes disulfuro que compliquen adicionalmente el plegado; y d) ES- β L no es un modelo

excesivamente reduccionista: posee dos dominios y una topología medianamente intrincada.

Para caracterizar el modelo experimental se estudiaron aspectos generales de la estructura, el plegado, y estados intermediarios de ES- β L, tanto desde un punto de vista cinético como en el equilibrio. La estructura de formas parcialmente plegadas también se estudió a partir de experimentos de modificación química de cisteínas introducidas a tal fin en la cadena polipeptídica como sondas conformacionales.

El desplegamiento de ES- β L inducido por urea presentó más complejidad que el desplegamiento por GdmCl. En el primer caso, se detectaron por lo menos cuatro estados parcialmente plegados.

Inesperadamente, el reemplazo de Ser265→Cys265 tuvo consecuencias importantes para el plegado. El efecto desestabilizador de la mutación sobre los estados parcialmente plegados indicó que el residuo formaría parte de un módulo estructurado en dichos estados.

La observación de estados parcialmente plegados, curvas de desnaturalización no coincidentes, transiciones multifásicas, *cores* resistentes e intermediarios cinéticos es compatible con un mecanismo de ensamblado modular o plegado por partes de la β -lactamasa.

Por otra parte, en este trabajo se manipuló la secuencia de la proteína para estudiar la interdependencia de los niveles jerárquicos de estructura en el proceso de plegado.

Se evaluó el contenido de información para el plegado de ES- β L codificado por la hélice α C-terminal. Para estudiar el papel de esta hélice se prepararon y caracterizaron tres variantes de ES- β L acortadas, en nueve, catorce y diecinueve residuos desde el C-terminal,

ES- β L^{CA9}, ES- β L^{CA14} y ES- β L^{CA19}, respectivamente. Los lisados de bacterias expresando ES- β L^{CA19} no presentaron actividad β -lactamasa. Por el contrario, dicha actividad sí fue detectada en lisados conteniendo tanto ES- β L^{CA9} como ES- β L^{CA14}, demostrando de manera preliminar que una fracción de estas moléculas, puede adquirir estructura nativa.

La caracterización rigurosa de ES- β L^{CA9} permitió demostrar que la secuencia de residuos eliminada tiene un rol en el mecanismo de plegado pero que su ausencia no impide la formación de estructura 3D nativa.

También se caracterizó en detalle I_p ES- β L^{CA9}, un estado parcialmente plegado, que está conectado con la forma nativa de ES- β L^{CA9}. I_p ES- β L^{CA9} sólo posee estructura secundaria residual, pero es muy compacto. Posee las características de un glóbulo fundido y puede estabilizarse formando un dímero.

La eliminación de los residuos 287-295 afecta dramáticamente la velocidad de replegado de la β -lactamasa: ES- β L^{CA9} se pliega 10⁴ veces más lentamente que ES- β L.

A partir del estudio termodinámico y cinético de ES- β L^{CA9} se concluyó que los residuos eliminados proveen información para formar estructura secundaria, evitar trampas cinéticas y asociación errónea de unidades de plegado, acelerar el pasaje a través del estado de transición y estabilizar al estado nativo.

Los resultados obtenidos con la β -lactamasa se compararon con otros datos de literatura referidos a proteínas que a pesar de carecer de partes de su secuencia alcanzan un plegado nativo. El conjunto de las evidencias experimentales parece sugerir que la cadena polipeptídica tiende a plegarse guiada principalmente por información local en la secuencia. Las interacciones entre residuos alejados secuencialmente jugarían un papel secundario en

el proceso de plegado y aparecerían posteriormente, luego de que la cadena polipeptídica adopte el recorrido espacial apropiado.

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

| Figura | Página | Figura | Página | Figura | Página |
|---------|--------|---------|--------|---------|--------|
| 1..... | 12 | 20..... | 100 | 39..... | 142 |
| 2..... | 17 | 21..... | 101 | 40..... | 144 |
| 3..... | 21 | 22..... | 103 | 41..... | 145 |
| 4..... | 24 | 23..... | 108 | 42..... | 147 |
| 5..... | 32 | 24..... | 109 | 43..... | 148 |
| 6..... | 36 | 25..... | 110 | 44..... | 149 |
| 7..... | 40 | 26..... | 111 | 45..... | 151 |
| 8..... | 44 | 27..... | 112 | 46..... | 152 |
| 9..... | 49 | 28..... | 114 | 47..... | 154 |
| 10..... | 63 | 29..... | 115 | 48..... | 155 |
| 11..... | 83 | 30..... | 116 | 49..... | 159 |
| 12..... | 85 | 31..... | 123 | 50..... | 163 |
| 13..... | 86 | 32..... | 124 | 51..... | 164 |
| 14..... | 87 | 33..... | 125 | 52..... | 165 |
| 15..... | 89 | 34..... | 131 | 53..... | 167 |
| 16..... | 91 | 35..... | 132 | 54..... | 168 |
| 17..... | 94 | 36..... | 135 | 55..... | 171 |
| 18..... | 95 | 37..... | 138 | 56..... | 175 |
| 19..... | 97 | 38..... | 140 | 57..... | 176 |

| Tabla | Página |
|---------|--------|
| 1..... | 46 |
| 2..... | 60 |
| 3..... | 64 |
| 4..... | 96 |
| 5..... | 104 |
| 6..... | 107 |
| 7..... | 133 |
| 8..... | 139 |
| 9..... | 158 |
| 10..... | 160 |

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] C. B. Anfinsen, "Principles that govern the folding of protein chains.," *Science*, vol. 181, pag. 223-230, 1973.
- [2] W. Y. Choy, D. Shortle, and L. E. Kay, "Side chain dynamics in unfolded protein states: an NMR based ^2H spin relaxation study of $\delta^{13}\text{C}$," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 125, pag. 1748-58, 2003.
- [3] G. V. Nikiforovich and C. Frieden, "The search for local native-like nucleation centers in the unfolded state of β -sheet proteins.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, pag. 10388-93, 2002.
- [4] K. B. Wong, J. Clarke, C. J. Bond, J. L. Neira, S. M. Freund, A. R. Fersht, and V. Daggett, "Towards a complete description of the structural and dynamic properties of the denatured state of barnase and the role of residual structure in folding.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 296, pag. 1257-82, 2000.
- [5] Y. V. Griko, P. L. Privalov, J. M. Sturtevant, and V. V. Vedenkov, "Cold denaturation of staphylococcal nuclease.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 85, pag. 3343-7, 1988.
- [6] P. L. Privalov, "Cold denaturation of proteins.," *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 25, pag. 281-305, 1990.
- [7] P. L. Privalov, Y. V. Griko, V. V. Vedenkov, and V. P. Kutysenko, "Cold denaturation of myoglobin.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 190, pag. 487-98, 1986.
- [8] P. L. Privalov and G. I. Makhatadze, "Contribution of hydration to protein folding thermodynamics. II. The entropy and Gibbs energy of hydration.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 232, pag. 660-79, 1993.
- [9] P. L. Privalov and G. I. Makhatadze, "Heat capacity of proteins. II. Partial molar heat capacity of the unfolded polypeptide chain of proteins: protein unfolding effects.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 213, pag. 385-91, 1990.

- [10] G. I. Makhatadze and P. L. Privalov, "Hydration effects in protein unfolding.," *Biophysical Chemistry*, vol. 51, pag. 291-304; discussion 304-9, 1994.
- [11] G. I. Makhatadze and P. L. Privalov, "Contribution of hydration to protein folding thermodynamics. I. The enthalpy of hydration.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 232, pag. 639-59, 1993.
- [12] G. I. Makhatadze and P. L. Privalov, "Heat capacity of proteins. I. Partial molar heat capacity of individual amino acid residues in aqueous solution: hydration effect.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 213, pag. 375-84, 1990.
- [13] A. K. Chamberlain and S. Marqusee, "Comparison of equilibrium and kinetic approaches for determining protein folding mechanisms.," *Advances in Protein Chemistry*, vol. 53, pag. 283-328, 2000.
- [14] G. V. Semisotnov, N. A. Rodionova, O. I. Razgulyaev, V. N. Uversky, A. F. Gripas, and R. I. Gilmanshin, "Study of the "molten globule" intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe.," *Biopolymers*, vol. 31, pag. 119-28, 1991.
- [15] D. Eliezer, P. A. Jennings, H. J. Dyson, and P. E. Wright, "Populating the equilibrium molten globule state of apomyoglobin under conditions suitable for structural characterization by NMR.," *Febs Letters*, vol. 417, pag. 92-6, 1997.
- [16] A. T. Alexandrescu, P. A. Evans, M. Pitkeathly, J. Baum, and C. M. Dobson, "Structure and dynamics of the acid-denatured molten globule state of alpha-lactalbumin: a two-dimensional NMR study.," *Biochemistry*, vol. 32, pag. 1707-18, 1993.
- [17] M. Ermácora, D. Ledman, and R. Fox, "Mapping the structure of a non-native state of staphylococcal nuclease," *Nature Structural Biology*, vol. 3, pag. 59-66., 1996.
- [18] S. Uhrinova, D. Uhrin, H. Denton, M. Smith, L. Sawyer, and P. N. Barlow, "Complete assignment of ¹H, ¹³C and ¹⁵N chemical shifts for bovine beta-lactoglobulin: secondary structure and topology of the native state is retained in a partially unfolded form.," *Journal of Biomolecular Nmr*, vol. 12, pag. 89-107, 1998.
- [19] A. Matouschek and A. R. Fersht, "Application of physical organic chemistry to engineered mutants of proteins: Hammond postulate behavior in the transition state

- of protein folding.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 90, pag. 7814-8, 1993.
- [20] A. R. Fersht, A. Matouschek, and L. Serrano, "The folding of an enzyme. I. Theory of protein engineering analysis of stability and pathway of protein folding.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 224, pag. 771-82, 1992.
- [21] C. Levinthal, "Molecular model-building by computer.," *Scientific American*, vol. 214, pag. 42-52, 1966.
- [22] C. Levinthal, "Are there pathways for protein folding?," *J. Chem. Phys.*, vol. 65, pag. 44-45, 1968.
- [23] M. Karplus and D. L. Weaver, "Protein-folding dynamics.," *Nature*, vol. 260, pag. 404-6, 1976.
- [24] M. Karplus and D. L. Weaver, "Protein folding dynamics: the diffusion-collision model and experimental data.," *Protein Science : a Publication of the Protein Society*, vol. 3, pag. 650-68, 1994.
- [25] M. F. Jeng, S. W. Englander, G. A. Elove, A. J. Wand, and H. Roder, "Structural description of acid-denatured cytochrome c by hydrogen exchange and 2D NMR.," *Biochemistry*, vol. 29, pag. 10433-7, 1990.
- [26] M. F. Jeng and S. W. Englander, "Stable submolecular folding units in a non-compact form of cytochrome c.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 221, pag. 1045-61, 1991.
- [27] L. Serrano, A. Matouschek, and A. R. Fersht, "The folding of an enzyme VI. The folding pathway of barnase: comparison with theoretical models.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 224, pag. 847-59, 1992.
- [28] A. Miranker, S. E. Radford, M. Karplus, and C. M. Dobson, "Demonstration by NMR of folding domains in lysozyme.," *Nature*, vol. 349, pag. 633-6, 1991.
- [29] K. Kuwajima, Y. Hiraoka, M. Ikeguchi, and S. Sugai, "Comparison of the transient folding intermediates in lysozyme and alpha-lactalbumin.," *Biochemistry*, vol. 24, pag. 874-81, 1985.
- [30] F. E. Cohen, T. J. Richmond, and F. M. Richards, "Protein folding: evaluation of some simple rules for the assembly of helices into tertiary structures with

- myoglobin as an example.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 132, pag. 275-88, 1979.
- [31] I. Nesselova, A. Krushelnitsky, D. Idiyatullin, F. Blanco, M. Ramirez_Alvarado, V. A. Daragan, L. Serrano, and K. H. Mayo, "Conformational exchange on the microsecond time scale in alpha-helix and beta-hairpin peptides measured by ¹³C NMR transverse relaxation.," *Biochemistry*, vol. 40, pag. 2844-53, 2001.
- [32] E. Carrey and P. RH, "Conformation of a Stable Intermediate on The Folding Pathway of Staphylococcus aureus Penicillinase," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 533, pag. 12-22, 1978.
- [33] V. N. Uversky and O. B. Ptitsyn, "'Partly folded" state, a new equilibrium state of protein molecules: four-state guanidinium chloride-induced unfolding of beta-lactamase at low temperature.," *Biochemistry*, vol. 33, pag. 2782-91, 1994.
- [34] V. N. Uversky, "Use of fast protein size-exclusion liquid chromatography to study the unfolding of proteins which denature through the molten globule.," *Biochemistry*, vol. 32, pag. 13288-98, 1993.
- [35] L. F. McCoy, E. S. Rowe, and K. P. Wong, "Multiparameter kinetic study on the unfolding and refolding of bovine carbonic anhydrase B.," *Biochemistry*, vol. 19, pag. 4738-43, 1980.
- [36] G. V. Semisotnov, N. A. Rodionova, V. P. Kutysenko, B. Ebert, J. Blanck, and O. B. Ptitsyn, "Sequential mechanism of refolding of carbonic anhydrase B.," *Febs Letters*, vol. 224, pag. 9-13, 1987.
- [37] J. B. Udgaonkar and R. L. Baldwin, "Early folding intermediate of ribonuclease A.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, pag. 8197-201, 1990.
- [38] P. Varley, A. M. Gronenborn, H. Christensen, P. T. Wingfield, R. H. Pain, and G. M. Clore, "Kinetics of folding of the all-beta sheet protein interleukin-1 beta.," *Science*, vol. 260, pag. 1110-3, 1993.
- [39] S. C. Harrison and R. Durbin, "Is there a single pathway for the folding of a polypeptide chain?," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 82, pag. 4028-30, 1985.

- [40] K. W. Plaxco, I. S. Millett, D. J. Segel, S. Doniach, and D. Baker, "Chain collapse can occur concomitantly with the rate-limiting step in protein folding.," *Nature Structural Biology*, vol. 6, pag. 554-6, 1999.
- [41] A. R. Fersht, "Transition-state structure as a unifying basis in protein-folding mechanisms: contact order, chain topology, stability, and the extended nucleus mechanism.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, pag. 1525-9, 2000.
- [42] A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science : A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. New York, 1999.
- [43] K. A. Dill, S. Bromberg, K. Yue, K. M. Fiebig, D. P. Yee, P. D. Thomas, and H. S. Chan, "Principles of protein folding, a perspective from simple exact models." *Protein Science : a Publication of the Protein Society*, vol. 4, pag. 561-602, 1995.
- [44] K. A. Dill and H. S. Chan, "From Levinthal to pathways to funnels.," *Nature Structural Biology*, vol. 4, pag. 10-9, 1997.
- [45] T. Pascher, J. P. Chesick, J. R. Winkler, and H. B. Gray, "Protein folding triggered by electron transfer.," *Science*, vol. 271, pag. 1558-60, 1996.
- [46] G. A. Mines, T. Pascher, S. C. Lee, J. R. Winkler, and H. B. Gray, "Cytochrome c folding triggered by electron transfer.," *Chemistry & Biology*, vol. 3, pag. 491-7, 1996.
- [47] J. Ervin, J. Sabelko, and M. Gruebele, "Submicrosecond real-time fluorescence sampling: application to protein folding.," *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, vol. 54, pag. 1-15, 2000.
- [48] P. Wolynes, Z. Luthey Schulten, and J. Onuchic, "Fast-folding experiments and the topography of protein folding energy landscapes.," *Chemistry & Biology*, vol. 3, pag. 425-32, 1996.
- [49] L. Li and E. I. Shakhnovich, "Different circular permutations produced different folding nuclei in proteins: a computational study.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 306, pag. 121-32, 2001.
- [50] J. Gsponer and A. Caflisch, "Role of native topology investigated by multiple unfolding simulations of four SH3 domains.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 309, pag. 285-98, 2001.

- [51] M. Lindberg, J. Tangrot, and M. Oliveberg, "Complete change of the protein folding transition state upon circular permutation.," *Nature Structural Biology*, vol. 9, pag. 818-22, 2002.
- [52] J. N. Onuchic, N. D. Socci, Z. Luthey_Schulten, and P. G. Wolynes, "Protein folding funnels: the nature of the transition state ensemble.," *Folding & Design*, vol. 1, pag. 441-50, 1996.
- [53] D. B. Wetlaufer, "Nucleation, rapid folding, and globular intrachain regions in proteins.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 70, pag. 697-701, 1973.
- [54] D. B. Wetlaufer, "Folding of protein fragments.," *Advances in Protein Chemistry*, vol. 34, pag. 61-92, 1981.
- [55] K. F. Fischer and S. Marqusee, "A rapid test for identification of autonomous folding units in proteins," *Journal of Molecular Biology* vol. 302, pag. 701-12, 2000.
- [56] A. R. Panchenko, Z. Luthey Schulten, and P. G. Wolynes, "Foldons, protein structural modules, and exons.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, pag. 2008-13, 1996.
- [57] A. R. Panchenko, Z. Luthey Schulten, R. Cole, and P. G. Wolynes, "The foldon universe: a survey of structural similarity and self-recognition of independently folding units.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 272, pag. 95-105, 1997.
- [58] D. Dalzoppo, C. Vita, and A. Fontana, "Folding of thermolysin fragments. Identification of the minimum size of a carboxyl-terminal fragment that can fold into a stable native-like structure.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 182, pag. 331-40, 1985.
- [59] C. Vita, D. Dalzoppo, A. Fontana, and A. A. Rashin, "Independent folding of the carboxyl-terminal fragment 228-316 of thermolysin.," *Biochemistry*, vol. 23, pag. 5512-9, 1984.
- [60] C. J. Tsai and R. Nussinov, "Hydrophobic folding units derived from dissimilar monomer structures and their interactions.," *Protein Science : a Publication of the Protein Society*, vol. 6, pag. 24-42, 1997.

- [61] C. J. Tsai, J. V. Maizel, Jr., and R. Nussinov, "Anatomy of protein structures: visualizing how a one dimensional protein chain folds into a three dimensional shape," , R. Durbin, "Is there a single pathway for the folding of a polypeptide chain?," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, pag. 12038-43, 2000.
- [62] S. Kumar, Y. Y. Sham, C. J. Tsai, and R. Nussinov, "Protein folding and function: the N terminal fragment in adenylate kinase," *Biophys. J.* vol. 80, pag. 2439-54, 2001.
- [63] R. P. Ambler, "The structure of beta-lactamases.," *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, vol. 289, pag. 321-31, 1980.
- [64] S. D. Goldberg, W. Iannuccilli, T. Nguyen, J. Ju, and V. W. Cornish, "Identification of residues critical for catalysis in a class C beta-lactamase by combinatorial scanning mutagenesis.," *Protein Science : a Publication of the Protein Society*, vol. 12, pag. 1633-45, 2003.
- [65] J. Petrosino, C. Cantu, and T. Palzkill, "beta-Lactamases: protein evolution in real time.," *Trends in Microbiology*, vol. 6, pag. 323-7, 1998.
- [66] V. Sideraki, W. Huang, T. Palzkill, and H. F. Gilbert, "A secondary drug resistance mutation of TEM-1 beta-lactamase that suppresses misfolding and aggregation.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, pag. 283-8, 2001.
- [67] S. Banerjee, U. Pieper, G. Kapadia, L. K. Pannell, and O. Herzberg, "Role of the omega-loop in the activity, substrate specificity, and structure of class A beta-lactamase.," *Biochemistry*, vol. 37, pag. 3286-96, 1998.
- [68] E. Fonze, M. Vanhove, G. Dive, E. Sauvage, J. M. Frere, and P. Charlier, "Crystal structures of the *Bacillus licheniformis* BS3 class A beta-lactamase and of the acyl-enzyme adduct formed with cefoxitin.," *Biochemistry*, vol. 41, pag. 1877-85, 2002.
- [69] O. B. Ptitsyn, R. H. Pain, G. V. Semisotnov, E. Zerovnik, and O. I. Razgulyaev, "Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding.," *Febs Letters*, vol. 262, pag. 20-4, 1990.

- [70] Y. Goto and A. L. Fink, "Conformational states of beta-lactamase: molten-globule states at acidic and alkaline pH with high salt.," *Biochemistry*, vol. 28, pag. 945-52, 1989.
- [71] L. J. Calciano, W. A. Escobar, G. L. Millhauser, S. M. Miick, J. Rubaloff, A. P. Todd, and A. L. Fink, "Side-chain mobility of the beta-lactamase A state probed by electron spin resonance spectroscopy," *Biochemistry*, vol. 32, pag. 5644-9, 1993.
- [72] P. Gervasoni, W. Staudenmann, P. James, and A. Pluckthun, "Identification of the binding surface on beta-lactamase for GroEL by limited proteolysis and MALDI-mass spectrometry.," *Biochemistry*, vol. 37, pag. 11660-9, 1998.
- [73] S. Park, G. Liu, T. B. Topping, W. H. Cover, and L. L. Randall, "Modulation of folding pathways of exported proteins by the leader sequence.," *Science*, vol. 239, pag. 1033-5, 1988.
- [74] H. Lee, S. W. Chi, M. Kang, K. Baek, and H. Kim, "Stability and folding of precursor and mature tryptophan-substituted ribose binding protein of *Escherichia coli*.," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 328, pag. 78-84, 1996.
- [75] R. Zahn, S. E. Axmann, K. P. Rucknagel, E. Jaeger, A. A. Laminet, and A. Pluckthun, "Thermodynamic partitioning model for hydrophobic binding of polypeptides by GroEL. I. GroEL recognizes the signal sequences of beta-lactamase precursor.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 242, pag. 150-64, 1994.
- [76] R. Zahn and A. Plückthun, "Thermodynamic partitioning model for hydrophobic binding of polypeptides by GroEL. II. GroEL recognizes thermally unfolded mature beta-lactamase," *Journal Of Molecular Biology*, vol. 242, pag. 165-74, 1994.
- [77] R. P. Ambler and R. J. Meadway, "Chemical structure of bacterial penicillinases.," *Nature*, vol. 221, pag. 24-6, 1969.
- [78] J. O. Lampen, J. B. Nielsen, K. Izui, and M. P. Caulfield, "Bacillus licheniformis beta-lactamases: multiple forms and their roles.," *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, vol. 289, pag. 345-8, 1980.
- [79] K. Izui, J. B. Nielsen, M. P. Caulfield, and J. O. Lampen, "Large exopenicillinase, initial extracellular form detected in cultures of *Bacillus licheniformis*.," *Biochemistry*, vol. 19, pag. 1882-6, 1980.

- [80] J. B. Nielsen, K. Izui, M. P. Caulfield, and J. O. Lampen, "Secretion and processing of a precursor to the usual exopenicillinase of *Bacillus licheniformis* 749/C.," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 343, pag. 447, 1980.
- [81] M. C. Frate, E. J. Lietz, J. Santos, J. P. Rossi, A. L. Fink, and M. R. Ermacora, "Export and folding of signal-sequenceless *Bacillus licheniformis* beta-lactamase in *Escherichia coli*," *European Journal of Biochemistry*, vol. 267, pag. 3836-47, 2000.
- [82] M. E. Bayer, M. H. Bayer, C. A. Lunn, and V. Pigiet, "Association of thioredoxin with the inner membrane and adhesion sites in *Escherichia coli*," *Journal of Bacteriology*, vol. 169, pag. 2659-66, 1987.
- [83] A. el Yaagoubi, M. Kohiyama, and G. Richarme, "Localization of DnaK (chaperone 70) from *Escherichia coli* in an osmotic-shock-sensitive compartment of the cytoplasm.," *Journal of Bacteriology*, vol. 176, pag. 7074-8, 1994.
- [84] Y. R. Thorstenson, Y. Zhang, P. S. Olson, and D. Mascarenhas, "Leaderless polypeptides efficiently extracted from whole cells by osmotic shock.," *Journal of Bacteriology*, vol. 179, pag. 5333-9, 1997.
- [85] J. R. Knox and P. C. Moews, "Beta-lactamase of *Bacillus licheniformis* 749/C. Refinement at 2 Å resolution and analysis of hydration.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 220, pag. 435-55, 1991.
- [86] E. M. Clerico, S. G. Peisajovich, M. Ceolin, P. D. Ghiringhelli, and M. R. Ermacora, "Engineering a compact non-native state of intestinal fatty acid-binding protein," *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1476, pag. 203-18, 2000.
- [87] H. Schägger and G. von Jagow, "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa," *Analytical Biochemistry*, vol. 166, pag. 368-79, 1987.
- [88] J. M. Walker, "Nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis of proteins," in *The protein protocols handbook*, J. M. Walker, Ed. New Jersey: Human Press, 1996, pag. 51-54.
- [89] S. Gill and P. von Hippel, "Calculation of Protein extinction coefficients from Amino Acid Sequence Data," *Analytical Biochemistry*, vol. 182, pag. 319-326, 1989.

- [90] F. M. Richards, "Areas, volumes, packing and protein structure.," *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, vol. 6, pag. 151-76, 1977.
- [91] F. M. Richards, "Calculation of molecular volumes and areas for structures of known geometry.," *Methods in Enzymology*, vol. 115, pag. 440-64, 1985.
- [92] P. W. Riddles, R. L. Blakeley, and B. Zerner, "Reassessment of Ellman's reagent.," *Methods in Enzymology*, vol. 91, pag. 49-60, 1983.
- [93] R. M. Silverstein, "The determination of the molar extinction coefficient of reduced DTNB.," *Analytical Biochemistry*, vol. 63, pag. 281-2, 1975.
- [94] N. Jiang and C. Frieden, "Intestinal fatty acid binding protein: characterization of mutant proteins containing inserted cysteine residues.," *Biochemistry*, vol. 32, pag. 11015-21, 1993.
- [95] W. W. Cleland, "Diithiothreitol, a New Protective Reagent for SH Groups," *Biochemistry*, vol. 3, pag. 480-482, 1964.
- [96] J. A. T. Jansson, "A direct spectrophotometric assay for penicillin β -lactamase (penicillinase)," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 99, pag. 171-172., 1965.
- [97] F. W. Studier and B. A. Moffatt, "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 189, pag. 113-30, 1986.
- [98] R. Higuchi, "Using PCR to engineer DNA," in *PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification*, H. A. Herlich, Ed. New York: Stockton Press, 1989, pag. 61-70.
- [99] J. F. Sambrook, E. F. and Maniatis, T., *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Lab, 1989.
- [100] T. H. Jessen, N. H. Komiyama, J. Tame, J. Pagnier, D. Shih, B. Luisi, G. Fermi, and K. Nagai, "Production of human hemoglobin in Escherichia coli using cleavable fusion protein expression vector.," *Methods in Enzymology*, vol. 231, pag. 347-64, 1994.
- [101] Y. Nozaki, "Determination of tryptophan, tyrosine, and phenylalanine by second derivative spectrophotometry," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 277, pag. 324-333., 1990.

- [102] E. M. Clerico and M. R. Ermacora, "Tryptophan mutants of intestinal fatty acid-binding protein: ultraviolet absorption and circular dichroism studies.," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 395, pag. 215-24, 2001.
- [103] G. D. Fasman, *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, Fasman, Brandeis University Walham, Massachusetts ed. New York and Londonb: Plenum Press New York and London, 1996.
- [104] W. H. Press, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling, and B. P. Flannery, *C The art of scientific computing*. New York: Cambridge University Press, 1992.
- [105] R. F. Chen, "Fluorescence quantum yield of tryptophan and tyrosine," *Anal. Lett.*, vol. 1, pag. 35-42, 1967.
- [106] E. Daniel and G. Weber, "Cooperative effects in binding by bovine serum albumin. I. The binding of 1-anilino-8-naphthalenesulfonate. Fluorimetric titrations.," *Biochemistry*, vol. 5, pag. 1893-1900, 1966.
- [107] M. M. Santoro and D. W. Bolen, "A test of the linear extrapolation of unfolding free energy changes over an extended denaturant concentration range.," *Biochemistry*, vol. 31, pag. 4901-7, 1992.
- [108] C.-J. Tsai, K. S., M. B., and N. R., "Folding Funnels, Binding Funnels, and Protein Function," *Protein Science*, pag. 1181-1190, 1999.
- [109] Y. Goto, L. J. Calciano, and A. L. Fink, "Acid-induced folding of proteins.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, pag. 573-7, 1990.
- [110] B. Robson and R. H. Pain, "The mechanism of folding of globular proteins. Equilibria and kinetics of conformational transitions of penicillinase from *Staphylococcus aureus* involving a state of intermediate conformation.," *The Biochemical Journal*, vol. 155, pag. 331-44, 1976.
- [111] D. Sarkar and C. DasGupta, "Characterization of a molten globule intermediate during GdnHCl-induced unfolding of RTEM beta-lactamase from *Escherichia coli*.," *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1296, pag. 85-94, 1996.
- [112] S. Vijayakumar, S. Vishveshwara, G. Ravishanker, and D. L. Beveridge, "Differential stability of beta-sheets and alpha-helices in beta-lactamase: a high

- temperature molecular dynamics study of unfolding intermediates.," *Biophysical Journal*, vol. 65, pag. 2304-12, 1993.
- [113] E. M. Clerico, "Estados parcialmente plegados de las proteínas: Estabilización por ingeniería genética de formas no nativas de la proteína intestinal transportadora de ácidos grasos," *Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires*, 2001.
- [114] S. Craig, M. Hollecker, T. E. Creighton, and R. H. Pain, "Single amino acid mutations block a late step in the folding of beta-lactamase from *Staphylococcus aureus*," *Journal of Molecular Biology*, vol. 185, pag. 681-7, 1985.
- [115] M. Vanhove, X. Raquet, T. Palzkill, R. H. Pain, and J. M. Frere, "The rate-limiting step in the folding of the cis-Pro167Thr mutant of TEM-1 beta-lactamase is the trans to cis isomerization of a non-proline peptide bond.," *Proteins*, vol. 25, pag. 104-11, 1996.
- [116] M. Vanhove, A. Lejeune, G. Guillaume, R. Virden, R. H. Pain, F. X. Schmid, and J. M. Frere, "A collapsed intermediate with nonnative packing of hydrophobic residues in the folding of TEM-1 beta-lactamase," *Biochemistry*, vol. 37, pag. 1941-50, 1998.
- [117] K. A. Wheeler, A. R. Hawkins, R. Pain, and R. Virden, "The slow step of folding of *Staphylococcus aureus* PC1 beta-lactamase involves the collapse of a surface loop rate limited by the trans to cis isomerization of a non-proline peptide bond.," *Proteins*, vol. 33, pag. 550-7, 1998.
- [118] C. Mitchinson and R. H. Pain, "Effects of sulphate and urea on the stability and reversible unfolding of beta-lactamase from *Staphylococcus aureus*. Implications for the folding pathway of beta-lactamase.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 184, pag. 331-42, 1985.
- [119] M. S. Ackerman and D. Shortle, "Robustness of the long-range structure in denatured staphylococcal nuclease to changes in amino acid sequence.," *Biochemistry*, vol. 41, pag. 13791-7, 2002.
- [120] A. I. Jewett, V. S. Pande, and K. W. Plaxco, "Cooperativity, smooth energy landscapes and the origins of topology-dependent protein folding rates.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 326, pag. 247-53, 2003.

- [121] M. M. Gromiha and S. Selvaraj, "Comparison between long-range interactions and contact order in determining the folding rate of two-state proteins: application of long-range order to folding rate prediction.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 310, pag. 27-32, 2001.
- [122] D. E. Makarov and K. W. Plaxco, "The topomer search model: A simple, quantitative theory of two-state protein folding kinetics.," *Protein Science : a Publication of the Protein Society*, vol. 12, pag. 17-26, 2003.
- [123] S. Miller, J. Janin, A. M. Lesk, and C. Chothia, "Interior and surface of monomeric proteins.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 196, pag. 641-56, 1987.
- [124] J. L. Neira and A. R. Fersht, "Exploring the folding funnel of a polypeptide chain by biophysical studies on protein fragments," *journal of molecular biology*, vol. 285, pag. 1309-33, 1999.
- [125] M. M. Gromiha and S. Selvaraj, "Importance of long-range interactions in protein folding.," *Biophysical Chemistry*, vol. 77, pag. 49-68, 1999.
- [126] P. C. Moews, J. R. Knox, O. Dideberg, P. Charlier, and J. M. Frere, "Beta-lactamase of *Bacillus licheniformis* 749/C at 2 Å resolution.," *Proteins*, vol. 7, pag. 156-71, 1990.
- [127] V. Munoz and L. Serrano, "Development of the multiple sequence approximation within the AGADIR model of alpha-helix formation: comparison with Zimm-Bragg and Lifson-Roig formalisms.," *Biopolymers*, vol. 41, pag. 495-509, 1997.
- [128] E. Lacroix, A. R. Viguera, and L. Serrano, "Elucidating the folding problem of alpha-helices: local motifs, long-range electrostatics, ionic-strength dependence and prediction of NMR parameters.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 284, pag. 173-91, 1998.
- [129] L. Shi, D. R. Palleros, and A. L. Fink, "Protein conformational changes induced by 1,1'-bis(4-anilino-5-naphthalenesulfonic acid): preferential binding to the molten globule of DnaK.," *Biochemistry*, vol. 33, pag. 7536-46, 1994.
- [130] J. K. Myers, C. N. Pace, and J. M. Scholtz, "Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding.," *Protein Science : a Publication of the Protein Society*, vol. 4, pag. 2138-48, 1995.

- [131] D. Xie and E. Freire, "Structure based prediction of protein folding intermediates.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 242, pag. 62-80, 1994.
- [132] J. Gomez, V. J. Hilser, D. Xie, and E. Freire, "The heat capacity of proteins.," *Proteins*, vol. 22, pag. 404-12, 1995.
- [133] T. P. Creamer, R. Srinivasan, and G. D. Rose, "Modeling unfolded states of peptides and proteins.," *Biochemistry*, vol. 34, pag. 16245-50, 1995.
- [134] T. P. Creamer, R. Srinivasan, and G. D. Rose, "Modeling unfolded states of proteins and peptides. II. Backbone solvent accessibility.," *Biochemistry*, vol. 36, pag. 2832-5, 1997.
- [135] M. Vanhove, X. Raquet, and J. M. Frere, "Investigation of the folding pathway of the TEM-1 beta-lactamase.," *Proteins*, vol. 22, pag. 110-8, 1995.
- [136] G. Georgiou, P. Valax, M. Ostermeier, and P. M. Horowitz, "Folding and aggregation of TEM beta-lactamase: analogies with the formation of inclusion bodies in Escherichia coli.," *Protein Science : a Publication of the Protein Society*, vol. 3, pag. 1953-60, 1994.
- [137] D. E. Otzen and M. Oliveberg, "Salt-induced detour through compact regions of the protein folding landscape," R. Durbin, "Is there a single pathway for the folding of a polypeptide chain?, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 96, pag. 11746-11751, 1999.
- [138] P. S. Kim and R. L. Baldwin, "Specific intermediates in the folding reaction of small proteins and the mechanism of protein folding," *Annual Review Biochemistry*, vol. 51, pag. 459-489, 1982.
- [139] T. Rose, M. Brune, A. Wittinghofer, K. Le Blay, W. K. Surewicz, H. H. Mantsch, O. Barzu, and A. M. Gilles, "Structural and catalytic properties of a deletion derivative (delta 133 157) of Escherichia coli adenylate kinase," *Journal of Biological Chemistry* vol. 266, pag. 10781-6, 1991.
- [140] A. K. Chamberlain, K. F. Fischer, D. Reardon, T. M. Handel, and A. S. Marqusee, "Folding of an isolated ribonuclease H core fragment," *Protein Science : Publication of the Protein Society*, vol. 8, pag. 2251-7, 1999.
- [141] M. Rico, M. A. Jimenez, C. Gonzalez, V. De Filippis, and A. Fontana, "NMR solution structure of the C terminal fragment 255 316 of thermolysin: a dimer

- formed by subunits having the native structure,” , *Biochemistry*, vol. 33, pag. 14834-47, 1994.
- [142] G. De Sanctis, G. Falcioni, F. Polizio, A. Desideri, B. Giardina, F. Ascoli, and M. Brunori, “Mini myoglobin: native like folding of the NO derivative” *Biochimica Et Biophysica Acta* vol. 1204, pag. 28-32, 1994.
- [143] G. De Sanctis, G. Falcioni, B. Giardina, F. Ascoli, and M. Brunori, “Mini myoglobin: preparation and reaction with oxygen and carbon monoxide” , *Journal of Molecular Biology*, vol. 188, pag. 73-6, 1986.
- [144] K. Takahashi, T. Noguti, H. Hojo, T. Ohkubo, and M. Go, “Conformational characterization of designed minibarnase,” *Biopolymers* vol. 58, pag. 260-7, 2001.
- [145] K. Takahashi, T. Noguti, H. Hojo, K. Yamauchi, M. Kinoshita, S. Aimoto, T. Ohkubo, and M. Go, “A mini protein designed by removing a module from barnase: molecular modeling and NMR measurements of the conformation,” *Protein Engineering* vol. 12, pag. 673-80, 1999.
- [146] K. Takahashi, M. Oohashi, T. Noguti, and M. Go, “Mechanical stability of compact modules of barnase,” *FEBS Letters* vol. 405, pag. 47-54, 1997.
- [147] J. L. Neira and A. R. Fersht, “Acquisition of native-like interactions in C-terminal fragments of barnase.,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 287, pag. 421-32, 1999.
- [148] K. Kim, D. P. Cistola, and C. Frieden, “Intestinal fatty acid-binding protein: the structure and stability of a helix-less variant,” *Biochemistry*, vol. 35, pag. 7553-8, 1996.
- [149] D. Cistola, K. Kim, H. Rogl, and C. Frieden, “Fatty acid interactions with a helix-less variant of intestinal fatty acid-binding protein,” *Biochemistry*, vol. 35, pag. 7559-65, 1996.
- [150] M. S. Searle, R. Zerella, D. H. Williams, and L. C. Packman, “Native-like beta-hairpin structure in an isolated fragment from ferredoxin: NMR and CD studies of solvent effects on the N-terminal 20 residues.,” *Protein Engineering*, vol. 9, pag. 559-65, 1996.
- [151] D. S. Riddle, J. V. Santiago, S. T. Bray_Hall, N. Doshi, V. P. Grantcharova, Q. Yi, and D. Baker, “Functional rapidly folding proteins from simplified amino acid sequences.,” *Nature Structural Biology*, vol. 4, pag. 805-9, 1997.

- [152] Q. Yi, P. Rajagopal, R. E. Klevit, and D. Baker, "Structural and kinetic characterization of the simplified SH3 domain FP1.," *Protein Science a Publication of the Protein Society*, vol. 12, pag. 776-83, 2003.
- [153] S. Maldonado, M. A. Jimenez, G. M. Langdon, and J. Sancho, "Cooperative stabilization of a molten globule apoflavodoxin fragment.," *Biochemistry*, vol. 37, pag. 10589-96, 1998.
- [154] C. V. Gegg, K. E. Bowers, and C. R. Matthews, "Probing minimal independent folding units in dihydrofolate reductase by molecular dissection.," *Protein Science : a Publication of the Protein Society*, vol. 6, pag. 1885-92, 1997.
- [155] G. de Prat Gay, J. Ruiz Sanz, and A. R. Fersht, "Generation of a family of protein fragments for structure-folding studies. 2. Kinetics of association of the two chymotrypsin inhibitor-2 fragments.," *Biochemistry*, vol. 33, pag. 7964-70, 1994.
- [156] G. de Prat Gay, J. Ruiz Sanz, B. Davis, and A. R. Fersht, "The structure of the transition state for the association of two fragments of the barley chymotrypsin inhibitor 2 to generate native-like protein: implications for mechanisms of protein folding.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, pag. 10943-6, 1994.
- [157] G. de Prat Gay and A. R. Fersht, "Generation of a family of protein fragments for structure-folding studies. 1. Folding complementation of two fragments of chymotrypsin inhibitor-2 formed by cleavage at its unique methionine residue.," *Biochemistry*, vol. 33, pag. 7957-63, 1994.
- [158] G. de Prat Gay, J. Ruiz Sanz, J. L. Neira, F. J. Corrales, D. E. Otzen, A. G. Ladurner, and A. R. Fersht, "Conformational pathway of the polypeptide chain of chymotrypsin inhibitor-2 growing from its N terminus in vitro. Parallels with the protein folding pathway.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 254, pag. 968-79, 1995.
- [159] G. De Prat Gay, J. Ruiz Sanz, J. L. Neira, L. S. Itzhaki, and A. R. Fersht, "Folding of a nascent polypeptide chain in vitro: cooperative formation of structure in a protein module.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, pag. 3683-6, 1995.

- [160] A. J. Rader, B. M. Hesperheide, L. A. Kuhn, and M. F. Thorpe, "Protein unfolding: rigidity lost," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, pag. 3540-5, 2002.
- [161] A. T. Alexandrescu, A. G. Gittis, C. Abeygunawardana, and D. Shortle, "NMR structure of a stable "OB fold" sub domain isolated from staphylococcal nuclease," *Journal of Molecular Biology* vol. 250, pag. 134-43, 1995.
- [162] J. Van der Schueren, J. Robben, and G. Volckaert, "Misfolding of chloramphenicol acetyltransferase due to carboxy-terminal truncation can be corrected by second-site mutations.," *Protein Engineering*, vol. 11, pag. 1211-7, 1998.
- [163] F. Gao, Y. Wang, Y. Qiu, Y. Li, Y. Sha, L. Lai, and H. Wu, "Beta-turn formation by a six-residue linear peptide in solution.," *The Journal of Peptide Research : Official Journal of the American Peptide Society*, vol. 60, pag. 75-80, 2002.
- [164] K. S. Rotondi, L. F. Rotondi, and L. M. Gierasch, "Native structural propensity in cellular retinoic acid-binding protein I 64-88: the role of locally encoded structure in the folding of a beta-barrel protein.," *Biophysical Chemistry*, vol. 100, pag. 421-36, 2003.
- [165] T. R. Hynes, A. Hodel, and R. O. Fox, "Engineering alternative beta-turn types in staphylococcal nuclease.," *Biochemistry*, vol. 33, pag. 5021-30, 1994.
- [166] M. Niggemann and B. Steipe, "Exploring local and non-local interactions for protein stability by structural motif engineering.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 296, pag. 181-95, 2000.
- [167] A. Chattopadhyay, S. S. Rawat, D. A. Kelkar, S. Ray, and A. Chakrabarti, "Organization and dynamics of tryptophan residues in erythroid spectrin: novel structural features of denatured spectrin revealed by the wavelength-selective fluorescence approach.," *Protein Science : a Publication of the Protein Society*, vol. 12, pag. 2389-403, 2003.
- [168] G. de Prat Gay, "Conformational preferences of a peptide corresponding to the major antigenic determinant of foot-and-mouth disease virus: implications for peptide-vaccine approaches.," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 341, pag. 360-9, 1997.

- [169] M. Mezei, "Chameleon sequences in the PDB," *Protein Engineering*, vol. 11, pag. 411-4, 1998.
- [170] T. Otomo, K. Teruya, K. Uegaki, T. Yamazaki, and Y. Kyogoku, "Improved segmental isotope labeling of proteins and application to a larger protein.," *Journal of Biomolecular Nmr*, vol. 14, pag. 105-14, 1999.
- [171] J. L. Neira, B. Davis, A. G. Ladurner, A. M. Buckle, G. d. e. P. Gay, and A. R. Fersht, "Towards the complete structural characterization of a protein folding pathway: the structures of the denatured, transition and native states for the association/folding of two complementary fragments of cleaved chymotrypsin inhibitor 2. Direct evidence for a nucleation-condensation mechanism.," *Folding & Design*, vol. 1, pag. 189-208, 1996.
- [172] A. Yokota, H. Takenaka, T. Oh, Y. Noda, and S. Segawa, "Thermodynamics of the reconstitution of tuna cytochrome c from two peptide fragments.," *Protein Science : a Publication of the Protein Society*, vol. 7, pag. 1717-27, 1998.
- [173] D. D. Ojennus, S. E. Lehto, and D. S. Wuttke, "Electrostatic interactions in the reconstitution of an SH2 domain from constituent peptide fragments.," *Protein Science : a Publication of the Protein Society*, vol. 12, pag. 44-55, 2003.