



RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

Torchio, Gabriela María

Estudio fisicoquímico de modelos de plegado complejos: el caso del dominio PDZ de la $\beta\gamma$ proteína 22 Sintrofina



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Torchio, G. M. (2016). *Estudio fisicoquímico de modelos de plegado complejos: el caso del dominio PDZ de la $\beta\gamma$ proteína 22 Sintrofina. (Tesis de doctorado). Bernal, Argentina: Universidad Nacional de Quilmes en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes*
<http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/238>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Estudio fisicoquímico de modelos de plegado complejos: el caso del dominio PDZ de la proteína $\beta 2$ -Sintrofina

TESIS DOCTORAL

Gabriela María Torchio

gabrielatorchio@gmail.com

Resumen

La proteína $\beta 2$ -sintrofina es una proteína citoplasmática de las llamadas 'proteínas de andamiaje', que juega un rol primordial en la regulación de la secreción de insulina gracias a su interacción con la proteína de membrana ICA512, la cual se encuentra en la membrana de los gránulos de secreción de insulina (GSI), en las células β del páncreas. La interacción entre $\beta 2$ -sintrofina e ICA512 ancla los GSI al cito esqueleto de actina. El estado de fosforilación de $\beta 2$ -sintrofina regula esta interacción, y la disrupción del complejo permite la exocitosis de los gránulos. En esta interacción participa el dominio PDZ de $\beta 2$ -sintrofina ($\beta 2S$ -PDZ).

Hemos estudiado el desplegado térmico de $\beta 2S$ -PDZ en el equilibrio con diferentes técnicas biofísicas. Los termogramas obtenidos mediante dicroísmo circular (CD) en el UV-lejano en distintas concentraciones de urea, y por calorimetría diferencial de barrido (DSC) muestran transiciones anchas y desnaturalización por frío. Las transiciones probaron ser reversibles con ambas técnicas. Los termogramas de CD seguidos a diferentes longitudes de onda no son superponibles, y las temperaturas media de la transición (T_m) y de máxima estabilidad (T_{max}) muestran una dependencia con la concentración de urea. Los termogramas de DSC permiten descartar la formación de dímeros u otros oligómeros. A diferencia de la mayoría de los dominios PDZ estudiados, la desnaturalización térmica de $\beta 2S$ -PDZ en condiciones de equilibrio no es descripta satisfactoriamente por modelos de estados discretos, como los modelos de dos o de tres estados. Esto plantea la posibilidad de que el proceso de plegado involucre a un estado de transición correspondiente a una barrera energética muy baja o que la proteína siga un modelo de estado único (modelo 'cuesta abajo' o 'downhill'). Según este modelo, la proteína se encuentra en un único estado a lo largo del experimento de desnaturalización térmica, pero el ensamble conformacional de ese estado varía con la temperatura. De esta manera, en estas proteínas se observa que distintos elementos de estructura secundaria se despliegan de manera cuasi independiente, o sin cooperatividad. Nuestros estudios de desnaturalización térmica seguida por CD y por DSC indican que el comportamiento de $\beta 2S$ -PDZ es mejor descripto por un modelo de tipo continuo. La mayor estabilidad de $\beta 2S$ -PDZ a pH alcalino, y el análisis computacional de la estructura tridimensional indican que el comportamiento de plegado de $\beta 2S$ -PDZ puede estar relacionado con su distribución de residuos cargados.

Estudiamos además el comportamiento de residuos individuales en distintas condiciones de temperatura, entre 5 y 50 °C, por resonancia magnética nuclear (RMN). Los valores de los experimentos de dinámica T_1 , T_2 y NOE heteronuclear indican que a bajas

temperaturas β 2S–PDZ se encuentra en una estructura relativamente rígida, con excepción de la hélice α A que presenta movimientos conformacionales lentos. Si bien no hemos podido realizar una curva de desnaturalización hasta altas temperaturas por limitaciones técnicas, hemos podido alcanzar valores correspondientes a la T_m de experimentos de CD y DSC. Así, de nuestros resultados pudimos extraer información importante acerca de los eventos tempranos del proceso de desnaturalización térmica de β 2S–PDZ, los cuales corresponderían a una etapa de cambio gradual en la estructura. Nuestros resultados indican que β 2S–PDZ sufre cambios conformacionales graduales dependientes de la temperatura, que indicarían la aplicabilidad de los modelos de desplegamiento continuo. Además, este comportamiento podría tener relevancia en la regulación de la secreción de insulina, en concordancia con la hipótesis de que pequeñas proteínas con un comportamiento de plegado continuo podrían funcionar en la célula como ‘reostatos moleculares’.

Director: Dr. Mario R. Ermácora

Co-director: Dr. Mauricio P. Sica

Grupo de Biología Estructural y Biotecnología UNQ
Instituto Multidisciplinario de Biología Celular, CONICET
Departamento de Ciencia y Tecnología
Universidad Nacional de Quilmes

Estudio fisicoquímico de modelos de plegado complejos: el caso del dominio PDZ de la proteína $\beta 2$ -Sintrofina

*Tesis para ser presentada para la obtención del título de
Doctora en Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes*

Lic. Gabriela María Torchio

Director: Dr. Mario R. Ermácora

Co-director: Dr. Mauricio P. Sica

Bernal

2015

Publicación

Parte de los resultados presentados en esta tesis fue publicada en el siguiente artículo:

- Torchio, Gabriela María; Ermácora, Mario Roberto; Sica, Mauricio Pablo. *Equilibrium Unfolding of the PDZ domain of $\beta 2$ -syntrophin*, Biophysical Journal, (2012).

Agradecimientos y dedicatorias

Agradecimientos

Mis más sinceros y enormes agradecimientos son para el Dr. Mauricio Sica, por toda la paciencia que me tuvo, por involucrarse directamente en este trabajo de tesis y permitirme trabajar en su línea de investigación, por todos sus consejos, por todos los conocimientos que me transfirió, y por su confianza en mi. Le agradezco también que me haya obligado a convertirme al fundamentalismo de LINUX, R y LATEX. A él y a su familia (Geraldine, Valentina y Maitena) les agradezco la hospitalidad con la que me recibieron en su casa. Gracias, ché!

Quiero agradecerle al Dr. Mario Ermácora por permitirme formar parte de su grupo de investigación, por enseñarnos (y obligarnos) a sus becarios a trabajar con rigurosidad y meticulosidad, y por su compromiso y asesoramiento constante a lo largo de este trabajo de tesis. Debo decir que no he conocido persona más apasionada por su trabajo que él.

No tengo palabras suficientes de agradecimiento para las personas con las que tuve oportunidad de trabajar en colaboración. Al Dr. Martín Arán y a la Dra. Mariana Gallo, de la Fundación Instituto Leloir, porque dedicaron mucho de su tiempo y paciencia en los experimentos de RMN. A la Dra. Inés Burgos, del Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC, Universidad Nacional de Córdoba), quien trabajó codo a codo conmigo haciendo experimentos de DSC. Al Dr. Gerardo Fidelio (CIQUIBIC) por recibirme en su laboratorio y permitirme realizar una pasantía allí.

A mis amigos/as de la UNQ, gente que me alegra tanto haber conocido y tener a mi lado: Noe, Fede y Ale, con quienes compartí el labo desde el primer día (o casi), y quienes no solo fueron excelentes compañeros de trabajo sino que se han convertido en grandes amigos; y los lamabienses (los pura cepa y los pseudo) Mirna, Sole, Estefi, Silvi, Leandro, Flavia, Conie por tantas mañanas y tardes de mate y demás. Su apoyo ha sido muy importante para mi. Le agradezco también Dario Escala, que además de ser una gran amigo, me ayudó mucho en la confección de este manuscrito.

A mis compañeros del labo: a Raúl y a Martín les quiero agradecer especialmente por tantos “cambios de diálisis”, “cortes de geles”, “inducción de cultivos”, etc. Son excelentes compañeros de laboratorio! Un gusto compartir estos años con uds. A toda la camada nueva del LEPP: Alejo, Iván, Pamela, Antonela, Cintia, Ramiro y Leandro, a la mayoría les debo más de un favor; y sé que tuvieron que bancarme en más de una. Gracias.

A Bruno y a las chicas de la Secretaría de CyT de la UNQ, por estar siempre a disposición y resolver nuestros problemas con celeridad.

Agradezco también al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el financiamiento, y a la Universidad Nacional de Quilmes.

Dedicatorias

Esta tesis va dedicada a mi mamá, a mi papá y a mi hermano. Los amo.

A mis mejores amigos y a aquellas personas que llevo en mi corazón, que me han acompañado y me han dado fuerzas todo este tiempo: Romi, Nany, Eli, Fede, Ale, Noe, Ceci R., Sol, Gabi, Ceci QP, Sabri, Yemi, Hugh, Mirna, Sole, Vero, Ani, Gri, Sil, Dario. Les debo mucho. Gracias infinitas. Los/as adoro.

Abreviaturas

ϵ_{214} : coeficiente de absorptividad molar a 214 nm

θ : elipticidad molar

δ : desplazamiento químico

ADN: ácido desoxirribonucleico

β 2S: proteína β 2-sintrofina

CD: dicroísmo circular

C_t : extremo C de la cadena polipeptídica

C_P : capacidad calorífica molar de la proteína

C_P^{EX} : capacidad calorífica en exceso

$C_{P,N}$: capacidad calorífica intrínseca del estado nativo

$C_{p,b}$: capacidad calorífica de la solución de referencia

$C_{P,b}^0$: capacidad calorífica específica de la solución de referencia

$C_{P,p}$: capacidad calorífica de la solución de proteína

$C_{P,p}^0$: capacidad calorífica específica de la proteína

ΔC_{PU} : diferencia de capacidad calorífica a presión constante entre los estados nativo y desplegado de una proteína

ΔG_U : diferencia de energía libre entre los estados nativo y desplegado de una proteína

ΔH_U : diferencia de entalpía entre los estados nativo y desplegado de una proteína

DO: densidad óptica

DSC: calorimetría diferencial de barrido

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

ESI: ionización por *electrospray*

FI: fracción insoluble luego de la lisis celular

f_N : fracción molar del estado nativo

FS: fracción soluble luego de la lisis celular

FPLC: cromatografía rápida líquida de proteínas y péptidos

FT: fracción total luego de la lisis celular

f_U : fracción molar del estado desplegado

G : energía libre de Gibbs

H : entalpía

hnNOE: efecto nuclear de Overhauser heteronuclear
HSQC: (espectro de) correlación cuántica simple heteronuclear
I: estado intermediario
IPTG: isopropiltiogalactósido
kan: kanamicina
 k_B : constante de Boltzmann ($1,3806488 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$)
 K_U : constante de equilibrio de desplegado
LB: medio de cultivo Luria-Bertani
MALDI: ionización-desorción por láser asistida por matriz
MM: medio de cultivo mínimo
N: estado nativo de una proteína
NOE: efecto nuclear de Overhauser
 N_t : extremo N de la cadena polipeptídica
PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PDB: banco de datos de proteínas
pI: punto isoeléctrico
RF: radiofrecuencia
 R_h : radio hidrodinámico
RMN: resonancia magnética nuclear
rpm: revoluciones por minuto
 S : entropía
SB: solución para sembrar muestras en geles de agarosa
SC: solución
SC A: solución de fosfato de sodio 30 mM pH 6.5
SC B: solución de fosfato de sodio 30 mM pH 6.5, 2 M NaCl
SDS: dodecil sulfato de sodio
SVD: descomposición en valores singulares
TAE: (solución de) tris-acético-EDTA
 T : temperatura
TB: medio de cultivo *terrific broth*
 T_m : temperatura media de la desnaturalización
 T_{max} : temperatura de máxima estabilidad
U: estado desplegado de una proteína
UV: ultravioleta

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

Resumen

La proteína $\beta 2$ -sintrofina es una proteína citoplasmática de las llamadas ‘proteínas de andamiaje’, que juega un rol primordial en la regulación de la secreción de insulina gracias a su interacción con la proteína de membrana ICA512, la cual se encuentra en la membrana de los gránulos de secreción de insulina (GSI), en las células β del páncreas. La interacción entre $\beta 2$ -sintrofina e ICA512 ancla los GSI al citoesqueleto de actina. El estado de fosforilación de $\beta 2$ -sintrofina regula esta interacción, y la disrupción del complejo permite la exocitosis de los gránulos. En esta interacción participa el dominio PDZ de $\beta 2$ -sintrofina ($\beta 2S$ -PDZ).

Hemos estudiado el desplegado térmico de $\beta 2S$ -PDZ en el equilibrio con diferentes técnicas biofísicas. Los termogramas obtenidos mediante dicroísmo circular (CD) en el UV-lejano en distintas concentraciones de urea, y por calorimetría diferencial de barrido (DSC) muestran transiciones anchas y desnaturalización por frío. Las transiciones probaron ser reversibles con ambas técnicas. Los termogramas de CD seguidos a diferentes longitudes de onda no son superponibles, y las temperaturas media de la transición (T_m) y de máxima estabilidad (T_{max}) muestran una dependencia con la concentración de urea. Los termogramas de DSC permiten descartar la formación de dímeros u otros oligómeros. A diferencia de la mayoría de los dominios PDZ estudiados, la desnaturalización térmica de $\beta 2S$ -PDZ en condiciones de equilibrio no es descripta satisfactoriamente por modelos de estados discretos, como los modelos de dos o de tres estados. Esto plantea la posibilidad de que el proceso de plegado involucre a un estado de transición correspondiente a una barrera energética muy baja o que la proteína siga un modelo de estado único (modelo ‘cuesta abajo’ o ‘*downhill*’). Según este modelo, la proteína se encuentra en un único estado a lo largo del experimento de desnaturalización térmica, pero el ensamble conformacional de ese estado varía con la temperatura. De esta manera, en estas proteínas se observa que distintos elementos de estructura secundaria se despliegan de manera cuasi independiente, o sin cooperatividad. Nuestros estudios de desnaturalización térmica seguida por CD y por DSC indican que el comportamiento de $\beta 2S$ -PDZ es mejor descripto por un modelo de tipo continuo. La mayor estabilidad de $\beta 2S$ -PDZ a pH alcalino, y el análisis computacional de la estructura tridimensional indican que el comportamiento de plegado de $\beta 2S$ -PDZ puede estar relacionado con su distribución

de residuos cargados.

Estudiamos además el comportamiento de residuos individuales en distintas condiciones de temperatura, entre 5 y 50 °C, por resonancia magnética nuclear (RMN). Los valores de los experimentos de dinámica T1, T2 y NOE heteronuclear indican que a bajas temperaturas β 2S-PDZ se encuentra en una estructura relativamente rígida, con excepción de la hélice α A que presenta movimientos conformacionales lentos. Si bien no hemos podido realizar una curva de desnaturalización hasta altas temperaturas por limitaciones técnicas, hemos podido alcanzar valores correspondientes a la T_m de experimentos de CD y DSC. Así, de nuestros resultados pudimos extraer información importante acerca de los eventos tempranos del proceso de desnaturalización térmica de β 2S-PDZ, los cuales corresponderían a una etapa de cambio gradual en la estructura. Nuestros resultados indican que β 2S-PDZ sufre cambios conformacionales graduales dependientes de la temperatura, que indicarían la aplicabilidad de los modelos de desplegado continuo. Además, este comportamiento podría tener relevancia en la regulación de la secreción de insulina, en concordancia con la hipótesis de que pequeñas proteínas con un comportamiento de plegado continuo podrían funcionar en la célula como ‘reostatos moleculares’.

Índice general

Publicación	I
Agradecimientos y dedicatorias	II
Abreviaturas	IV
Aminoácidos	VI
Resumen	VII
Índice general	IX

I INTRODUCCIÓN GENERAL 2

1. El plegado proteico	3
1.1. El estado nativo y el estado desplegado de las proteínas	3
1.2. El problema: ¿cómo se pliegan las proteínas?	4
1.3. La teoría del paisaje energético	5
1.4. Modelos termodinámicos de plegado	9
1.4.1. Plegado en estados discretos	9
1.4.2. Plegado tipo cuesta abajo	10
2. Los dominios PDZ	13
2.1. Generalidades sobre de los dominios PDZ	13
2.1.1. Estructura y función	13
2.1.2. Plegado y estabilidad	14
2.2. El dominio PDZ de la proteína β 2-sintrofina	15

II MATERIALES, FUNDAMENTOS y MÉTODOS 18

3. Materiales y equipamiento	19
3.1. Soluciones y reactivos generales, y medios de cultivo	19

3.2. Reactivos y materiales de biología molecular	20
3.3. Reactivos y materiales para la purificación de proteína	21
3.4. Instrumentación	22
4. Clonado, expresión y purificación de β2S-PDZ	23
4.1. Clonado de β 2S-PDZ	23
4.1.1. Transformación de bacterias electrocompetentes	24
4.2. Expresión de β 2S-PDZ	24
4.2.1. Expresión de β 2S-PDZ en medio Luria-Bertani	24
4.2.2. Expresión de β 2S-PDZ en medio Terrific Broth	25
4.2.3. Expresión de β 2S-PDZ en medio mínimo	25
4.3. Partición de β 2S-PDZ	25
4.4. Purificación de β 2S-PDZ	26
4.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante	27
5. Caracterización estructural y dinámica	28
5.1. Análisis bioinformático	28
5.2. Determinación del peso molecular por espectrometría de masa	28
5.3. Determinación de la concentración	29
5.3.1. Fundamentos	29
5.3.2. Protocolo	29
5.4. Caracterización de la estructura secundaria por CD	29
5.4.1. Fundamentos	29
5.4.2. Protocolo	31
5.5. Caracterización por espectroscopía de resonancia magnética nuclear	31
5.5.1. Teoría básica de espectroscopía de resonancia magnética nuclear	31
5.5.2. Asignación del espectro de RMN de proteínas	33
5.5.3. Determinación del radio hidrodinámico por RMN	41
5.5.4. Experimentos de dinámica: T_1 , T_2 y NOE heteronuclear	42
6. Caracterización termodinámica y estructural de la desnaturalización	46
6.1. Desnaturalización seguida por CD	46
6.1.1. Fundamentos	46
6.1.2. Protocolos	47
6.1.3. Modelos de ajuste y procesamiento de datos	48
6.2. Calorimetría Diferencial de Barrido	52
6.2.1. Fundamentos	52
6.2.2. Protocolo	52
6.2.3. Modelos de ajuste y procesamiento de datos	53

6.3. Perturbación térmica seguida por RMN	58
6.3.1. Fundamentos	58
6.3.2. Protocolos	58
III RESULTADOS y DISCUSIÓN	59
7. Producción de β2S–PDZ y caracterización estructural y dinámica	60
7.1. Producción de β 2S–PDZ	60
7.2. Caracterización estructural	61
7.2.1. Análisis bioinformático	61
7.2.2. Determinación del peso molecular por espectrometría de masa	63
7.2.3. Análisis de la estructura secundaria por CD	64
7.2.4. Asignación del espectro de ^{15}N - ^1H -HSQC	65
7.2.5. Determinación del radio hidrodinámico por RMN	69
7.2.6. Experimentos de dinámica: T_1 , T_2 y NOE heteronuclear . . .	69
7.2.7. Resumen de los parámetros estructurales de utilidad	71
8. Caracterización termodinámica y estructural de la desnaturalización de β2S–PDZ	73
8.1. Desnaturalización seguida por CD	73
8.1.1. Desnaturalización química con urea	73
8.1.2. Desnaturalización térmica y doble perturbación	73
8.2. Desnaturalización seguida por DSC	81
8.3. Perturbación térmica seguida por RMN	84
IV CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS	89
9. CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS	90
9.1. Conclusiones	90
9.2. Perspectivas	92
V APÉNDICES	93
A. Ecuaciones del modelo <i>Non-two states</i> del programa Origin	94
B. ^1H - δ y ^{15}N - δ de β 2S–PDZ	95
Bibliografía	98

Parte I

INTRODUCCIÓN GENERAL

Capítulo 1

El plegado proteico

1.1. El estado nativo y el estado desplegado de las proteínas

Las proteínas son las unidades funcionales elementales de los sistemas vivientes. Llevan a cabo numerosas funciones que incluyen catálisis de reacciones químicas, transporte de iones y moléculas, movimiento, soporte mecánico, transducción de señales, regulación metabólica y protección, entre otras.

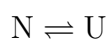
Para poder cumplir su función las proteínas deben adquirir una estructura tridimensional específica, conocida como ‘estado nativo’ (N). El estado nativo es un conjunto de microestados que ocupan una región muy restringida del espacio conformacional proteico, es decir, que presentan esencialmente las mismas interacciones y estructura tridimensional. El estado nativo de una proteína es compacto, presenta una mínima exposición al solvente de las cadenas laterales hidrofóbicas (las cuales se encuentran en su mayoría protegidas en el interior de la proteína), y está estabilizado por una red de innumerables interacciones entre los grupos funcionales de la proteína, y entre la proteína y el solvente [1]. Desde un punto de vista termodinámico, el estado nativo de una proteína es considerado el estado más estable, es decir, el estado con mínima energía libre de Gibbs [2].

La conformación del estado nativo es relativamente rígida, lo que en determinadas circunstancias permite determinar su estructura tridimensional con resolución atómica. Esta rigidez, sin embargo, no debe entenderse como una ausencia de flexibilidad. Por el contrario, en el estado nativo la cadena carbonada presenta algún grado de movilidad, y los enlaces de las cadenas laterales tienen cierta libertad de rotación. La dinámica del estado nativo es importante para que la proteína pueda interactuar con ligandos, realizar actividades catalíticas y responder rápidamente a señales provenientes del entorno [3].

Por otro lado, el ‘estado desnaturalizado’ o ‘desplegado’¹ (U, del inglés *unfolded*) es un conjunto de microestados que ocupan una zona muy extendida en el espacio conformacional proteico, en los cuales la cadena polipeptídica está expandida, y la exposición al solvente de todos los grupos funcionales de la proteína es máxima, aunque es posible encontrar interacciones intramoleculares residuales de largo alcance [4]. En el estado desplegado la cadena polipeptídica puede adoptar una infinidad de conformaciones y sus grados de libertad son máximos.

1.2. El problema: ¿cómo se pliegan las proteínas?

Desde un punto de vista químico las proteínas son polímeros biológicos, y como tales presentan un gran número de grados de libertad que les permitirían, en principio, adoptar incontables estructuras tridimensionales distintas. A pesar de esto, la mayoría de las proteínas adquiere de manera espontánea el estado nativo específico necesario para ejercer su función biológica. El proceso por el cual se llega a este estado nativo a partir del estado desplegado se denomina ‘reacción de plegado’. Típicamente, la reacción de plegado es representada como un equilibrio entre dos estados conformacionales:



Este esquema simplificado de la reacción de plegado es la base del ‘modelo de dos estados’ para el plegado proteico, que se desarrolla más adelante.

Es importante enfatizar aquí que tanto N como U son colecciones de conformaciones y que la reacción es un cambio conformacional, no un cambio en la estructura covalente. Sin embargo, la complejidad de la red de interacciones que estabilizan a N, así como la gran diversidad conformacional de U hacen que la reacción de plegado sea un proceso enormemente complejo. Cómo es que las proteínas adquieren el estado nativo característico y cuáles son los determinantes de dicho estado (la relación entre la secuencia y la estructura tridimensional) es parte de lo que se conoce como ‘el problema del plegado proteico’.

Gracias al trabajo de Anfinsen [5] hoy se sabe que la información contenida en la secuencia de aminoácidos es suficiente para guiar y determinar el plegado proteico. Anfinsen postuló, además, que en condiciones adecuadas (aquellas que favorecen el plegado) el pasaje desde cualquiera de las estructuras del estado desplegado hacia el estado nativo ocurre de manera espontánea, en un proceso basado en la minimización de la energía libre de Gibbs del sistema. Esto se conoce como control termodinámico del plegado.

¹Desplegado y desnaturalizado no son sinónimos, aunque en este trabajo de tesis se utilizan ambos términos de forma indistinta.

Levinthal, por su parte, postuló como una paradoja que una cadena polipeptídica no podría plegarse explorando al azar todas las conformaciones posibles, ya que un proceso de búsqueda aleatoria del estado nativo llevaría tiempos extremadamente largos para una cadena polipeptídica de longitud promedio. Levinthal argumentó que debían existir rutas de plegado definidas que las proteínas transitarían para llegar al estado nativo desde el estado desplegado. La existencia de rutas de plegado permite acotar el universo de conformaciones intermedias que potencialmente podría adquirir una proteína hasta alcanzar el estado nativo, y permite explicar el hecho de que las proteínas se pliegan en tiempos cortos, compatibles con los tiempos biológicos [3]. Esto se conoce como control cinético de la reacción de plegado.

1.3. La teoría del paisaje energético

En los años '90, Wolynes y colaboradores desarrollaron la teoría del paisaje energético [6] para interpretar el proceso de plegado proteico de una manera que elimina la paradoja cinética de Levinthal. Retomando los postulados de Anfinsen, esta teoría sostiene que el proceso de plegado está bajo control termodinámico. Sin embargo, a diferencia de Levinthal, que en su paradoja consideraba todas las conformaciones isoenergéticas, la teoría del paisaje energético postula que la energía del proceso de plegado es un balance entre la entalpía (H) y la entropía (S) del sistema [7]:

$$G(x) = H(x) - T \cdot S(x) \quad (1.1)$$

donde x es una coordenada de la reacción de plegado que da cuenta del grado de avance hacia el estado nativo, y G es la energía libre de Gibbs. La dependencia de los parámetros termodinámicos con la coordenada de reacción es el aspecto clave de esta nueva teoría ya que introduce un sesgo energético que hace factible la búsqueda conformacional del estado nativo en tiempos razonables.

Aunque el paisaje energético tiene n^l dimensiones (donde l es el número de residuos y n es el número de conformaciones posibles por residuo), es conveniente representarlo como la superficie de un embudo (Figura 1): en la parte superior y más ancha del embudo se encuentran las conformaciones de mayor energía, es decir, el estado desplegado; y en la base, en la parte más angosta, se encuentran las conformaciones de menor energía, es decir, el estado nativo. Como se puede apreciar en la figura, las paredes del embudo no son lisas, sino que son rugosas. Los valles en estas paredes rugosas son mínimos energéticos locales, y su aparición se explica por desfases entre el decrecimiento de la entalpía y de la entropía. Este desfase se conoce en teoría de los polímeros como 'frustración conformacional'.

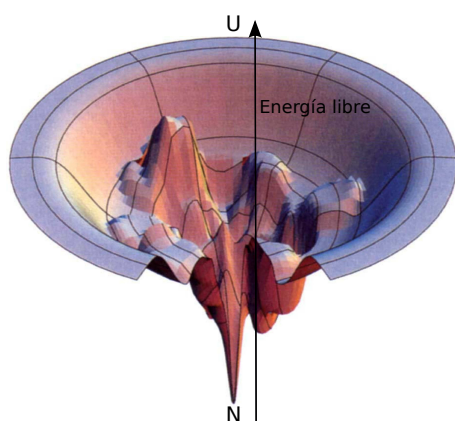


Figura 1. Embudo de paredes rugosas. Según este esquema del paisaje energético, en la parte más ancha del embudo se encuentran todas las conformaciones del estado U. Para alcanzar el mínimo energético, el estado N, las proteínas pueden recorrer varios caminos. Eventualmente podrían quedar atrapadas en alguno de los múltiples mínimos energéticos locales, que se representan como rugosidades en las paredes del embudo. Figura modificada de [8].

La frustración conformacional en las proteínas surge, por un lado, de la imposibilidad de satisfacer a la vez las interacciones (hidrofílicas e hidrofóbicas) de cada uno de los residuos, lo cual da lugar a cierto número de interacciones conflictivas; y por otro lado, de restricciones geométricas [6]. Durante el proceso de plegado, las proteínas podrían caer en alguno/s de estos mínimos energéticos locales y quedar momentáneamente atrapadas. Las diferencias de energía entre estos mínimos locales son del orden de $k_B T$, la energía térmica en los átomos de la proteína², de modo que el pasaje de un mínimo a otro es rápido [6], e involucra solo pequeños movimientos locales, como rotaciones de las cadenas laterales. La teoría del paisaje energético postula que las proteínas naturales pertenecen al subconjunto de polímeros de aminoácidos que se pliega efectivamente y en tiempos razonables en un único estado nativo, en el cual la frustración conformacional es mínima. Aún así, la frustración conformacional no puede eliminarse completamente, y tal como lo confirma la evidencia experimental, los espacios energéticos de las proteínas pueden presentar más de un mínimo, lo que da lugar a la aparición de estados intermediarios.

En determinadas circunstancias los movimientos de la cadena carbonada de la proteína pueden involucrar el movimiento de muchas cadenas laterales en simultáneo, dando lugar a grandes cambios conformacionales. En estos casos se produce una descompensación mayor entre entalpía y entropía, y la diferencia entre dos mínimos energéticos puede ser suficientemente grande ($>3k_B T$) como para dar lugar al surgimiento de ‘barreras de energía libre’ entre ellos [6]. La interconversión entre estos mínimos puede ser muy lenta en relación a la escala de tiempo de los movimientos de las proteínas.

En este sentido, la naturaleza polimérica de las proteínas puede dar lugar a escenarios más complicados. Como ya se mencionó, a temperaturas altas se pueblan

² k_B es la Constante de Boltzmann ($1,3806488 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$). T es la temperatura del sistema.

1.3. La teoría del paisaje energético

conformaciones de alta energía correspondientes al estado U. A medida que la temperatura disminuye, el paisaje conformacional comienza a poblarse de ensambles de conformaciones más compactas de menor energía (mínimos locales) entre los que se encuentra el estado nativo, correspondiente al mínimo global de energía libre. Si la temperatura sigue disminuyendo y las barreras energéticas son suficientemente bajas, los mínimos locales se irán despoblando en favor del estado N. Sin embargo, si las barreras energéticas son considerables, las moléculas quedarán atrapadas en los distintos mínimos locales y no podrán encontrar su camino hacia el estado nativo. La temperatura a la que ocurre este fenómeno se denomina ‘temperatura de transición vítrea’ (T_g) y permite definir dos escenarios posibles: o bien la transición $N \rightleftharpoons U$ ocurre a una temperatura (T_m) superior a T_g y por lo tanto se alcanza el estado N, o bien la transición vítrea ocurre antes que se alcance el estado N ($T_m < T_g$) y por lo tanto la proteína quede atrapada en los mínimos locales. Las proteínas naturales habrían evolucionado para evitar el segundo escenario.

La teoría del paisaje energético contempla una diversidad de escenarios de plegado, dependiendo de las condiciones en las cuales ocurra el plegado. Estos escenarios se diferencian principalmente por la presencia o no de barreras de energía libre (Figura 2).

En el más tradicional y fácil de entender de estos escenarios, el proceso de plegado procede de forma cooperativa desde el estado U al estado N, y el perfil de energía libre presenta dos mínimos separados por una barrera energética, como se esquematiza en la Figura 2(a). Este escenario, denominado ‘escenario Tipo I’, presenta una moderada tendencia hacia el estado nativo, y es el que mejor describe el plegado de numerosas proteínas globulares y pequeñas. En la cima de la barrera de energía se encuentra el estado de transición de la reacción de plegado.

Por otro lado, la teoría del paisaje energético contempla el caso en el cual el plegado procede sin atravesar barreras de energía libre o atravesando barreras de muy baja energía ($< 3k_B T$). En este caso, denominado ‘escenario Tipo 0’, el perfil de energía libre presenta un único mínimo (Figura 2(b)), y corresponde a situaciones con una gran tendencia al estado nativo.

El escenario Tipo 0 también es denominado ‘plegado cuesta abajo’, ya que se puede visualizar como una descenso cuesta abajo en el embudo conformacional. El plegado cuesta abajo es raro de observar en experimentos clásicos de (des)plegado *in vitro*, motivo por el cual su estudio experimental y analítico se encuentra poco desarrollado. Sin embargo, este escenario podría ser común *in vivo* y/o en condiciones fuertemente naturalizantes.

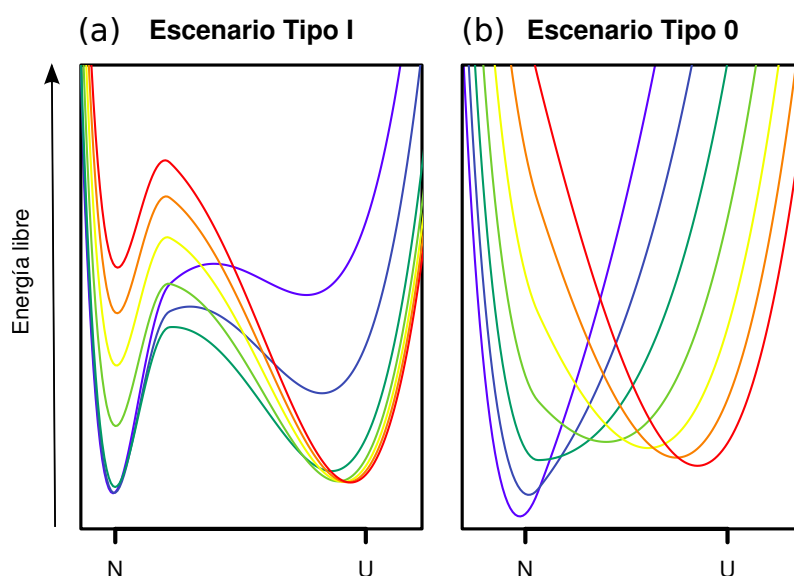


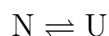
Figura 2. Escenarios de plegado en la teoría del paisaje energético. Los esquemas muestran como varía el perfil de energía libre en un gradiente de temperaturas, desde las más bajas (trazo azul) hasta las más altas (trazo rojo). En la figura (a) se muestra la función de energía libre para un modelo de dos estados, o escenario Tipo I. Puede verse que presenta dos mínimos, uno que corresponde al estado N y otro que corresponde al estado U, pero estos mínimos no cambian de posición al producirse la transición de N hacia U (o viceversa), sino que existen ambos estados en diferentes proporciones. En cambio, como se esquematiza en la figura (b), en un escenario Tipo 0, existe un único estado a lo largo de la reacción de plegado-desplegado, que cambia según las condiciones.

1.4. Modelos termodinámicos de plegado

En esta sección se desarrollan los conceptos principales de los modelos termodinámicos utilizados en esta tesis para analizar los experimentos de desnaturalización inducida.

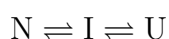
1.4.1. Plegado en estados discretos

En el modelo más simple de desnaturalización de proteínas, el pasaje del estado nativo N al estado desplegado U ocurre sin la aparición de especies intermediarias, es decir, a lo largo del proceso de desnaturalización solo existen N y U en distintas proporciones. Este esquema es la base del ‘modelo de dos estados’, que postula que para proteínas globulares y pequeñas la reacción de plegado-desplegado es una reacción de equilibrio químico entre N y U:



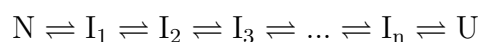
Este tipo de transiciones es de carácter cooperativo, es decir, ocurre en un rango estrecho de la variable independiente, y el pasaje de un estado al otro implica cruzar una barrera energética. El modelo de dos estados permite explicar satisfactoriamente los resultados experimentales de una gran cantidad de proteínas.

Si el plegado procede con la aparición de una especie intermediaria, el modelo de desnaturalización en tres estados puede ser entendido como dos reacciones de primer orden consecutivas:



En este caso, el equilibrio químico se da entre tres estados discretos, N, U y un estado intermediario I en el camino de plegado. Estos estados I aparecen como mínimos locales en el diagrama de energía, y en determinadas condiciones pueden ser estabilizados y detectados experimentalmente. En este caso, la presencia de un intermediario implica el cruce de dos barreras energéticas.

El modelo de tres estados es una extensión del modelo de dos estados. De la misma manera, el modelo puede generalizarse para n estados discretos intermediarios:



Estas generalizaciones no difieren conceptualmente del modelo de dos estados: se trata esquemas en los cuales el equilibrio químico se da entre n macroestados claramente diferenciados y poblados separadamente.

1.4.2. Plegado tipo cuesta abajo

Como se mencionó en el capítulo anterior, la teoría del paisaje energético predice que bajo ciertas condiciones el plegado puede proceder sin cruzar ninguna barrera energética, o cruzando barreras de energía muy baja. En estos casos el balance entre entalpía y entropía es tal que éstas se cancelan mutuamente, y el plegado procede cuesta abajo (del inglés *downhill folding*). El plegado tipo cuesta abajo también ha sido denominado ‘plegado continuo’, ya que existe un único estado termodinámico que varía continuamente a lo largo de la reacción de plegado, y que puede presentar distintos grados de estructura nativa. En un proceso de desplegado en este escenario la estructura nativa se pierde gradualmente [9]. Desde un punto de vista cinético, se ha observado que muchas proteínas se pliegan de forma ultra-rápida, en microsegundos, en contraste con las decenas de milisegundos reportados para proteínas monoméricas de dos estados que deben atravesar una barrera energética para pasar de un estado a otro [10].

El estudio experimental de estas ‘proteínas cuesta abajo’ es reciente. Este tipo de comportamientos ha sido descrito para el represor λ monomérico [11], el dominio BBL del complejo multienzimático 2-oxoglutarato deshidrogenasa de *E. coli* [12], y la proteína gpW del bacteriófago λ [10].

Se postula que las proteínas con la capacidad de producir cambios graduales de su estructura nativa funcionarían como ‘reostatos moleculares’, de modo que el grado de actividad o función podría regularse finamente modificando parámetros ambientales como acidez, temperatura, concentración de iones, etc. [9]. Ampliar el abanico de proteínas que siguen el régimen de plegado cuesta abajo es esencial para empezar a comprender los determinantes de la maleabilidad del estado nativo y su relación con la función proteica.

Aproximaciones experimentales y analíticas para el estudio del plegado tipo cuesta abajo

La evidencia reciente de la existencia de proteínas naturales que se pliegan siguiendo un modelo continuo llevó a sistematizar un conjunto de criterios empíricos y de herramientas analíticas que sirviesen para el diagnóstico de este tipo de plegado [9]. En esta sección se describen las estrategias experimentales para la identificación de un plegado tipo cuesta abajo, y en la sección subsiguiente se hará una introducción a las herramientas analíticas para analizar los resultados experimentales.

En primer lugar, cuando el proceso de plegado–desplegado es cooperativo, como en el caso del modelo de dos estados, las transiciones de desplegado coinciden cuando son monitoreadas utilizando distintas sondas (dicroísmo circular, fluorescencia, calorimetría, etc.). Si se grafica la fracción de población nativa versus la variable in-

dependiente, las curvas son superponibles independientemente de la sonda utilizada [6]. Por otro lado, la presencia de un punto isoesbético (una longitud de onda a la cual las curvas de una misma familia tienen la misma absorptividad molar) es una condición necesaria en espectroscopía óptica, aunque no suficiente, es una transición en dos estados. Con proteínas que siguen un modelo de tres estados, estos trazos pueden no coincidir, pero las transiciones son abruptas y suelen involucrar dos transiciones discretas. En cambio, un plegado cuesta abajo se caracteriza por presentar transiciones suaves y anchas, y las curvas no coinciden entre las distintas sondas. Esto se traduce en una variación de los parámetros termodinámicos en función de la sonda utilizada [13, 12].

Una estrategia de doble perturbación del sistema también permite identificar un mecanismo de plegado complejo. Esta estrategia combina una sonda estructural sensible a la conformación global de la proteína, y dos procedimientos de desnaturalización con mecanismos de acción diferentes. Se pueden acoplar, por ejemplo, la desnaturalización térmica y la desnaturalización química, y seguir el comportamiento del sistema por dicroísmo circular en el UV-lejano. Para un modelo de dos estados, la señal experimental del sistema es el resultado de la combinación lineal de las señales que aportan los estados N y U [14]. En este caso las curvas son marcadamente sigmoideas, con transiciones abruptas. El agregado de un agente caótropro produce un descenso de la temperatura media de transición ya que desestabiliza al estado N en favor del estado U, pero no altera esencialmente la conformación característica de aquél, lo cual se traduce en que la temperatura de máxima estabilidad ($T_{\max}$) del estado N no cambia con el agregado del caótropro. Además, la variación de la temperatura media de transición (T_m) es lineal con la concentración del caótropro. En cambio, en un modelo continuo las curvas son mucho más suaves, y la conformación del estado inicial varía con la concentración del desnaturalizante. Esto se traduce en que a distintas concentraciones del agente caótropro se observa una dependencia no lineal de la T_m y cambia la $T_{\max}$ del estado N.

La obtención de una curva de desnaturalización sigmoidea y/o de un único pico en un termograma de calorimetría diferencial de barrido suelen asociarse a una transición entre dos estados; de forma análoga dos curvas sigmoideas o dos picos se asocian a dos transiciones separadas por una especie intermediaria. Sin embargo, a pesar de que existe una enorme cantidad de evidencia experimental que indica que la mayoría de las proteínas se pliega siguiendo un modelo de estados discretos, estudios teóricos recientes basados en la mecánica estadística y modelos de cadenas de polímeros han mostrado que transiciones continuas de plegado, sin barreras energéticas, también pueden presentar curvas sigmoideas [12, 15, 16]. El grupo de Victor Muñoz, José M. Sánchez-Ruiz y colaboradores ha dedicado grandes esfuerzos al desarrollo de modelos teóricos y analíticos para analizar los datos experimentales

en condiciones de equilibrio que no son explicados por modelos de dos o tres estados, y que parecerían responder a un régimen cuesta abajo [13, 17, 18].

Capítulo 2

Los dominios PDZ

2.1. Generalidades sobre de los dominios PDZ

2.1.1. Estructura y función

La familia de dominios PDZ son módulos de interacción proteína–proteína que participan en la organización y ensamblaje de complejos multiproteicos en procesos de señalización celular, así como en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular [19, 20]. Se los puede encontrar ampliamente distribuidos en prácticamente todos los reinos de la vida (no han sido descriptos en *Archaea* y levaduras), y son particularmente abundantes en mamíferos, donde forman parte de proteínas citoplasmáticas de diversos tipos celulares. Los modelos más estudiados de complejos proteicos organizados por dominios PDZ pertenecen a neuronas y células epiteliales. En estas células, las proteínas involucradas en el mantenimiento de la comunicación con la matriz extracelular, en la organización de receptores y efectores y en el transporte y reclutamiento de las proteínas apropiadas a los sitios de señalización celular contienen uno o múltiples dominios PDZ [20].

Los dominios PDZ son estructuras globulares de entre 80 y 90 residuos, con una topología conservada que consiste en 5 o 6 hebras β (βA – βF) y dos hélices alfa (αA y αB) (Figura 3). El nombre PDZ es un acrónimo que proviene de las tres primeras proteínas donde se encontró este dominio: la proteína de densidad postsináptica 95 (PSD95), la proteína disc-large supresora de tumores (DlgA), y la proteína zonula occludens-1 (ZO-1).

Los dominios PDZ se clasifican según su especificidad para unir ligandos [22, 23, 24]. Hasta el momento se han descripto cuatro formas de unión: (i) reconocimiento de secuencias conservadas en el extremo C-terminal (C_t) de la proteína ligando; (ii) reconocimiento de motivos internos en las proteínas ligando; (iii) homodimerización PDZ–PDZ; y (iv) unión de lípidos. La primera es la más común de las formas, y la unión del extremo C_t de la proteína ligando se produce en un surco entre la hebra

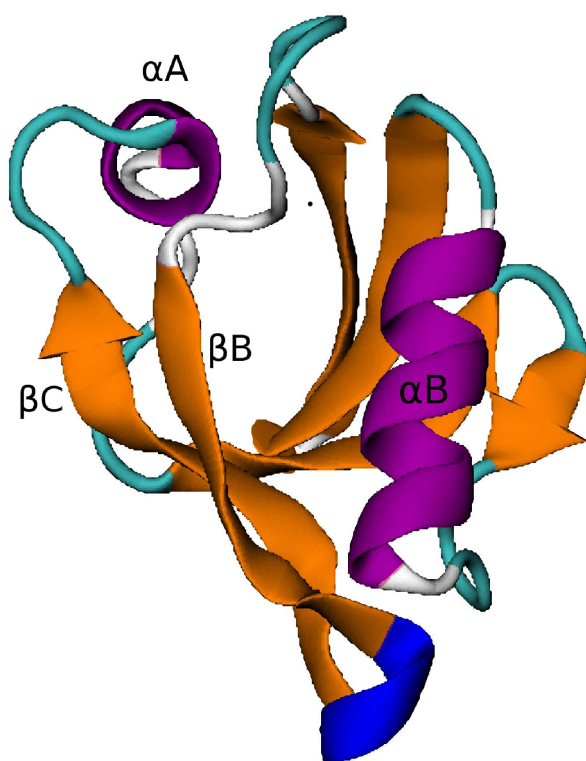


Figura 3. Estructura canónica de un dominio PDZ. Se muestra el dominio PDZ de la proteína β 2-sintrofina (código de PDB 2vrf) que se usó en este trabajo de tesis. En púrpura se muestran las dos hélices α , en naranja las 6 hebras β , en azul una hélice 3-10, en celeste los giros (*loops*), y en blanco estructuras aleatorias. La hélice α B y la hebra β B forman el surco de unión a ligando. Figura realizada con el programa *Visual Molecular Dynamics* [21].

β B y la hélice α B, para formar una lámina β entre el ligando y las hebras β B y β C. El péptido ligando se une de forma antiparalela a la hebra β B, y la hélice α B se une mediante un puente salino al carboxilato del ligando.

Si bien existe una determinada especificidad de secuencia para el reconocimiento de los ligandos, los dominios PDZ son flexibles y reconocen un amplio abanico de motivos [25, 26, 27], lo que les permite interconectar múltiples proteínas y participar en diversas vías de señalización. La afinidad de unión de los dominios PDZ a sus ligandos peptídicos es relativamente baja, con constantes de disociación del orden micromolar. Esta característica también está vinculada a su función, ya que deben ser capaces de unir y desensamblar complejos rápidamente, en respuesta a señales del entorno.

2.1.2. Plegado y estabilidad

Los dominios PDZ son un modelo de estudio de plegado proteico no solo por ser adaptadores universales en uniones proteína-proteína, sino también por la compleja relación que presentan entre estructura, plegado y estabilidad. La evidencia experimental sugiere que existe una relación entre la estabilidad de los dominios PDZ y la unión a ligandos. Para algunos miembros de la familia se ha demostrado que la unión induce cambios conformacionales, indicando un posible mecanismo de regulación alostérica [28, 29].

2.2. El dominio PDZ de la proteína β 2-sintrofina

Los dominios PDZ son dominios relativamente estables, con valores de ΔG_U entre 3 y 6 kcal mol⁻¹, a 25 °C y pH 7 [28]. A pesar de las diferencias en la secuencia aminoacídica entre los distintos PDZ (comparten entre un 25 y 50 % de homología de secuencia) presentan características similares en cuanto a cooperatividad del desplegado, el cual procede a través de un mecanismo en tres estados, a juzgar por la presencia de un intermediario y de dos estados de transición detectados en experimentos cinéticos y de dinámica molecular [30]. La evidencia experimental sugiere que tanto el intermediario como los estados de transición se encuentran conservados en cuanto a su posición a lo largo de la coordenada de reacción, aunque diferirían en cuanto a su estabilidad y estructura [31, 32]. Sin embargo, recientemente se ha detectado más de un intermediario al menos para un miembro de la familia PDZ [33], al cual anteriormente se le había atribuido un mecanismo de tres estados [29]. Por otro lado, para algunos de los dominios PDZ se ha reportado oligomerización [30] y/o agregación [34]. De esta forma, queda claro que existe una relación compleja entre la estructura, el plegado y la función de los dominios PDZ.

2.2. El dominio PDZ de la proteína β 2-sintrofina

β 2-sintrofina (β 2S) es una proteína citoplasmática perteneciente a la familia de las sintrofinas. Existen 5 isoformas de sintrofinas (α 1, α 2, β 1, β 2, β 3), las cuales poseen una estructura conservada y funcionan como proteínas adaptadoras a través de varios dominios de interacción proteína-proteína: la región N-terminal (N_t) incluye a un dominio PDZ que divide en dos a un dominio de homología a plectrina (PH1), mientras que la región C_t contiene un segundo dominio de homología a plectrina (PH2) y un dominio único de sintrofinas (SU) altamente conservado (Figura 4). Las sintrofinas forman parte del complejo asociado a distrofina (DAPC, del inglés *dystrophin associated protein complex*), el cual conecta el citoesqueleto de actina con la matriz extracelular, y que también está involucrado en la señalización transmembrana [35].

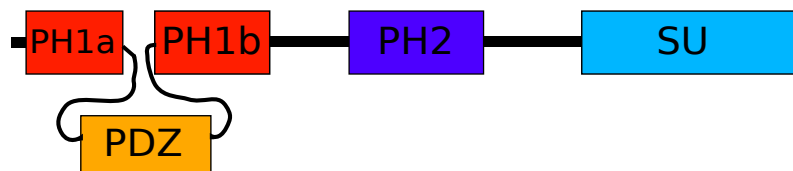


Figura 4. Representación esquemática de la estructura de las sintrofinas. El dominio PDZ interrumpe la secuencia del dominio PH1, dividiéndolo en dos partes: PH1a y PH1b. Estos subdominios se encuentran unidos por dos largos ‘brazos’ desestructurados. Los dominios PH2 y SU son esenciales para unir distrofina, utrofina y distrobrevina, que a su vez se unen al citoesqueleto de actina.

$\beta 2S$ se encuentra en las células beta del páncreas, donde tiene un rol central en la regulación de la secreción de insulina. En el mecanismo propuesto (Figura 5), $\beta 2S$ interactúa por un lado con la proteína utrofina, la cual a su vez se une a los filamentos de actina; y por otro lado interactúa a través de su dominio PDZ ($\beta 2S$ -PDZ) con la porción citoplasmática de la proteína ICA512 (*Islet cell autoantigen-512*). ICA512 es una proteína transmembrana, que se encuentra anclada en los gránulos de secreción de insulina (GS), de modo tal que cuando ICA512, $\beta 2S$ y utrofina se encuentran unidas formando un complejo, el gránulo está anclado al citoesqueleto de actina, inmovilizado. Cuando se estimula la secreción de insulina se produce la disociación de ICA512 y $\beta 2S$, permitiendo la movilización y exocitosis del gránulo de insulina [36]. Experimentos realizados en células de insulinoma de rata INS-1 sugieren que $\beta 2S$ estaría fosforilada en las cercanías del dominio PDZ, y que el grado y el sitio de fosforilación afecta la afinidad por ICA512. La estimulación de la secreción de insulina activa a la fosfatasa μ -calpaína que desfosforila a $\beta 2S$; debilitando la interacción con ICA512. Esto produce la disociación del complejo y la consecuente liberación y movilización del GS [36, 37].

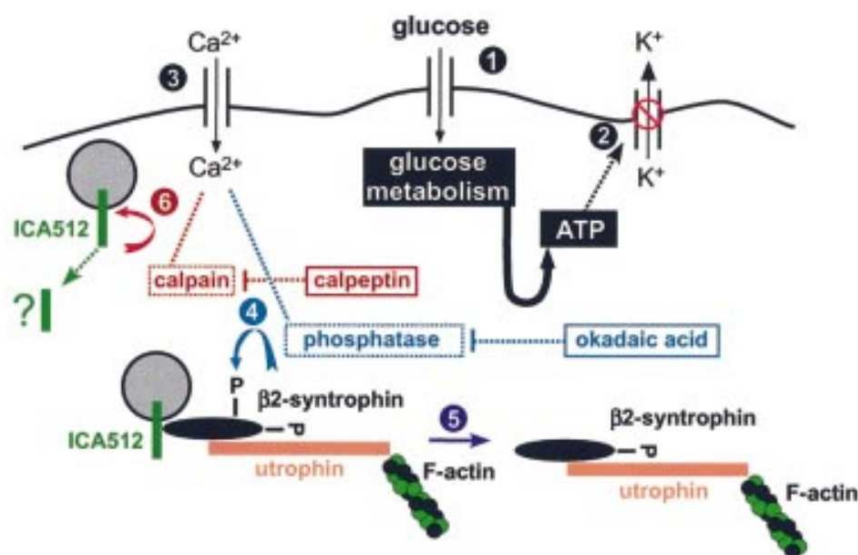


Figura 5. La figura muestra de forma esquemática la ruta metabólica en la cual participa la proteína $\beta 2S$ (*' $\beta 2$ -syntrophin'* en el esquema), de la cual estudiamos su dominio PDZ. En el mecanismo propuesto, $\beta 2S$ se uniría a través de su dominio PDZ a la región intracelular de ICA512, regulando la movilización de los gránulos de insulina. Las letras 'P' en $\beta 2S$ indican que la proteína es (des)fosforilada para regular su acción. Estas (des)fosforilaciones ocurren muy cerca del dominio PDZ, lo cual podría influir en la afinidad de PDZ por ICA512 (Figura tomada de [37]).

$\beta 2S$ -PDZ interactúa con el dominio intracelular de ICA512 (ICA512ic). El dominio ICA512ic ha sido clonado, expresado y caracterizado en trabajos previos a esta

tesis [38]. Variantes de distinta longitud de ICA512ic también han sido producidas en un trabajo previo en el Laboratorio de Plegado y Expresión de Proteínas (no mostrado). Estudiar el complejo formado por ICA512ic y β 2S-PDZ fue uno de los objetivos originales de este trabajo de tesis, ya que ayudaría a comprender a algunos de los determinantes de la regulación de la secreción de insulina. Se han realizado numerosos experimentos para verificar la unión entre β 2S-PDZ y variantes de distinta longitud de ICA512ic, sin éxito. Las técnicas biofísicas empleadas con este propósito fueron: anisotropía de fluorescencia, dicroísmo circular, titulación calorimétrica isotérmica, exclusión molecular, entrecruzamiento con glutaraldehído y ultrafiltración. En las condiciones estudiadas, no se ha podido comprobar la formación del complejo (datos no mostrados).

La estructura reportada de β 2S-PDZ ha sido obtenida por difracción de rayos-X (código del PDB: 2vrf). Esta estructura es una variante químerica de β 2S-PDZ, en la cual se fusionó en el extremo C_t un péptido ligando de PDZ. En el cristal, β 2S-PDZ aparece como un dímero, en el cual cada monómero interactúa con secuencia ligando fusionada al otro monómero. Esta dimerización llevó a postular la posibilidad de que la unión de un ligando tenga un efecto estabilizante en la estructura de β 2S-PDZ, como ya se había demostrado para otros dominios PDZ.

Parte II

MATERIALES, FUNDAMENTOS y MÉTODOS

Capítulo 3

Materiales y equipamiento

En este capítulo se detallan los reactivos, materiales y equipos utilizados para el desarrollo de este trabajo de tesis, así como la composición de las soluciones y medios de cultivo.

3.1. Soluciones y reactivos generales, y medios de cultivo

Para preparar todas las soluciones se utilizó agua desionizada y filtrada con el sistema de purificación de agua Milli-Q® de la marca Millipore. En el caso de las soluciones utilizadas en biología molecular el agua fue además autoclavada.

Para las soluciones amortiguadoras de pH se utilizaron los reactivos cloruro de sodio, fosfatos de sodio monobásico y dibásico anhidros y ácido clorhídrico de la marca Anedra, Tris-HCl de marca USB y ácido etilendiamino tetracético (EDTA) es de la marca Calbiochem.

La urea utilizada en la desnaturalización química es de Sigma Aldrich.

Los reactivos utilizados para RMN, ^{15}N - NH_4Cl y ^{13}C -glucosa, son de Cambridge Isotopes Lab.

Para los medios de cultivo LB o TB (cuya composición se detalla en la Tabla 1) se utilizaron tripteína bacteriológica y extracto de levadura de la marca Britania, cloruro de sodio de la marca Biopack, glicerol de la marca Anedra y kanamicina de la marca IVAX. Para la preparación de todos los medios de cultivo se utilizó agua destilada, y siempre fueron autoclavados antes de su inoculación. La solución de sales M9 y la solución Q utilizadas para el medio mínimo (Tabla 1) fueron debidamente esterilizadas previo a su uso.

La composición de todos los medios y soluciones de cultivo utilizados para la expresión de $\beta 2\text{S}$ -PDZ figura en la Tabla 1.

Medio de cultivo	Abreviatura	Composición por litro
Luria-Bertani	LB	Tripteína bacteriológica 10 g, extracto de levadura 5 g, cloruro de sodio 10 g
Luria-Bertani con kanamicina	LB-Kan	tripteína bacteriológica 10 g, extracto de levadura 5 g, cloruro de sodio 10 g, kanamicina 50 $\mu\text{g/ml}$
Luria-Bertani ágar con kanamicina	LB-ágar-kan	tripteína bacteriológica 10 g, extracto de levadura 5 g, cloruro de sodio 10 g, agarosa 15 g, kanamicina 50 $\mu\text{g/ml}$
Terrific Broth	TB-Kan	tripteína bacteriológica 12 g, extracto de levadura 24 g, glicerol 0,4 %v/v, solución de KH_2PO_4 (0,17 M) y de K_2HPO_4 (0,72 M) 10 %v/v, kanamicina 50 $\mu\text{g/ml}$
sales M9 (5 $\times$)	sales M9 (5 $\times$)	NaH_2PO_4 30 g, K_2HPO_4 15 g, NaCl 2,5 g
Solución Q	Sn Q	HCl (5N) 8 ml, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5g, CaCl_2 0,184 g, H_3BO_3 0,064 g, MnCl_2 0,04 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,018 g, CuCl_2 0,34 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,605 g, ZnCl_2 0,5 g
Medio mínimo	MM	sales M9 (5 $\times$) 200 ml, MgSO_4 (1M) 1 ml, tiamina (0,5 %p/v) 10 ml, ^{13}C -glucosa 2 g, ^{15}N - NH_4Cl 0,75 g, Sn Q 2 ml

Tabla 1. Composición de medios y soluciones de cultivo.

3.2. Reactivos y materiales de biología molecular

Para la amplificación de la región codificante de $\beta 2\text{S}$ -PDZ se utilizó como molde el gen de la proteína $\beta 2$ -sintrofina gentilmente cedido por el Dr. Stanley C. Froehner (Instituto de Tecnología de California, Universidad de Texas, Austin, Estados Unidos), el cual corresponde a la secuencia depositada en el banco de datos genéticos *GeneBank* identificada con el código NM 006750.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó con la enzima *Pfx Platinum*, de Promega. Los oligonucleótidos iniciadores de la PCR fueron encargados a Operon Eurofins Genomics.

Los geles para electroforesis de ADN se prepararon con agarosa de grado biología molecular, de la marca Invitrogen. La solución TAE (Tabla 2) utilizada para la corrida electroforética se preparó con agua desionizada y filtrada, con Tris-HCl de la marca USB, ácido acético de la marca Anedra, y EDTA de grado biología molecular de Calbiochem. Para la purificación de ADN a partir de geles de agarosa se utilizó el sistema de purificación QiaEX II Gel Extraction Kit 150, de Qiagen.

3.3. Reactivos y materiales para la purificación de proteína

Los plásmidos fueron adquiridos de Invitrogen (pTopo) o Novagen (pET-9b). Las enzimas de restricción utilizadas son de las marcas Promega (Ligasa T4 de ADN y BamHI) y New England Biolabs (NdeI).

Las cepas bacterianas *E. coli* BL21 (DE3) pLys y *E. coli* JM109 son de Novagen.

La composición de las soluciones utilizadas en el clonado de β 2S-PDZ figuran en la Tabla 2.

Solución	Abreviatura	Composición por litro	Uso
Solución Tris-acetato-EDTA (50×)	TAE	Tris base 242 g, ácido acético glacial 5,71, EDTA (0,5 M pH 8) 1 %v/v,	electroforesis en gel de agarosa
Solución de siembra en geles de agarosa tipo III (6×)	GLB (6×)	Azul de bromofenol 0,25 %p/v, xilen cianol FF 0,25 %p/v, glicerol 30 %v/v	solución para sembrar muestras de ADN en geles de agarosa

Tabla 2. Composición de las soluciones utilizadas en el clonado de β 2S-PDZ.

3.3. Reactivos y materiales para la purificación de proteína

Para la eliminación del ADN de la fracción soluble de proteína se utilizó una desoxirribonucleasa (DNAsa) de SIGMA o de Calbiochem, y una solución filtrada de cloruro de magnesio (Anedra).

Para la precipitación de β 2S-PDZ se utilizó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de la marca ICN. Las cromatografías de intercambio aniónico fueron realizadas con una columna Mono-S 5/50 GL de la marca GE Healthcare Life Sciences, en un equipo de FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) Jasco PU-2089i. Otras columnas y matrices utilizadas en diversas etapas de la puesta a punto de la purificación fueron: matriz de intercambio aniónico Q-sepharose, columna de S-Sepharose y columna de exclusión molecular Sephadex G-50, todas de GE Healthcare Life Sciences.

Los geles de acrilamida fueron preparados con acrilamida de BIO-RAD.

Otros materiales utilizados durante la purificación de proteínas fueron: membranas de diálisis de 3.5 KDa de corte (Pierce); dispositivos para concentrar proteína por centrifugación Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units de la marca (Millipore); filtros para jeringa estériles (Gamafil); tubos de plástico de 2 ml de baja adherencia (Scientific Specific Inc., SSI).

La composición de las soluciones utilizadas para la purificación de β 2S-PDZ se listan en la Tabla 3.

Solución	Abreviatura	Composición por litro	Uso
Solución de lisis	SC de lisis	Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 5 mM pH 8, NaCl 50mM	resuspensión de bacterias para lisis
Solución A	SC A	fosfato de sodio 30 mM pH 6.5	fase móvil en FPLC
Solución B	SC B	fosfato de sodio 30 mM pH 6.5, NaCl 2 M	fase móvil en FPLC
Solución de siembra (2×)	SB 2×	Tris-HCl 50 mM pH 6.8, glicerol 12 % v/v, SDS 8 % p/v, azul de bromofenol 0,005 %p/v	solución para sembrar muestras de proteína en SDS-PAGE

Tabla 3. Composición de las soluciones utilizadas en la purificación de β 2S-PDZ.

3.4. Instrumentación

Para la reacción en cadena de la polimerasa se utilizó un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient. La cuba de electroforesis para geles de agarosa, la cuba para geles de acrilamida y el electroporador para transformar bacterias son de la marca BIO-RAD. Las celdas de electroporación son de la marca BIO-RAD y tienen un paso de 0.2 cm.

Las centrífugas utilizadas tanto para decantar medios de cultivo, como para separar y/o concentrar proteínas son los modelos J2 y Avanti de la marca Beckman. Dependiendo del volumen a centrifugar, o de las revoluciones necesarias, se utilizó el rotor JA-14 o JA-20.

Para la lisis celular por presión se utilizó una prensa French (French Pressure Cell Press) de Thermo IEC.

Para la determinación de la concentración de proteína por absorción de luz UV se utilizó un espectrofotómetro JASCO-V550 (Jasco Corp., Japón).

Los experimentos de dicroísmo circular (CD) se realizaron en un espectropolarímetro JASCO-810 (Jasco Corp., Japón), acoplado a un sistema de regulación de temperatura Peltier. Se utilizó una celda de cuarzo con un paso óptico de 0.1 cm.

Los experimentos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) fueron realizados en colaboración con el Dr. Gerardo Fidelio y la Dra. Inés Burgos en el Centro de Investigaciones de Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC-CONICET), Facultad de Cs. Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Se utilizó un calorímetro VP-DSC (MicroCal Inc.).

Los experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN) fueron realizados y procesados por la Dra. Mariana Gallo y el Dr. Martín Arán en la Fundación Instituto Leloir, con un equipo Bruker 600 MHz.

Capítulo 4

Clonado, expresión y purificación de β 2S–PDZ

4.1. Clonado de β 2S–PDZ

El clonado consistió en la amplificación de la región codificante del dominio PDZ de la proteína β 2–sintrofina mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos iniciadores de la PCR (Tabla 4) fueron diseñados de modo tal que el producto de la amplificación contase con sitios de restricción para las enzimas NdeI y BamHI en los extremos 3' y 5' respectivamente. El producto de la amplificación fue ligado en el vector de clonado pTOPO utilizando la enzima Ligasa T4 de ADN, para obtener el plásmido pTOPO- β 2S–PDZ con el cual se transformaron bacterias *E. coli* JM109 para su conservación. El vector pTOPO- β 2S–PDZ fue secuenciado para confirmar la identidad del inserto (Macrogen, Korea).

Dirección del oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
5'-3'	AAAAA ACATA TGGTT CGTCG AGTTC GAGTG GTGAA GCAAG AGGC
3'-5'	AGGAT CCTTA TTTGA CCTCA AGCAG AACCT CCTTG CCC

Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos para amplificar β 2S–PDZ.

La región codificante de β 2S–PDZ fue posteriormente transferida al vector de expresión pET9b. Para ello se sometió al vector pTOPO- β 2S–PDZ a una digestión enzimática con NdeI y BamHI. El fragmento de interés producto de la digestión se separó y purificó a partir de un gel de agarosa, y posteriormente fue ligado al vector pET-9b. El vector así obtenido, pET9b- β 2S–PDZ, fue utilizado para transformar bacterias *E. coli* JM109 y *E. coli* BL21 (DE3) pLys, las primeras para conservación del vector, y las segundas para la expresión de β 2S–PDZ. En ambos casos las bacterias fueron conservadas en glicerol 15 % v/v a -80 °C. La identidad del inserto en pET9b- β 2S–PDZ fue confirmada mediante secuenciación (Macrogen, Korea).

En la Tabla 5 figuran las construcciones plasmídicas y cepas utilizadas en el clonado de β 2S-PDZ.

Nombre del vector	Uso del vector	Inserto
pTOPO- β 2S-PDZ	clonado	Residuos Val-113 a Lys-195 de la secuencia nativa del dominio β 2S-PDZ
pET9b- β 2S-PDZ	expresión	Residuos Val-113 a Lys-195 de la secuencia nativa del dominio β 2S-PDZ

Tabla 5. Construcciones plasmídicas utilizadas en el clonado de β 2S-PDZ.

4.1.1. Transformación de bacterias electrocompetentes

La producción de bacterias *E. coli* JM109 y BL21 (DE3) pLys electrocompetentes se realizó como se indica en [39]. Las alícuotas de bacterias electrocompetentes se conservaron en glicerol 15 % v/v a -80 °C durante no más de 3 meses.

La transformación se realizó por electroporación. Se electroporaron 80 μ l de bacterias competentes (descongeladas en frío) con 1-2 μ l del vector correspondiente en una concentración 1-2 ng/ μ l. La celda de electroporación se enfrió en hielo y el electroporador fue programado a 2.5 kV. Inmediatamente después de la electroporación se añadió 1 ml de medio de cultivo LB (Tabla 1), y se incubaron las bacterias transformadas a 37 °C y 220 rpm durante 1 hora. Luego se plaquearon 100 μ l de la transformación en placas de Petri con LB-ágar-kan (Tabla 1).

4.2. Expresión de β 2S-PDZ

4.2.1. Expresión de β 2S-PDZ en medio Luria-Bertani

Se inocularon las bacterias *E. coli* BL21 transformadas con el vector pET9- β 2S-PDZ en un pre-cultivo de 100 ml de LB-kan. Este pre-cultivo se incubó durante 16-20 horas a 37 °C en agitación, a aproximadamente 200 rpm, y luego se utilizó para inocular dos erlenmeyer conteniendo cada uno 1000 ml de medio LB-kan (se utilizaron aproximadamente 50 ml de pre-cultivo por cada litro de cultivo LB-kan). Estos cultivos se incubaron a 37 °C a aproximadamente 200 rpm hasta que alcanzaron una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de 1-1.5. En ese momento se indujo la expresión de proteína con el agregado de lactosa sólida en una concentración final de 1 % p/v, y se incubó el cultivo durante 4 horas, a 37 °C y a 180 rpm. Este protocolo de expresión fue modificado durante el desarrollo de esta tesis para aumentar el nivel de expresión de proteína, como se describe a continuación.

4.2.2. Expresión de β 2S–PDZ en medio Terrific Broth

Para aumentar el rendimiento de la expresión de proteína β 2S–PDZ se ensayaron protocolos con diversos medios de cultivo y condiciones de crecimiento e inducción [40]. El protocolo elegido para expresar β 2S–PDZ fue el siguiente: se inoculó un pre-cultivo de 100 ml de LB-kan con las bacterias *E. coli* transformadas con el vector pET9- β 2S–PDZ. Este pre-cultivo se incubó durante 16-20 horas a 37 °C en agitación, a aproximadamente 200 rpm, y luego se utilizó para inocular dos erlenmeyer conteniendo cada uno 800 ml de medio TB-kan (aproximadamente 50 ml de pre-cultivo cada 800 ml de medio TB). Estos cultivos se incubaron a 37 °C y a 180-200 rpm hasta que alcanzaron una DO_{600} de 1-1.5. Una vez que los cultivos alcanzaron esta DO_{600} se colocaron a aproximadamente 10 °C para bajar su temperatura y detener el crecimiento de las bacterias. Luego se indujo la expresión con el agregado de lactosa sólida en una concentración final de 1 % p/v, y se incubó a 18 °C, a 180-200 rpm, durante 18-20 horas. Las inducciones ‘lentas’ (a bajas temperaturas durante tiempos más largos) favorecen la producción de una mayor cantidad de proteína correctamente plegada, y por lo tanto una mayor partición de la misma en la fracción soluble [40].

4.2.3. Expresión de β 2S–PDZ en medio mínimo

Para los experimentos de resonancia magnética nuclear se expresó la proteína en medio mínimo (MM) suplementado con ^{15}N o con ^{15}N y ^{13}C según necesario. Se inoculó un pre-cultivo de 10 ml de LB-kan con las bacterias *E. coli* transformadas con el vector pET9- β 2S–PDZ. Este pre-cultivo se incubó durante aproximadamente 16 horas a 37 °C, y posteriormente se utilizó para inocular dos erlenmeyer, cada uno con 1000 ml de MM suplementado con kanamicina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (aproximadamente 5 ml de pre-cultivo por cada litro de MM). Este cultivo se incubó durante aproximadamente 6 horas a 37 °C, luego de las cuales se indujo la expresión con el agregado de IPTG hasta una concentración de 0.5 mM. Se disminuyó la temperatura del cultivo a 18 °C y se incubó durante 18-20 horas a 200-220 rpm.

4.3. Partición de β 2S–PDZ

La determinación de la partición de β 2S–PDZ se realizó de la siguiente forma: se inocularon 100 ml de medio LB-kan con 5 ml de un pre-cultivo de LB-kan inoculado con bacterias *E. coli* transformadas con el vector pET9- β 2S–PDZ. Cuando el cultivo alcanzó una $DO_{600}=1$ se tomó 1 ml de muestra de cultivo (tiempo cero de inducción), y se indujo la expresión con IPTG 1 mM final. Este cultivo se incubó a 37 °C durante 4 hs, durante las cuales se tomó una muestra de 1 ml del cultivo cada

una hora. Estas muestras se centrifugaron a $2500\times g$, durante 15 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, se descartó el sobrenadante, y la biomasa se resuspendió en $500\text{ }\mu\text{l}$ de agua desionizada. Las bacterias fueron lisadas por sonicación (3 pulsos de 15 segundos a 4 V). Luego de la lisis se tomó una muestra de $100\text{ }\mu\text{l}$ de esta suspensión, la cual consiste en la fracción total (FT). El resto de la solución fue centrifugada a $10000\times g$ durante 5 minutos, para separar el sobrenadante (FS, fracción soluble) del precipitado (FI, fracción insoluble). A todas estas las fracciones se les agregó un volumen de SB $2\times$ (Tabla 3). Estas muestras se analizaron por electroforesis en gel de acrilamida desnaturalizantes (ver más adelante).

4.4. Purificación de β 2S–PDZ

Luego de la inducción, las bacterias se colectaron por centrifugación a $2500\times g$, durante 15 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, y la biomasa obtenida se resuspendió en SC de lisis (Tabla 3) hasta un volumen final de 20-25 ml, con el agregado de PMSF en concentración final 1 mM. La ruptura de la células (lisis) se realizó aplicando una presión de 1000 psi en una prensa francesa. La mezcla obtenida luego de la ruptura celular se centrifugó a $10000\times g$ durante 20 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. La fracción soluble, que es la que contiene a β 2S–PDZ, se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con DNAsa en una concentración 0.05 mg/ml final y MgCl_2 en una concentración 50 mM final.

El primer protocolo de purificación de β 2S–PDZ que desarrollamos en el laboratorio [41] consistía en la lisis celular y separación de la fracción soluble, la cual se sometía a una purificación mediante una cromatografía de intercambio aniónico, seguida de una cromatografía de exclusión molecular; y por último se realizaba una cromatografía de intercambio catiónico. Posteriormente se realizaron varios ensayos para la puesta a punto del proceso de purificación, con la finalidad de obtener mayor rendimiento. Finalmente se optó por el protocolo que se describe a continuación:

Los pasos de ruptura celular, separación de la fracción soluble e incubación con DNAsa fueron realizados como se explicó mas arriba. Posteriormente se agregó a la fracción soluble después de la lisis $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido al 47 % de saturación, y se dejó en agitación muy suave durante 45 minutos a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ aproximadamente. Luego se centrifugó a $12000\times g$ durante 20 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se recuperó el sobrenadante, al cual se le agregó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a un 80 % de saturación (se consideró que se partía de un 47 % de saturación). Esta solución se incubó a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 45 minutos, en agitación muy suave. Posteriormente se centrifugó a $12000\times g$ durante 20 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se recuperó el precipitado y se resuspendió en SC de lisis hasta un volumen aproximadamente igual al que se tenía antes del primer paso de precipitación. Luego se sometió a una diálisis intensiva (24-36 horas) contra SC A (Tabla 3), utilizando

4.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante

una membrana de corte 3.5 KDa y realizando dos cambios de la SC A de 1 litro cada uno, e incubando cada diálisis 12-18 hs. Luego la muestra dializada se centrifugó a $12000\times g$ durante 15 minutos a 4 °C para eliminar agregados insolubles. La muestra dializada y centrifugada se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico, utilizando una matriz de intercambio catiónico acoplada a un equipo de FPLC. Se utilizó como fase móvil las SC A y B (Tabla 3). El gradiente consistió en un aumento lineal de concentración salina de NaCl desde 0 M hasta 2 M en una hora, a un flujo de 0.5 ml/min. La pureza de la muestra se verificó por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE). En caso de ser necesario, se realizó una segunda purificación por intercambio catiónico, previa diálisis de las fracciones conteniendo a β 2S-PDZ contra 500 ml de SC A durante aproximadamente 4 horas, y luego contra 1 litro de SC A aproximadamente 12 hs.

4.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante

La electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) fue realizada en geles con una concentración de poliacrilamida del 12% [42]. Las muestras para SDS-PAGE se diluyeron a la mitad en SB 2 $\times$ con β -mercaptoetanol al 4%v/v; y se incubaron a 100°C durante 10 minutos. El volumen de muestra sembrado en el gel dependió de cada muestra. En cada corrida se agregó un patrón de pesos moleculares (PM), a fin de estimar el peso en kDa de cada banda de las muestras sembradas. Las condiciones de corrida de los geles fueron las siguientes: el gel de ‘apilamiento’ (*stacking*) se corrió a un voltaje constante de 60 V, y el gel de ‘separación’ (*separating*) se corrió a un voltaje constante de 100 V. Los geles se tiñieron con *Coomassie Brilliant Blue* R250 0.3% en metanol:ácido acético:agua (3:1:6) y luego se decoloraron con una solución de etanol:ácido acético:agua (3:1:6) hasta la visualización de las bandas. Luego de la tinción los geles se conservaron en agua desionizada.

Capítulo 5

Caracterización estructural y dinámica

5.1. Análisis bioinformático

Para el análisis de la secuencia de aminoácidos de β 2S-PDZ se utilizó la herramienta ProtParam del servidor ExPASy (<http://www.expasy.org>). Con esta herramienta es posible obtener parámetros físicos y químicos teóricos a partir de la secuencia primaria de la proteína. Estos parámetros fueron utilizados como referencia para la caracterización estructural.

La estructura cristalográfica de β 2S-PDZ se encuentra disponible en la base de datos Protein Data Bank, PDB (<http://www.rcsb.org>) con el código 2vrf. Para la visualización y el análisis de la estructura tridimensional se utilizó el programa *Visual Molecular Dynamics* (VMD). La distribución de cargas en las estructuras cristalinas de β 2S-PDZ y otros dominios PDZ se analizó calculando la superficie de potencial electrostático aplicando el modelo adaptativo de potencial electrostático de Poisson-Boltzmann (APB) [43] utilizando el programa VMD [21].

5.2. Determinación del peso molecular por espectrometría de masa

Se confirmó el peso molecular de β 2S-PDZ por espectrometría de masa. La técnica permitió además confirmar la pureza de la muestra purificada.

Los experimentos de espectrometría de masa fueron realizados en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios en Péptidos y Proteínas (LANAIS-PRO) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA-CONICET). Se utilizaron las metodologías de ionización por *electrospray* (ESI, del inglés *electrospray ionization*) con un equipo LCQ Duo Ion Trap, o por desorción/ionización láser asistida por matriz

(MALDI, del inglés *matrix-assisted laser desorption/ionization*).

5.3. Determinación de la concentración

5.3.1. Fundamentos

Dado que β 2S-PDZ no posee residuos de triptofano (Trp) ni de tirosina (Tyr), la concentración de β 2S-PDZ se determinó utilizando la absorbancia a 214 nm (A_{214}). La base de esta forma de determinación de la concentración es que la A_{214} está dominada por las contribuciones de los enlaces peptídicos y de los residuos de fenilalanina, tirosina, triptofano, histidina, asparagina y glutamina. Para calcular el coeficiente de extinción molar a 214 nm (ϵ_{214}) de β 2S-PDZ se utilizó la siguiente ecuación [44]:

$$\epsilon_{214} = (N_{\text{res}} - 1 + N_{\text{Asn}} + N_{\text{Gln}}) \cdot 2846 + N_{\text{Tyr}} \cdot 5755 + N_{\text{His}} \cdot 6309 + N_{\text{Phe}} \cdot 7208 + N_{\text{Trp}} \cdot 22735 \quad (5.1)$$

donde N_{res} es el número de residuos de la proteína, y N_{Asn} , N_{Gln} , N_{Tyr} , N_{His} , N_{Phe} , N_{Trp} , son el número de residuos de asparaginas, glutaminas, tirosinas, histidinas, fenilalaninas y triptofanos, respectivamente.

5.3.2. Protocolo

Para la cuantificación por absorbancia a 214 nm se realizó, en todos los casos, una dilución 1:10 de la muestra concentrada de proteína en agua o en solución de fosfato de sodio 30 mM pH 7.5, y se restó el blanco correspondiente. Es importante tener presente que a 214 nm existen muchas sustancias contaminantes que absorben luz de esa longitud de onda en forma significativa, e incluso lo hacen algunos reactivos utilizados para preparar soluciones reguladoras de pH. Por este motivo, en este trabajo de tesis la determinación de la concentración se realizó en soluciones de fosfato de sodio o agua.

5.4. Caracterización de la estructura secundaria por CD

5.4.1. Fundamentos

El dicroísmo circular (CD, del inglés *circular dichroism*) es una técnica espectroscópica utilizada para estudiar características conformacionales de macromoléculas. En particular en el caso de las proteínas permite hacer inferencias acerca de

la estructura secundaria y terciaria de las mismas, por lo cual es una técnica útil y rápida para comprobar la integridad de una muestra proteica. Por otro lado, el CD se utiliza también como sonda en estudios de estabilidad termodinámica y de cinética de proteínas.

El efecto óptico llamado *dicroísmo circular* se debe a la absorción diferencial de los componentes de la luz polarizada. La luz polarizada en un plano se entiende como la sumatoria de dos componentes circularmente polarizados, uno levógiro (E_L) y otro dextrógiro (E_R), de igual magnitud. Cuando la luz polarizada atraviesa una muestra quiral, como lo es una solución de proteína, los componentes E_R y E_L son absorbidos de forma diferencial, de modo tal que la radiación resultante es elípticamente polarizada. Los espectropolarímetros miden la diferencia en la absorción de los componentes E_R y E_L ($\Delta E = E_R - E_L$), y lo reportan en términos de elipticidad (θ) en miligrados, siendo $\theta = \tan^{-1}(b/a)$, y donde b y a son los ejes menor y mayor de la elipse resultante. La relación entre ΔE y la elipticidad (en miligrados) es simplemente $\theta = 3298 \Delta E$. El espectro de CD se obtiene al medir θ en función de la longitud de onda [45, 46].

La elipticidad medida en el equipo se transforma a elipticidad molar según:

$$[\theta] = \frac{\theta}{10 \cdot [c] \cdot l \cdot n} \quad (5.2)$$

donde $[\theta]$ es la elipticidad molar ($\text{grados} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$), θ es la elipticidad en miligrados, $[c]$ la concentración molar de la proteína, l es el paso óptico de la celda en centímetros, y n el número de enlaces peptídicos de la proteína (número de residuos menos uno). Esta estandarización permite la comparación entre diferentes muestras.

El CD y la estructura secundaria de las proteínas

Los cromóforos en las proteínas son el enlace peptídico (por debajo de los 240 nm), los residuos aromáticos (entre los 260 y los 320 nm) y los enlaces disulfuro (bandas débiles de absorción en torno a los 260 nm). Algunos co-factores y ligandos también pueden inducir señales de CD en las muestras proteicas.

La información acerca de la estructura secundaria de las proteínas se obtiene a partir de los espectros de CD en la región UV-lejana, entre los 180 y los 240 nm (CD lejano). Los grupos amida del enlace peptídico tienen dos transiciones electrónicas, $n \rightarrow \pi^*$ y $\pi_0^* \rightarrow \pi^*$, con bandas de absorción a 215-230 nm y a 185-200 nm respectivamente. Estas transiciones generan los espectros característicos de los elementos de estructura secundaria: el espectro de CD-lejano de una proteína con una estructura compuesta solamente por hélices α presenta dos mínimos característicos en torno a los 222 nm ($n \rightarrow \pi^*$) y a los 208-210 nm ($\pi_0^* \rightarrow \pi^*$), y un máximo más intenso a 191-193 nm ($\pi_0^* \rightarrow \pi^*$). La intensidad de las tres bandas está relacionada con la cantidad

5.5. Caracterización por espectroscopía de resonancia magnética nuclear

de contenido helicoidal de la proteína. Las proteínas con estructuras exclusivamente β suelen presentar un mínimo que se encuentra generalmente entre los 210 y 225 nm ($n \rightarrow \pi^*$), aunque se han descrito algunos casos donde proteínas que son todas hebras β (determinado por resonancia magnética nuclear) tienen una banda negativa intensa alrededor de 200 nm, como los péptidos con estructura aleatoria [47], señal que se atribuye a la presencia de hebras- β cortas e irregulares. En el espectro de hebras β el máximo es de mayor intensidad que el mínimo, y aparece entre 190 y 200 nm ($\pi_0^* \rightarrow \pi^*$). Por último, las proteínas con estructura aleatoria presentan por lo general una banda negativa intensa cerca de 200 nm ($\pi_0^* \rightarrow \pi^*$) [2, 46]

5.4.2. Protocolo

La estructura secundaria de β 2S-PDZ fue analizada por espectroscopía de di-croísmo circular en el UV-lejano. Los espectros de CD-lejano fueron tomados a 20 °C. Se promediaron tres espectros de la solución blanco (fosfato de sodio 50 mM pH 7.5) y seis espectros de la solución de proteína, barriendo la región entre 180 nm y 240 nm. Además, para cada una de las muestras se tomó un espectro entre 180 nm y 340 nm, de modo de utilizar el promedio de la señal entre 320 nm y 340 nm para ajustar la línea de base (la elipticidad entre 320 y 340 nm es llevada a cero con este valor promedio). Los datos fueron posteriormente suavizados mediante un filtro de Savitzky-Golay, con una ventana de 4 puntos y un polinomio de orden 2 [48]. La señal registrada fue convertida a elipticidad molar según la Ecuación 5.2.

5.5. Caracterización por espectroscopía de resonancia magnética nuclear

5.5.1. Teoría básica de espectroscopía de resonancia magnética nuclear

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) está basada en una propiedad de los núcleos llamada *momento angular* o *spin*. Los núcleos atómicos con números másicos impares tienen un *spin*, mientras que los núcleos con números másicos pares pueden tener o no esta propiedad. Los núcleos con esta propiedad no son otra cosa que partículas con carga que giran en torno a un eje, lo que produce una corriente en un circuito cerrado, y por lo tanto un campo magnético [49].

En RMN de proteínas, los núcleos con *spin* más importantes son el ^1H , el ^{13}C y el ^{15}N . Dado que el ^{15}N y el ^{13}C no son los isótopos mas abundantes de nitrógeno y carbono respectivamente, para trabajar con RMN de proteínas es necesario producir las mismas marcadas isotópicamente con ^{15}N y/o ^{13}C . El *spin* de estos núcleos

presenta dos estados, denominados α y β . Estos dos estados normalmente tienen la misma energía y se encuentran igualmente poblados, pero en presencia de un campo magnético externo se separan en dos niveles de energía distintos, siendo el estado α de energía ligeramente más baja que el estado β . La diferencia de energía entre estos estados es proporcional a la fuerza del campo magnético externo y al radio giromagnético del núcleo (el cual es una constante intrínseca para cada núcleo). Esta diferencia de energías (o de frecuencias¹) es pequeña y es del orden de las radiofrecuencias (RF). El RMN se basa en la absorción diferencial de radiación del orden de las radiofrecuencias por los distintos núcleos activos. La frecuencia necesaria para que un núcleo entre en resonancia con el campo magnético externo depende de cada núcleo, y de la fuerza del campo magnético externo, y se denomina ‘frecuencia de resonancia’.

Los núcleos están rodeados de electrones que los protegen parcialmente del campo magnético externo al que se ven sometidos. Estos electrones se mueven generando un pequeño campo magnético inducido que se opone al campo magnético externo. El resultado de este fenómeno es que el campo magnético que realmente llega al núcleo es más débil que el campo externo, y por lo tanto, se dice que el núcleo está protegido o ‘apantallado’. Así, el valor del *spin* se ve afectado por el entorno químico del átomo, ya que el campo magnético efectivo sobre cada núcleo es la suma del campo aplicado junto con dos componentes. Una se debe a los *spins* de átomos vecinos. La otra surge de corrientes electrónicas locales inducidas por el campo magnético, es decir, del apantallamiento. Esto hace posible un espectro de RMN, en el cual diversos núcleos de un mismo tipo presentan frecuencias de resonancia ligeramente diferentes de acuerdo al entorno químico de cada uno. Es esta diferencia la que permite extraer información estructural de la molécula en cuestión. En una proteína, vista como una red muy compleja de átomos, cada átomo tiene un entorno distinto según la configuración espacial en la que se halle la molécula.

Como la diferencia de energía entre los estados α y β depende además del campo magnético aplicado, para independizarse del mismo se define el desplazamiento químico (δ):

$$\delta = 10^6[\nu - \nu_{ref}]/\nu_{ref}$$

donde ν es la frecuencia de resonancia del núcleo de interés y ν_{ref} es la frecuencia de resonancia de una referencia (sometida exactamente al mismo campo magnético que la muestra de interés). Las frecuencias de resonancia tienen valores en Hz muy bajos, por lo cual se multiplican por un millón; y la división por la ν_{ref} permite independizar el desplazamiento químico del campo magnético externo, y así poder comparar

¹La relación de proporcionalidad entre la frecuencia de rotación y la energía (E) de una partícula está dada por: $E = \hbar\omega$, donde ω es la frecuencia angular de la partícula y $\hbar$ es la constante de Planck reducida, $1,0546 \cdot 10^{-34} J \cdot s$

5.5. Caracterización por espectroscopía de resonancia magnética nuclear

muestras medidas en diferentes equipos o campos. El desplazamiento químico se informa en partes por millón (ppm) [50].

Acoplamiento escalar y acoplamiento dipolar

La influencia de los *spins* de un núcleo en los *spins* de los núcleos vecinos se manifiesta en un efecto que se conoce como *acoplamiento*. Hay dos tipos de acoplamiento. El *acoplamiento escalar*, que ocurre a través de los enlaces químicos entre dos núcleos, y el *acoplamiento dipolar* que ocurre a través del espacio. En el caso del acoplamiento escalar, al existir dos núcleos acoplados, uno de ellos ‘siente’ a través de los enlaces químicos un incremento o decremento de campo magnético debido al momento angular del núcleo vecino, que puede estar orientado paralelo o antiparalelo al campo aplicado. Cuando dos núcleos están acoplados, la señal de cada uno se presenta desdoblada en un doblete centrado en la frecuencia del momento angular de su núcleo. La separación de ambos desdoblamientos es la misma y toma una magnitud denominada *constante de acoplamiento escalar* (J , que tiene unidades de Hz). Esta constante depende de la estructura química de la molécula y no del campo magnético externo.

Si los dos núcleos son del mismo tipo, por ejemplo dos protones, el sistema se denomina *homonuclear*; si el sistema está compuesto por dos núcleos distintos, como es el caso del acoplamiento ^1H - ^{13}C , se trata de un sistema *heteronuclear* [49].

El acoplamiento dipolar, en cambio, se transmite a través del espacio, es decir, que se trata de la influencia de núcleos cercanos pero no directamente unidos por enlaces químicos. Requiere de proximidad espacial entre los núcleos, y varía con la inversa de la distancia a sexta potencia. Este tipo de acoplamiento se manifiesta a través del efecto conocido como NOE, (del inglés, *Nuclear Overhauser Effect*). El efecto NOE se puede entender de forma sencilla tomando en consideración dos núcleos activos cercanos en el espacio, no equivalentes. Cuando uno de estos núcleos es excitado, el dipolo magnético perturba el estado de equilibrio del otro núcleo (interacción dipolo-dipolo), produciéndose una transferencia de la magnetización a través del espacio de uno a otro núcleo. El cambio de intensidad de la señal originado por esta interacción dipolar es el efecto NOE. El acoplamiento dipolar también produce un desdoblamiento de la señal de RMN y está cuantificado por una constante de acoplamiento, en este caso, dipolar.

5.5.2. Asignación del espectro de RMN de proteínas

Fundamentos

El efecto del acoplamiento permite la transferencia de la magnetización entre dos núcleos acoplados y es la base de la espectroscopía multidimensional. En proteínas el

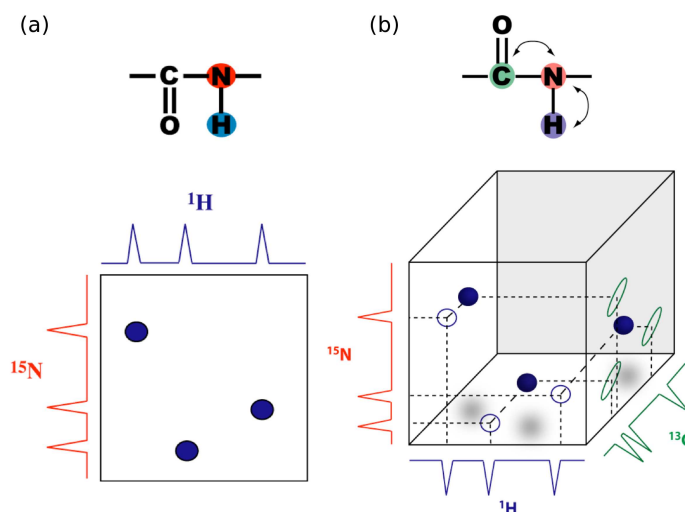


Figura 6. (a) Esquema de un espectro de RMN en dos dimensiones, que muestra el acoplamiento entre dos núcleos activos, ^{15}N y ^1H . (b) Esquema de un experimento de RMN en tres dimensiones, que muestra el acoplamiento entre los núcleos ^{15}N , ^{13}C y ^1H .

espectro de RMN base es el espectro bidimensional protón-nitrógeno (H-N). En este caso la transferencia de la magnetización se basa en el acoplamiento escalar entre el protón y el nitrógeno amídicos (H_N -N), unidos covalentemente con una constante de acoplamiento de 92 Hz. Las señales en este espectro bidimensional tienen como coordenadas el desplazamiento químico de cada núcleo, y surgen como un ‘pico cruzado’ (*crosspeak*) en ese espectro cada vez que existe un acoplamiento entre los núcleos de cada tipo (Figura 6(a)). Tomando como ejemplo el par H_N -N, dado que por cada residuo existe uno de estos pares, un espectro bidimensional de acoplamiento entre H y N debería presentar en principio tantos picos como residuos tenga la proteína (excepto en el caso de las prolinas, que no poseen protón amídico), más los picos correspondientes a las cadenas laterales de Trp, Gln y Asn, que aparecen en zonas características del espectro. Este hecho, sumado a que el nitrógeno es un núcleo cuyo desplazamiento químico es muy sensible al entorno químico, hacen que cada proteína presente un espectro bidimensional H-N característico, y así este espectro bidimensional H-N es una ‘huella dactilar’ de la proteína.

Los experimentos de tres dimensiones (3D) muestran la correlación entre tres núcleos activos, como se esquematiza en la Figura 6(b)

El espectro bidimensional H-N clásico en RMN de proteínas se denomina de *correlación cuántica simple heteronuclear* (^{15}N - ^1H -HSQC, del inglés *Heteronuclear Simple Quantum Correlation*), que muestra la correlación entre los protones amídicos (H_N) y el nitrógeno al cual se encuentran unidos. En este experimento la magne-

5.5. Caracterización por espectroscopía de resonancia magnética nuclear

tización es transferida desde un protón unido a un ^{15}N a través de un acoplamiento J_{HN} . El desplazamiento químico evoluciona desde el H_N al ^{15}N , y luego es transferido de vuelta al H_N donde se detecta. Como se mencionó anteriormente, el espectro que de ^{15}N - ^1H -HSQC es único para cada proteína. Cada pico representa el acoplamiento ^{15}N - H_N en cada enlace peptídico. Además, se pueden obtener señales de los enlaces ^{15}N - H_N de asparaginas, glutaminas, triptofanos, y, bajo determinadas condiciones experimentales, de argininas, lisinas e histidinas [51].

Para poder interpretar los espectros RMN es necesario primero asignarlos. El proceso de asignación implica asociar cada pico (cada resonancia) en el espectro de ^{15}N - ^1H -HSQC con un núcleo de la proteína, es decir, asociar cada pico a un residuo de la cadena polipeptídica. Para esto es necesario realizar una serie de experimentos en 3D complementarios entre sí, basados en el acoplamiento escalar entre los núcleos H_N -N, y en la tercera dimensión, con los carbonos del esqueleto peptídico. Este proceso es la ‘asignación del esqueleto carbonado’ de una proteína. Por otro lado, como el valor del desplazamiento químico y del acoplamiento varía con la conformación y el entorno químico en el que se encuentran los átomos, la asignación también permite obtener información conformacional asociada a cada residuo, en particular de la estructura secundaria de la proteína.

Experimentos en tres dimensiones

A continuación se describen brevemente los experimentos en 3D realizados en este trabajo de tesis para la asignación del espectro de ^{15}N - ^1H -HSQC de $\beta 2\text{S}$ -PDZ, que son los siguientes: HNCA, HNC(O), HN(CO)CA, CBCA(CO)NH, HN(CA)CO, CBCANH, 15N-NOESY y 15N-TOCSY.

- HNCA: en el experimento de HNCA la magnetización del H_N es transferida en primer lugar al nitrógeno amídico al cual está directamente unido, y luego del nitrógeno pasa al carbono α (C_α) del mismo residuo (residuo i) (Figura 7) via acoplamiento escalar $J_{\text{N}-\text{C}_\alpha}$, y al carbono α del residuo precedente (residuo $i-1$), que se encuentra a dos enlaces del N. De los dos C_α la magnetización retorna al protón amídico pasando por el nitrógeno. El nombre del experimento indica los núcleos por los cuales pasa la magnetización (H_N -N- C_α), y en la Figura 8 se muestra esquemáticamente como procede la transferencia de la magnetización.

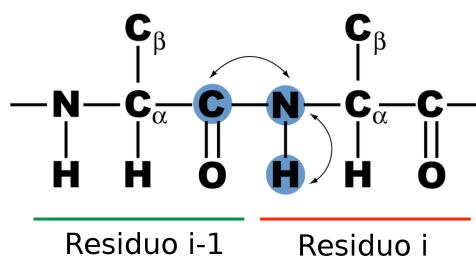


Figura 7. Nomenclatura. En los experimentos de RMN se indica a cada residuo como ‘Residuo i ’, y al residuo precedente en la secuencia como ‘Residuo $i-1$ ’.

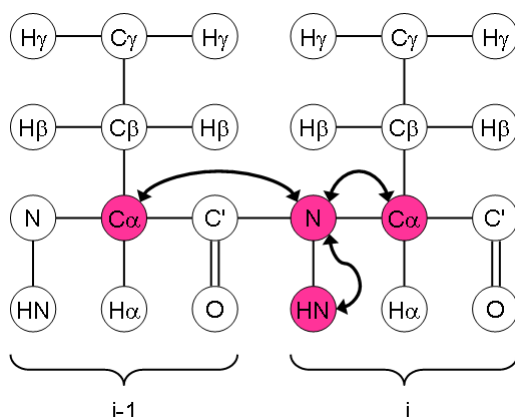


Figura 8. HNCA. Se muestra cómo procede la magnetización en el experimento de HNCA. Este experimento permite detectar al C_α del residuo i , y al C_α del residuo $i-1$.

El desplazamiento químico evoluciona tanto para el H_N como para el N y para el C_α , por lo que resulta en un espectro tridimensional. Dado que el N está acoplado tanto al C_α del residuo propio como al del residuo precedente, ocurren ambas transferencias y las constantes de acoplamiento no son tan diferentes (11 y 8 Hz, para el C del mismo residuo y del residuo precedente, respectivamente). Así, en el espectro de HNCA aparecen los dos C_α a un mismo valor de desplazamiento químico del N amídico: uno correspondiente al C_α del residuo i , centrado en la frecuencia $H_N(i)-N(i)$, y otro correspondiente al C_α del residuo $i-1$, centrado en la frecuencia $H_N(i)-N(i)-C_\alpha(i)$. Generalmente, el pico del C_α del residuo $i-1$ es menos intenso que el del residuo i .

- HNCO: La magnetización se transfiere desde el H_N al nitrógeno amídico, y luego selectivamente al carbono carbonílico (CO) via acoplamiento J_{N-CO} (15 Hz). La magnetización luego vuelve al H_N a través del nitrógeno amídico para su detección. Además, muestra las correlaciones CO-H-N de las cadenas laterales de Asn y Gln. Se utiliza para obtener el valor de desplazamiento químico

5.5. Caracterización por espectroscopía de resonancia magnética nuclear

(δ) del CO del residuo $i-1$. En la Figura 9 se muestra esquemáticamente como procede la transferencia de la magnetización.

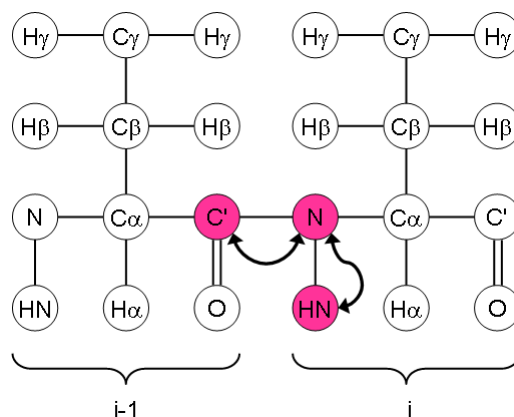


Figura 9. HNCO. Se muestra cómo procede la magnetización en el experimento de HNCO. Este experimento se utiliza para detectar al carbono carbonílico (CO) del residuo $i-1$.

- HN(CO)CA: el espectro de HN(CO)CA complementa al de HNCA para asignar las señales de los C_α . En este experimento la magnetización se transfiere del H_N al N y al CO. Luego es transferida al C_α del residuo $i-1$. El desplazamiento químico solo evoluciona para en H_N , el N, y el C_α del residuo $i-1$, pero no para el CO^2 . Este experimento genera un espectro similar al HNCA, pero selectivo para el C_α del residuo $i-1$, de modo que facilita distinguir los C_α entre sí. En la Figura 10 se muestra esquemáticamente como procede la transferencia de la magnetización.

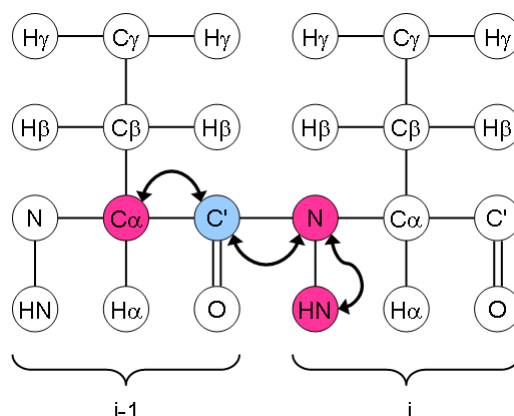


Figura 10. HN(CO)CA. Se muestra cómo procede la magnetización en el experimento de HN(CO)CA. Este experimento permite detectar al C_α del residuo $i-1$.

²Por ello en el nombre del experimento se indica el CO entre paréntesis (también puede encontrárselo indicado en minúscula), lo que indica que ese núcleo no se detecta.

- CBCANH: en este caso la magnetización es transferida desde el H_α y del H_β hacia el C_α y el C_β respectivamente; y luego desde el C_β al C_α . De aquí es transferido primero al N amídico y luego al H_N para su detección. La transferencia desde el $C_\alpha(i-1)$ puede ocurrir tanto hacia el N amídico $i-1$ como hacia el N del residuo i . De esta forma en el espectro se observan dos C_α y dos C_β por cada grupo amida. El desplazamiento químico evoluciona simultáneamente en el C_α y el C_β , de modo que ambos aparecen en una dimensión. Los desplazamientos químicos en las otras dos dimensiones son del H_N y del N amídico. En la Figura 11 se muestra esquemáticamente como procede la transferencia de la magnetización.

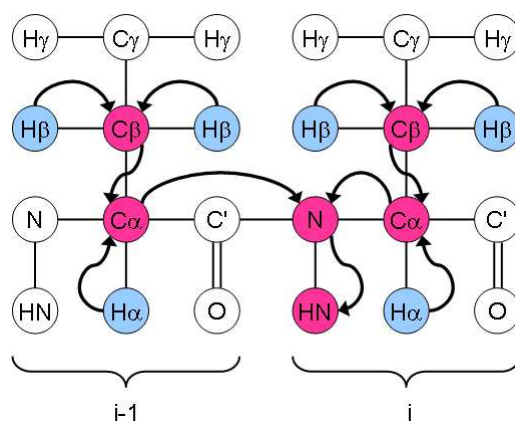


Figura 11. CBCANH. Se muestra cómo procede la magnetización en el experimento de CBCANH. Este experimento permite detectar al C_β y al C_α de residuo i , y también a los C_β y C_α de residuo $i-1$ aunque menos intensos.

- HN(CA)CO: en este caso la magnetización es transferida del H_N al N y luego al C_α a través del acoplamiento J_{N-C_α} . Luego es transferida al CO mediante acoplamiento $J_{C_\alpha-CO}$, evoluciona su desplazamiento químico, y vuelve de forma inversa para su detección. En el espectro tridimensional resultante se observa un pico en el carbono correspondiente al CO del residuo i , dado que el acoplamiento entre el N(i), y el $C_\alpha(i)$ es más fuerte. Sin embargo puede en algunos casos verse también el CO del residuo precedente cuyo acoplamiento N(i)- $C_\alpha(i-1)$, es menor. En la Figura 12 se muestra esquemáticamente como procede la transferencia de la magnetización.

5.5. Caracterización por espectroscopía de resonancia magnética nuclear

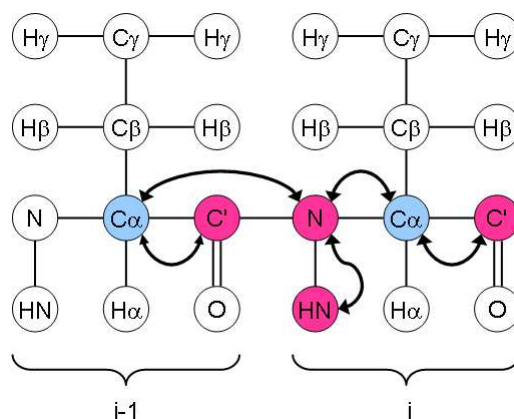


Figura 12. HN(CA)CO. Se muestra cómo procede la magnetización en el experimento de CBCANH. Este experimento permite detectar al carbono carbonílico del residuo i .

- **^{15}N -TOCSY:** (del inglés, *total correlation spectroscopy*) este es un experimento 3D donde la tercera dimensión es también el H. Después de un período isotrópico de mezcla, la magnetización se transfiere desde el protón amídico a todos los protones que forman parte del mismo sistema de *spins*. En la Figura 13 se muestra esquemáticamente como procede la transferencia de la magnetización.

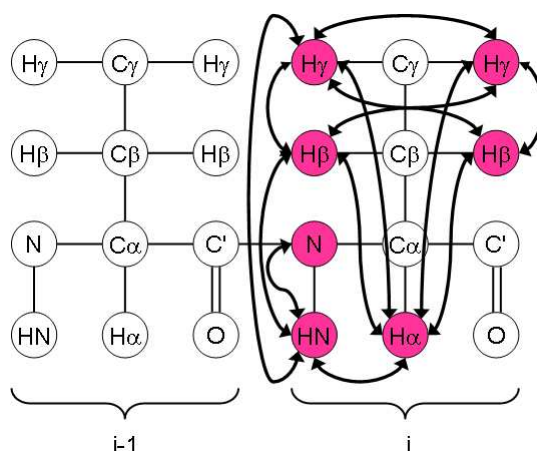


Figura 13. ^{15}N -TOCSY. Este experimento permite ver núcleos que están acoplados directamente y núcleos que están acoplados a un tercero en común, es decir, muestra la correlación de núcleos que se encuentran formando un sistema de *spin*.

- **^{15}N -NOESY:** (del inglés, *nuclear Overhauser effect spectroscopy*) también en este caso la tercera dimensión es el H. En los espectros de NOESY se pueden observar las interacciones entre protones debido al acoplamiento dipolar, es decir, a través del espacio. Por lo tanto, la correlación entre dos señales indica que los hidrógenos responsables de esta correlación están cercanos en la estructura tridimensional, sin importar el número de uniones químicas que

los separen. La magnetización se transfiere durante un período de mezcla determinado desde un núcleo a otro cercano en el espacio; cuanto más largo es este tiempo de mezcla, mayor es el alcance de la transferencia de la magnetización, correlacionando núcleos más lejanos entre sí. Este es el espectro base para determinar la estructura 3D de una proteína. En la Figura 14 se muestra esquemáticamente como procede la transferencia de la magnetización.

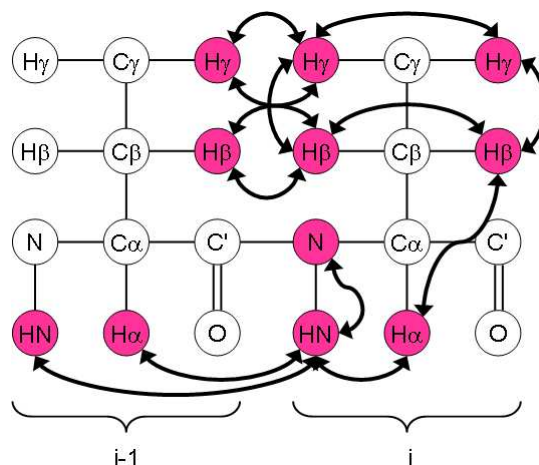


Figura 14. NOESY. Este experimento permite ver el acoplamiento dipolar entre protones. El espectro de NOESY muestra todas las combinaciones posibles de protones en la molécula. Un cruce de picos indica que el par de protones está separado por menos de 5 Å, mientras que la ausencia de un pico indica una distancia mayor.

Protocolo

Se expresó β 2S-PDZ en medio mínimo suplementado con $^{15}\text{N-NH}_4\text{Cl}$ (^{15}N - β 2S-PDZ) para los experimentos en dos dimensiones, y con $^{15}\text{N-NH}_4\text{Cl}$ y ^{13}C -glucosa (^{15}N - ^{13}C - β 2S-PDZ) para los experimentos en tres dimensiones. Los experimentos en dos dimensiones se realizaron con una concentración de β 2S-PDZ de 100 μM , y los experimentos en tres dimensiones con una concentración de 380 μM . En todos los casos se utilizó solución de fosfato de sodio 50 mM pH 7.5, suplementada con agua deuterada (D_2O) a una concentración de 5 % v/v final. En el Apéndice B se encuentran tabulados los valores de desplazamiento químico de los núcleos determinados.

Todos los espectros fueron procesados con el programa NMRPipe [52], y analizados con el programa NMRView [53]. El proceso de asignación de la cadena carbonada se realizó de forma manual, combinando la información aportada por los experimentos 2D y 3D.

La validación de la asignación se realizó con el programa TALOS+ [54]. TALOS+ es un programa que se utiliza para predecir la estructura secundaria de una proteína en solución a partir de cinco valores de desplazamiento químico por residuo del

5.5. Caracterización por espectroscopía de resonancia magnética nuclear

esqueleto carbonado ($H\alpha$, $C\alpha$, $C\beta$, C carbonílico, N amídico). El programa TALOS+ se basa en el hecho de que los desplazamientos químicos se correlacionan con la estructura secundaria de la proteína; y predice el valor de los ángulos de torsión ϕ y ψ del esqueleto carbonado para cada residuo i , considerando los valores de desplazamiento químico del residuo $i-1$ y del residuo $i+1$ (y por ende es necesario conocer la estructura primaria). Posteriormente confronta los valores predichos con aquellos disponibles en una base de datos. Como en nuestro caso disponíamos de las estructuras secundaria y terciaria de $\beta 2$ -PDZ, esta estrategia nos sirvió para validar el espectro asignado.

Agradecemos el trabajo de la Dra. Mariana Gallo y del Dr. Martín Arán, quienes interpretaron y analizaron todos los espectros hasta lograr la asignación (y validación) del espectro de $\beta 2$ S-PDZ.

5.5.3. Determinación del radio hidrodinámico por RMN

Fundamentos

El radio hidrodinámico (R_h) de una proteína se define como el radio de una esfera rígida equivalente, con el mismo coeficiente de difusión que la proteína. El R_h da una estimación del tamaño de una proteína globular, de modo que es un parámetro útil para determinar el estado de agregación, la forma hidrodinámica que adopta la proteína en solución, la presencia de ligandos, cambios conformacionales, etc. En el caso particular de esta tesis, la medición del R_h se realizó para determinar el estado de agregación de $\beta 2$ S-PDZ en las condiciones de trabajo usuales.

El R_h puede ser determinado por dispersión dinámica de luz, o por resonancia magnética nuclear [55]. La determinación del R_h por RMN implica la determinación del coeficiente de difusión según la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D_{dif} = \frac{k_b \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R_h} \quad (5.3)$$

donde D_{dif} es el coeficiente de difusión, k_b es la constante de Boltzmann, T es la temperatura en grados Kelvin y η es la viscosidad de la solución de proteína.

Los coeficientes de difusión D_{dif} se miden por RMN con una serie de experimentos de gradiente de campo pulsado (PFG, del inglés *pulse field gradient*), en los cuales la fuerza global del gradiente, XG_{max} , es aumentada progresivamente en cada experimento. La señal atenuada de RMN (I_{medida}) sigue la siguiente ecuación:

$$\frac{I_{medida}}{I_0} = -\exp \left[D_{dif} \cdot \left(\gamma_H \cdot \delta XG_{max} \cdot \frac{2}{\pi} \right)^2 \cdot \left(\Delta - \frac{\delta}{3} - \frac{\tau}{2} \right) \right] \quad (5.4)$$

donde I_{medida} es la intensidad medida del pico, I_0 es la intensidad máxima del pico

(que corresponde a la menor fuerza de gradiente utilizada), D_{dif} es el coeficiente de difusión traslacional de la molécula (en m^2/s), γ_H es la constante giromagnética del hidrógeno (26.75222127 107 rad/sT), δ es la duración del gradiente (en ms), G_{max} es la máxima fuerza de gradiente utilizada, X es la fracción de G_{max} utilizada en cada experimento, Δ es el tiempo de difusión (el tiempo entre gradientes, que se determina experimentalmente para cada molécula), y $\tau = 100\mu s$.

De la pendiente del gráfico del $\ln(\frac{I_{\text{medida}}}{I_0})$ vs. X^2 se obtiene D_{dif} . Para determinar el R_h de $\beta 2S$ -PDZ en este trabajo, para independizarnos fundamentalmente de la viscosidad de la solución, se usó como estándar interno de R_h conocido el dioxano (diox). El R_h se obtiene según la ecuación:

$$R_{h,\text{eff}}^{\text{prot}} = R_h^{\text{diox}} \cdot \frac{D^{\text{diox}}}{D^{\text{prot}}} \quad (5.5)$$

donde $R_{h,\text{eff}}^{\text{prot}}$ es el R_h efectivo de la proteína, R_h^{diox} es el R_h del dioxano (2.12 Å), D^{diox} y D^{prot} son los coeficientes de difusión traslacional del dioxano y de la proteína de interés respectivamente.

Protocolo

Para la determinación del radio hidrodinámico se utilizó una solución de $\beta 2S$ -PDZ 93 μM a la cual se agregó dioxano hasta una concentración de 0.07 % p/v para ser usado como estándar interno. El dioxano es una molécula chica ($R_h^{\text{diox}} = 2.12$ Å), y su utilización en este caso permite independizar al experimento de la viscosidad y la temperatura. Además, el dioxano no interactúa con las proteínas, y su valor de desplazamiento químico aparece en una región del espectro que no interfiere con las señales de las proteínas (3.8 ppm). La medición se realizó a 20 °C en fosfato de sodio 50 mM pH 7.

Se realizaron experimentos de PFG en los cuales se aumentó gradualmente X , la fuerza del gradiente, y se calibra Δ de modo tal que, entre el primer experimento, con menor fuerza de gradiente, y el último, con mayor fuerza de gradiente, la señal decaiga en un 10-15 % respecto del valor original. Esto se realiza tanto para la proteína como para el dioxano. De la relación de pendientes de los gráficos $\ln(\frac{I_{\text{medida}}}{I_0})$ vs. X^2 para el dioxano y para la proteína se determinó el R_h de $\beta 2S$ -PDZ.

5.5.4. Experimentos de dinámica: T_1 , T_2 y NOE heteronuclear

Fundamentos

Como se mencionó anteriormente, cuando se coloca una muestra en un campo

5.5. Caracterización por espectroscopía de resonancia magnética nuclear

magnético la interacción de los núcleos con momento angular (*spin*) con el campo genera una ocupación desigual de los estados energéticos α y β de los núcleos, y en el equilibrio el resultado es una magnetización neta de la muestra en la dirección del campo magnético aplicado (tradicionalmente el eje z). En este contexto, ‘equilibrio’ es un estado en el cual las poblaciones en los niveles de energía son aquéllas predichas por la distribución de Boltzmann, y en el cual no existe magnetización transversal (en el plano x - y). La magnetización puede ser representada por un *vector magnetización*, y como es paralela al campo aplicado se denomina *magnetización longitudinal*.

La aplicación de pulsos de radiofrecuencia (RF) permite rotar al vector magnetización fuera del eje z , sacándolo de su posición de equilibrio. Si se aplica un pulso de RF a 90 grados respecto del campo magnético se genera la *magnetización transversal* de la muestra. Esta magnetización ($M_z(0)$) tiende a volver a la posición de equilibrio (M_z^0) a través de un proceso denominado *relajación*. La relajación involucra dos procesos: el retorno a la posición de equilibrio de las poblaciones de los estados α y β , y el decaimiento de la magnetización transversal a cero.

El primer mecanismo puede ser pensado como *transiciones* de los momentos angulares entre los estados α y β hasta volver a la posición de equilibrio. Este mecanismo de relajación es descrito por la Ecuación 5.6:

$$M_z(t) = [M_z(0) - M_z^0] \exp(-R_z t) + M_z^0 \quad (5.6)$$

que indica que la magnetización vuelve desde $M_z(0)$ hacia el equilibrio M_z^0 con una tasa exponencial cuya constante de tiempo es $1/R_z$, conocida como T_1 , o *tiempo de relajación longitudinal*.

El segundo mecanismo de relajación es la *relajación transversal*. Cada momento angular de la muestra es un vector con componentes en x - y - z cuya suma es el vector magnetización- z ya mencionado. La dirección en la que apunta cada uno de estos vectores es especificada por su *fase*, el ángulo que forman con el eje x . En el equilibrio, las fases se distribuyen aleatoriamente y las contribuciones de cada núcleo se compensan, de modo tal que la magnetización transversal neta es cero. Luego de un pulso de RF, las fases se distribuyen de forma no aleatoria, con tendencia hacia una dirección, generando la magnetización transversal de la muestra, o, en términos de la mecánica cuántica, el pulso de RF genera una *coherencia*. La relajación transversal *destruye* esta coherencia de fases, y es representada por la *constante de tiempo de relajación transversal* o T_2 [49].

Por otra parte, el NOE es un efecto de *relajación cruzada*, a través de las interacciones dipolares. Cada núcleo en movimiento produce un pequeño campo magnético, que actúa como un pequeño pulso de RF. Considerando un sistema de dos momentos angulares S e I no equivalentes, cuando uno de ellos es excitado el dipolo magnético

generado perturba el estado de equilibrio del otro, produciendo la relajación cruzada: S relaja a I, y viceversa. La tasa de relajación cruzada es dependiente de la distancia, proporcional a r^{-6} , donde r es la distancia internuclear. Para estudiar la dinámica interna de las proteínas, interesa determinar el NOE entre el protón y el nitrógeno del enlace amida de la cadena carbonada, por eso se denomina ‘heteronuclear’ (hnNOE). El valor típico de hnNOE para un residuo del centro hidrofóbico de una proteína es de 0.75-0.85; mientras que valores más bajos, incluso negativos, se asocian a movimientos más rápidos que el movimiento general de la molécula en solución (*tumbling*).

En general, los mecanismos por los cuales un núcleo se relaja están asociados a la generación de campos magnéticos fluctuantes con la frecuencia y la orientación adecuados. Estos dipolos fluctuantes se producen por el movimiento molecular en solución, y por eso el estudio de la relajación brinda información sobre la dinámica de proteínas. Los mecanismos físicos de relajación del ^{15}N son conocidos, de modo tal que éste es el núcleo preferido para el estudio de la dinámica molecular de una proteína. Los tiempos de relajación del ^{15}N están relacionados con los tiempos de correlación rotacional de las proteínas, así como con la flexibilidad de segmentos individuales de la cadena polipeptídica (la dinámica interna), la reorientación de la molécula y otras propiedades físicas.

En este trabajo de tesis se realizaron experimentos de T_1 , T_2 y hnNOE para estudiar la dinámica interna del esqueleto carbonado de $\beta 2\text{S-PDZ}$, es decir, la flexibilidad de la cadena carbonada principal independientemente del movimiento global de la proteína en solución. Estos movimientos internos se detectan como una desviación de los valores medios del parámetro de relajación en cuestión. Por ejemplo, los tipos de movimientos veloces (más rápidos que el *tumbling*) que ocurren en una escala de tiempo de entre 10 picosegundos y 10 nanosegundos, se observan como un aumento del T_2 y una disminución del hnNOE, y un aumento o disminución del T_1 , de acuerdo al tiempo de correlación rotacional de la proteína. Además, pueden estudiarse movimientos más lentos que tienen lugar en un rango temporal de entre 10 microsegundos y 100 milisegundos, a partir del experimento de T_2 . Estos movimientos lentos se reflejan en una disminución del valor medio de T_2 .

Los valores promedio de los tiempos de relajación del ^{15}N T_1 y T_2 también se utilizan para calcular el *tiempo de correlación rotacional* (τ_c). El tiempo de correlación rotacional es la constante de tiempo para la difusión-rotación browniana de una partícula en solución, indica cuánto tiempo le toma una partícula en rotar un radián, y depende del tamaño de la partícula. El valor de τ_c también permite deducir el estado de oligomerización de la proteína.

Para proteínas rígidas, de movimientos lentos y en un campo magnético superior

5.5. Caracterización por espectroscopía de resonancia magnética nuclear

a los 500 MHz, el τ_c se calcula como:

$$\tau_c = \frac{1}{4\pi\nu_N} \cdot \sqrt{6\frac{T_1}{T_2} - 7} \quad (5.7)$$

donde ν_N es la frecuencia de resonancia del ^{15}N en Hz, y los valores de T_1 y T_2 son los valores promedio.

Protocolos

Para estudiar las propiedades dinámicas de $\beta 2\text{S-PDZ}$ a 25°C se determinaron los tiempos de relajación de los ^{15}N de la cadena carbonada. Los experimentos consisten básicamente en coleccionar espectros de HSQC a distintos tiempos (tiempos de espera o *delay*) luego de la aplicación del pulso de RF, de modo tal que la intensidad de la señal al último tiempo sea aproximadamente un 15 % de la intensidad al tiempo inicial o t_1 . Lo que se registra es el decaimiento de la magnetización siguiendo la intensidad de la señal a los tiempos de espera.

Las mediciones de T_1 y T_2 del ^{15}N fueron realizadas a la frecuencia de 60.81 MHz, con una concentración de proteína de 140 μM , y usando esquemas estándar de pulsos. Los tiempos de espera fueron:

- T_1 : 0.007; 0.1; 0.3; 0.5; 0.8 y 1 (milisegundos)
- T_2 : 0.01696; 0.03392; 0.05088; 0.06784; 0.0848 y 0.10176 (milisegundos)

El procesamiento de los datos se realizó con el programa NMRView. El decaimiento de la intensidad de los picos es exponencial y viene descripto por la Ecuación 5.8, la cual se ajusta a los datos experimentales:

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{T_{1,2}}\right) \quad (5.8)$$

donde t es el tiempo de espera, en milisegundos. La misma ecuación se utiliza para la obtención del T_1 y el T_2 . Para la determinación del hnNOE se midieron dos espectros de HSQC, uno con saturación del protón, y otro sin saturación. El período de saturación del protón fue de 3 segundos. Los valores de hnNOE representan la razón de la altura de los picos entre los espectros saturado y no saturado. Los errores se calcularon como la desviación estándar del ruido en una región libre de picos de los espectros.

Es común graficar los resultados de los experimentos de dinámica por RMN como las inversas de T_1 y T_2 , es decir $R_1 = 1/T_1$ y $R_2 = 1/T_2$. En este trabajo de tesis presentaremos los resultados de esta manera.

Capítulo 6

Caracterización termodinámica y estructural de la desnaturalización

6.1. Desnaturalización seguida por CD

6.1.1. Fundamentos

El propósito principal de los estudios de desnaturalización en condiciones de equilibrio es la caracterización termodinámica de la reacción de plegado. Básicamente, la estrategia consiste en evaluar el estado conformacional de una muestra de proteína en equilibrio en distintas condiciones de temperatura o de concentración de un agente caótrofo. La evaluación del estado conformacional de la proteína se hace comúnmente midiendo una señal espectroscópica que refleja el contenido de estructura secundaria y/o terciaria. En el caso de las desnaturalizaciones térmicas, la velocidad de incremento de la temperatura debe ser suficientemente lenta para asegurar que en todo momento el sistema esté cerca del equilibrio. Además, la reversibilidad de la transición se comprueba por el proceso inverso, o sea, recuperando la señal de partida luego de enfriar la muestra a la temperatura inicial. En el caso de las desnaturalizaciones químicas, la condición de equilibrio se logra incubando la proteína en cada concentración de desnaturalizante durante un tiempo que se determina en cada caso.

Con las curvas de señal en función de la perturbación (temperatura o concentración de caótrofo), y modelos matemáticos adecuados, se pueden encontrar de manera indirecta los parámetros termodinámicos característicos que mejor ajustan el modelo a los datos experimentales. En el caso más común se utiliza un modelo de dos estados, donde los parámetros termodinámicos que caracterizan a la transición son la diferencia de entalpía (ΔH_U), la diferencia de energía libre (ΔG_U) y la diferencia de la capacidad calorífica (ΔC_{P_U}) entre los estados N y U. Además se pueden obtener fácilmente la temperatura de máxima estabilidad del estado N ($T_{\max}$) y la

temperatura media de transición (T_m), que es la temperatura a la cual el 50 % de las moléculas de proteína se haya en el estado nativo.

Las curvas de desnaturalización (o termogramas, si una de las variables independientes es la temperatura) así obtenidas, son monodimensionales, ya que son vectores que registran el valor de una señal, por ejemplo, la señal de CD a una longitud de onda fija, en función de la variable independiente. La desventaja de estas metodologías consiste en que difícilmente una señal única puede reflejar el estado conformacional global de una proteína. Por ejemplo, mientras que la señal de CD a 220 nm responde a la contenido de hélices α , la señal a 208 nm refleja el contenido de hebras β . En proteínas que siguen un modelo de dos estados ambas señales varían de manera concertada, y, dada su intensidad, se suele asumir la señal de CD a 220 nm como una señal global.

Aunque existe una gran cantidad de bibliografía que avala esta elección, la teoría sostiene que existen modelos de plegado donde los distintos elementos de estructura secundaria de una proteína no responden de manera concertada a la perturbación. Este comportamiento solo se podría observar si se miden varias sondas a la vez, obteniéndose un termograma multidimensional. Como ha sido el caso del presente trabajo, el experimento se podría realizar obteniendo un espectro de CD completo cada 2 °C o a cada concentración de desnaturalizante. Los datos obtenidos de esta manera son matrices, y su análisis requiere de otro tipo de herramientas matemáticas.

A continuación se describen en detalle los protocolos, los modelos matemáticos y las herramientas de análisis utilizados en este trabajo de tesis.

6.1.2. Protocolos

Todas las medidas de dicroísmo circular fueron realizadas en un espectropolarímetro Jasco-810, acoplado a un sistema de regulación de la temperatura tipo Peltier, utilizando una celda de cuarzo con paso óptico de 0.1 cm. A menos que se indique lo contrario, la toma de espectros se realizó con una velocidad de barrido de 50 nm/min, un tiempo de respuesta de 1 s y un ancho de banda de 1 nm. La recolección de datos se realizó cada 0.2 nm, y la sensibilidad utilizada fue de 100 mdeg.

Desnaturalización química

Se prepararon muestras de β 2S-PDZ 10 μ M con distintas concentraciones de urea (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6 y 7 M final), en solución de fosfato de sodio 50 mM pH 7.5. Luego de incubar estas muestras durante 1-2 horas a temperatura ambiente se midieron espectros de dicroísmo circular entre 240 y 340 nm.

La concentración de la solución madre de urea fue determinada por refractometría. La relación entre el índice de refracción (n) de la solución de urea y la solución acuosa de fosfato de sodio en la cual se disuelve la urea es $\Delta n = n_{\text{urea}} - n_{\text{sol.}}$, y se relaciona con la concentración de urea según [56]:

$$[urea] = 117,66\Delta n + 29,753(\Delta n)^2 + 185,568(\Delta n)^3$$

Desnaturalización térmica

Termograma a longitud de onda fija. Se sometió a β 2S-PDZ a un gradiente de temperaturas entre 4 °C y 90 °C realizado a una velocidad constante de 2 °C/min. Se registró la señal a 220 nm a lo largo del gradiente ya que a esa longitud de onda es posible detectar cambios en la composición helicoidal de la estructura proteica. La concentración de β 2S-PDZ fue de aproximadamente 10 μ M, y se determinó exactamente para cada experimento. Los experimentos fueron realizados en soluciones de fosfato de sodio 50 mM pH 7.5 y 9.4.

Termograma espectral. Se realizó un ensayo de desnaturalización térmica como se indica en el párrafo anterior (a pH 7.5), pero en este caso se registró un espectro entre 200 y 240 nm a lo largo del gradiente de temperatura. La velocidad de barrido de los espectros fue de 10 nm/min, con un ancho de banda de 2 nm, la recolección de datos se realizó cada 0.2 nm, y se dejó estabilizar la temperatura durante 30 segundos antes de tomar cada espectro. Al barrer un espectro completo de CD-lejano es posible detectar la presencia de un punto isodicroico y estudiar la dependencia de la señal con la longitud de onda.

Desnaturalización por doble perturbación

Se estudió el efecto de una desnaturalización térmica y química en simultáneo. Se prepararon muestras de β 2S-PDZ de aproximadamente 10 μ M (la concentración fue determinada exactamente para cada caso) en solución de fosfato de sodio 50 mM pH 7.5 con distintas concentraciones de urea (0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2 y 7 M final). Las muestras fueron incubadas 1-2 hs a temperatura ambiente, y posteriormente se sometieron a una desnaturalización térmica registrando la señal a 220 nm, como se indicó en la sección anterior.

6.1.3. Modelos de ajuste y procesamiento de datos

El procesamiento de los datos se realizó utilizando el paquete R de programas

estadísticos [57]. Los ajustes se realizaron por regresión no-lineal, utilizando el criterio de cuadrados mínimos. Las ecuaciones de los modelos de dos y de tres estados utilizados para el ajuste se describen a continuación. Las planillas de R (*scripts*) utilizadas para el análisis de datos estarán disponibles en una carpeta de Dropbox durante 2015:

<https://www.dropbox.com/sh/7u0hixjfzjkjokgy/AADTEE3VQr3cWC0Qt9BZjB01a?dl=0>

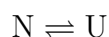
Por cualquier duda o comentario dirigirse a la autora del presente trabajo de tesis: gabriela_torchio@yahoo.com.ar

La señal experimental, la elipticidad molar, en el equilibrio (S) puede modelarse como:

$$S = \sum_i S_i \cdot f_i \quad (6.1)$$

donde i es cada uno de los estados discretos presentes en el equilibrio, S_i es la señal correspondiente al estado i y f_i es la fracción molar del estado i .

Para ajustar un modelo de dos estados



la señal S toma la siguiente forma:

$$S = S_N \cdot f_N + S_U \cdot f_U \quad (6.2)$$

donde S_N y S_U son la señales del estado N y del estado U respectivamente, y f_N y f_U son las fracciones molares de los estados N y U respectivamente. Las fracciones molares están relacionadas por la constante de desdoblamiento en el equilibrio K_U según:

$$K_U = \frac{f_U}{f_N} \quad (6.3)$$

$$K_U = \exp \left[\frac{-\Delta G_U}{RT} \right] \quad (6.4)$$

donde ΔG_U es el cambio de energía libre durante el proceso de desdoblamiento, R es la constante universal de los gases ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), y T es la temperatura expresada en Kelvin.

Para el ajuste de un modelo de tres estados



la señal S toma la siguiente forma:

$$S = S_N \cdot f_N + S_I \cdot f_I + S_U \cdot f_U \quad (6.5)$$

donde S_I y f_I son la señal y la fracción molar del estado intermediario I. Las constantes de equilibrio de la primera y de la segunda etapa son, respectivamente:

$$K_1 = \frac{f_I}{f_N} = \exp \left[\frac{-\Delta G_{N-I}}{RT} \right] \quad (6.6)$$

$$K_2 = \frac{f_U}{f_I} = \exp \left[\frac{-\Delta G_{I-U}}{RT} \right] \quad (6.7)$$

En este trabajo de tesis la línea de base del estado nativo, S_N , fue modelada considerando una dependencia lineal de la señal con la temperatura y con la concentración de urea. La construcción de la línea de base del estado desplegado, S_U , se realizó ajustando la curva de desplegado en 7 M urea, condición en la cual la proteína se encuentra completamente desplegada, a una ecuación polinómica de grado 3, que luego fue utilizada como línea de base S_U para todas las otras curvas:

$$S_N = a_1 + a_2 \cdot T + a_3 \cdot [urea] \quad (6.8)$$

$$S_U = a_4 + a_5 \cdot T + a_6 \cdot T^2 + a_7 \cdot T^3 \quad (6.9)$$

La línea de base del estado I fue modelada según:

$$S_I = S_N + a_8 \quad (6.10)$$

donde a_{1-8} son parámetros variables en el ajuste.

En el caso de los experimentos de desnaturalización química, la dependencia de la energía libre con la concentración de desnaturalizante está dada por [58]:

$$\Delta G_U = \Delta G_U^{H_2O} + m \cdot [urea] \quad (6.11)$$

donde $\Delta G_U^{H_2O}$ es la energía libre de desplegado en ausencia del agente caótrofo, y m es un coeficiente relacionado con la superficie accesible al solvente de la proteína.

En el caso de los experimentos de desplegado térmico, la variación de energía libre en función de la temperatura está dada por la ecuación de Gibbs-Helmholtz:

$$\Delta G_U = \Delta H_{T_m} + \Delta C_P \cdot (T - T_m) - T \cdot \left(\frac{\Delta H_{T_m}}{T_m} + \Delta C_P \cdot \ln \frac{T}{T_m} \right) \quad (6.12)$$

Los valores de la temperatura de mayor estabilidad T_{max} , y de energía libre a la T_{max} , ΔG_U^{max} , fueron calculados a partir de la Ecuación 6.12 usando los valores ajustados.

Descomposición en valores singulares

La descomposición en valores singulares (SVD, del inglés *singular value decomposition*) es una herramienta en el álgebra lineal que se utiliza para extraer la información principal contenida en conjuntos de datos voluminosos, y que por lo general presentan mucho ruido, como es el caso del termograma espectral descrito en la sección 6.1.2. Los datos experimentales se presentan como una matriz, que llamamos matriz A , y el objetivo es reducir el elevado número de dimensiones de esta matriz de datos. La SVD permite descomponer a la matriz de datos A en otras tres matrices, cada una de las cuales tiene diferentes propiedades:

$$A = U \cdot D \cdot V^T \quad (6.13)$$

donde A es la matriz de datos originales y tiene $m \times n$ dimensiones. U es una matriz ortogonal de $m \times m$, cuyas columnas forman los vectores $u_1, \dots, u_m$, y se los denomina *vectores singulares por izquierda* de A . D es una matriz diagonal de $m \times n$; los valores en la diagonal de D son los llamados *valores singulares*, que se ordenan de forma decreciente, de modo tal que $D_{i,i} \geq D_{(i+1)(i+1)}$, y son siempre mayores que cero. V^T es la transpuesta de una matriz ortogonal V , de $n \times n$. Las n columnas de V son los llamados *vectores singulares por derecha* de A . Si las tres nuevas matrices fueran multiplicadas, el producto resultante sería semejante, pero no idéntico, a la matriz original, ya que una vez reducida la información de A solo puede ser reconstituida la información esencial.

El análisis por SVD de los termogramas espectrales de la sección 6.1.2 se realizó con el paquete ‘SVD’ de R. Se calculó una matriz de componentes como $U \cdot D$, donde las columnas de la matriz U , que contiene la información espectral, son pesadas por los valores singulares de la diagonal de la matriz D . La matriz V contiene la variación de cada componente de U con la temperatura. El producto de $D \cdot V^T$ permite construir una matriz de curvas de desnaturalización fenomenológicas. Los vectores relevantes de esta última matriz permitieron reconstruir la curva de desnaturalización dada por los componentes principales del conjunto de datos originales.

6.2. Calorimetría Diferencial de Barrido

6.2.1. Fundamentos

La técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC, del inglés *differential scanning calorimetry*) se basa en la medición de la absorción o liberación de calor por parte de una muestra durante un incremento o disminución de la temperatura del sistema, es decir, mide la capacidad calorífica del sistema en función de la temperatura. La ventaja principal de la calorimetría frente a otras técnicas es que permite medir directamente la entalpía de un proceso; mientras que con otras técnicas como el CD o la fluorescencia la entalpía se obtiene de manera indirecta, ajustando modelos matemáticos a la señal experimental. En el contexto del plegado proteico, la DSC es utilizada para determinar los parámetros termodinámicos absolutos de una transición inducida por temperatura, la capacidad calorífica de las proteínas, y la función de partición (y por lo tanto las poblaciones de estados intermediarios)[59].

En este trabajo de tesis se evaluó un modelo de dos estados para los experimentos de DSC, desarrollado recientemente por el grupo de Víctor Muñoz y Sánchez Ruiz [17]. Este modelo, llamado ‘de barrera variable’, está basado en los trabajos de Landau (ref. 15 en [17]) y de Freire (ref. 23 en [17] y [60]), y permite discriminar entre una transición de desplegado que ocurre cruzando una barrera energética y una transición que ocurre sin cruzar una barrera. La ventaja de este modelo es que permite incorporar la energía de la barrera energética como variable en las ecuaciones.

6.2.2. Protocolo

Para la realización de los experimentos de DSC, β 2S-PDZ fue previamente dializada contra una solución de fosfato de sodio 50 mM pH 7.5, y luego centrifugada para eliminar posibles agregados. La solución de diálisis fue utilizada como referencia. Tanto la muestra de proteína como la muestra de referencia fueron degaseadas antes de ser colocadas en el calorímetro.

Los experimentos fueron realizados utilizando concentraciones de proteína entre 50 y 200 μ M. El gradiente de temperaturas se realizó entre $\sim 10 - 90$ °C, a una velocidad de 90 °C/hora. Durante las corridas se aplicó una presión de 26 psi para evitar la formación de burbujas en las celdas de la muestra y de la referencia. Antes y después de cada medición se registraron 2 a 7 líneas de base para asegurar que el calorímetro se mantuviese equilibrado. En todos los casos se comprobó la reversibilidad del proceso de desnaturalización sometiendo a la misma muestra a dos o tres corridas sucesivas.

6.2.3. Modelos de ajuste y procesamiento de datos

Para el procesamiento de datos de DSC se utilizó el paquete de programas estadísticos R, y el programa Origin®. Las planillas de R utilizadas para el análisis de datos estarán disponibles en una carpeta de Dropbox durante 2015:

<https://www.dropbox.com/sh/7u0hixjfkjokgy/AADTEE3VQr3cWCOQt9BZjB01a?dl=0>

Por cualquier duda o comentario dirigirse a la autora del presente trabajo de tesis: gabriela_torchio@yahoo.com.ar

La señal que se obtiene en el calorímetro es la capacidad calorífica de la solución presente en la celda, en función de la temperatura. Para poder obtener la capacidad calorífica molar de la proteína (C_P) se procedió a procesar los datos experimentales como se describe a continuación.

La capacidad calorífica de la solución de referencia, $C_{p,b}$, es:

$$C_{P,b} = m_b \cdot C_{P,b}^o \quad (6.14)$$

donde m_b es la masa del solvente en la celda de referencia y $C_{P,b}^o$ es la capacidad calorífica específica de la solución de referencia. La capacidad calorífica de la solución de proteína, $C_{P,p}$, se escribe como:

$$C_{P,p} = m_p \cdot C_{P,p}^o + m_b' \cdot C_{P,b}^o \quad (6.15)$$

o donde $C_{P,p}^o$ es la capacidad calorífica específica de la proteína, m_p es la masa de proteína en la celda calorimétrica, y m_b' es la masa de solvente en la solución de proteína. $C_{P,p}^o$ es:

$$C_{P,p}^o = \frac{(C_{P,p} - C_{P,b}) + (m_b - m_b') \cdot C_{P,b}^o}{m_p} \quad (6.16)$$

La cantidad $m_b - m_b'$ es la masa de solvente desplazada por la proteína, y puede reescribirse en términos del volumen parcial específico de la proteína (V_p^0) y del solvente (V_b^0):

$$C_{P,p}^o = \frac{(C_{P,p} - C_{P,b})}{m_p} + C_{P,b}^o \cdot \frac{V_p^o}{V_b^o} \quad (6.17)$$

La capacidad calorífica molar de la proteína, C_P , se obtiene multiplicando $C_{P,p}^o$ por el peso molecular (PM) de la proteína:

$$C_P = C_{P,p}^o \cdot PM \quad (6.18)$$

Modelo de barrera variable

El modelo de barrera variable fue desarrollado para el análisis de experimentos de DSC, ya que la capacidad calorífica obtenida con esta técnica puede relacionarse

directamente con la función de partición del sistema. El modelo describe el proceso de plegado–desplegado de proteínas como una distribución continua de microestados. La función de partición (Q) del sistema es:

$$Q = \int \rho(H) \cdot \exp\left(\frac{-H}{RT}\right) \cdot dH \quad (6.19)$$

donde cada microestado se caracteriza por un valor de entalpía H , independiente de la temperatura, y $\rho(H)$ representa la densidad de los microestados. La probabilidad de encontrar a la proteína en un microestado de entalpía H a una temperatura T ($P(H|T)$) está dada por:

$$P(H|T) = \frac{1}{Q} \cdot \rho(H) \cdot \exp\left(\frac{-H}{RT}\right) \cdot dH \quad (6.20)$$

La relación entre las probabilidades a la temperatura T y a una temperatura característica T_0 está dada por:

$$P(H|T) = C \cdot P(H|T_0) \cdot \exp(-\lambda H) \quad (6.21)$$

donde

$$\lambda = \frac{1}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \quad (6.22)$$

y C es una constante determinada por la condición de normalización $\int P(H|T) dH = 1$.

Los momentos de entalpía pueden escribirse como:

$$\langle H^n \rangle = \int H^n \cdot P(H|T) \cdot dH = C \cdot \int H^n \cdot P(H|T_0) \cdot \exp(-\lambda H) \cdot dH \quad (6.23)$$

Interesa determinar la capacidad calorífica en exceso, es decir, la capacidad calorífica una vez restado el componente intrínseco de las proteínas, $C_{P,N}$ o capacidad calorífica del estado nativo (ver próxima sección). La capacidad calorífica en exceso puede escribirse como:

$$C_P^{EX} = \frac{d\langle H \rangle}{dT} = \frac{\langle H^2 \rangle - \langle H \rangle^2}{RT^2} \quad (6.24)$$

de esta forma es posible calcular la capacidad calorífica en exceso en función de la temperatura si se conoce $P(H|T_0)$. Esta probabilidad $P(H|T_0)$ puede obtenerse a partir del ajuste del modelo a los termogramas de DSC. Para ello el modelo define $P(H|T_0)$ como:

$$P(H|T_0) = C' \cdot \exp\left(\frac{-G_0(H)}{RT_0}\right) \quad (6.25)$$

6.2. Calorimetría Diferencial de Barrido

donde $G_0(H)$ es la función de energía libre y C' es una constante que resulta de la condición de normalización $\int P(H|T_0) \cdot dH = 1$ una vez que se obtuvo $G_0(H)$. En este modelo $G_0(H)$ se expande como una serie de potencias de H , truncando la expresión en la cuarta potencia, y asume que los coeficientes de los términos de potencia impar son cero a la temperatura T_0 :

$$G_0(H) = -2\beta \cdot \left(\frac{H}{\alpha}\right)^2 + |\beta| \cdot \left(\frac{H}{\alpha}\right)^4 \quad (6.26)$$

Los parámetros β y α introducidos en la ecuación anterior dan una idea de la altura de la barrera energética del proceso de plegado, y de la asimetría en los mínimos de energía libre de los estados N y U respectivamente (Figura 15). Si se resuelve $dG_0/dH = 0$, y se evalúa d^2G_0/dT^2 en las raíces, se obtiene que para $\beta > 0$ $G_0(H)$ tiene un máximo en $H = 0$ y dos mínimos en $H = \pm\alpha$. De esta forma, para $\beta > 0$ existen dos macroestados con una diferencia de entalpía de $\sim 2\alpha$. En este caso β corresponde a la altura de la barrera energética que separa a los dos mínimos a la temperatura T_0 ($G_0(0) - G_0(\pm\alpha) = \beta$). Para valores de $\beta < 0$, $G_0(H)$ presenta un solo mínimo en $H = 0$ y existe solo un macroestado. En este caso β es solo un parámetro que, junto con α , describe la forma de la función de energía libre. De esta forma, el signo de β determina la existencia de dos macroestados o de un macroestado a la temperatura T_0 . El parámetro α permite dar cuenta de la asimetría en los mínimos de energía libre entre el estado N y el estado U, introduciendo un parámetro α para valores negativos de entalpía (α_N), y otro parámetro α para valores positivos de entalpía (α_P). El efecto del parámetro α en la función de energía libre se aprecia en la Figura 15 (e y g).

Procedimiento de ajuste

Los termogramas de DSC incluyen la contribución de las fluctuaciones de entalpía intrínsecas de las proteínas, de modo tal que se debe realizar una sustracción de la capacidad calorífica intrínseca del estado nativo ($C_{P,N}$) a los datos experimentales. La $C_{P,N}$ puede describirse según la ecuación empírica propuesta por Freire (ver referencia 23 en [17]), según la cual la capacidad calorífica del estado N se calcula directamente del PM de las proteínas:

$$C_{P,N} = (1,323 + 6,7 \cdot 10^{-3} \cdot (T - 273,15)) \cdot PM \quad (6.27)$$

De esta forma, la capacidad calorífica en exceso experimental (se denomina ‘en exceso’ porque durante la transición la capacidad calorífica de una proteína ya no es atribuida a un solo estado, sino que aparecen contribuciones de todos los estados

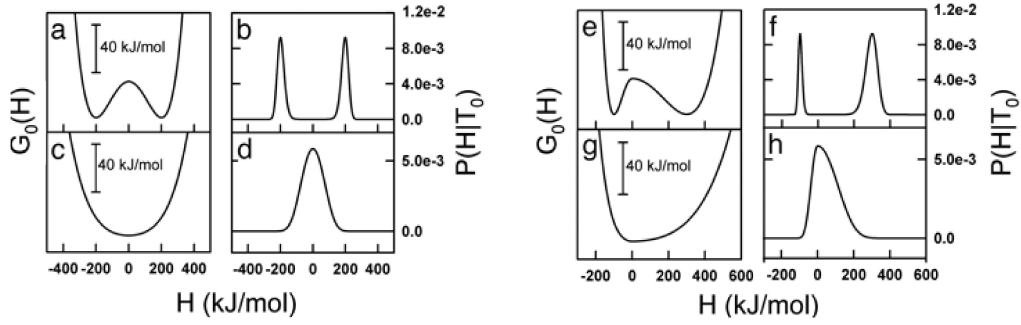


Figura 15. Gráficos de la energía libre vs. entalpía $G_0(H)$ (a, c, e y g) y de las distribuciones de probabilidad vs. entalpía $P(H|T_0)$ (b, d, f y h), todos a la temperatura T_0 . El perfil de energía libre calculado con un valor de β positivo presenta dos mínimos separados por una barrera energética (a); mientras que con un valor de β negativo presenta un solo mínimo de energía libre (c). Para el caso (a) existen dos distribuciones de probabilidad a la T_0 , indicando la presencia de dos estados termodinámicos claramente diferenciados (b). En el caso (c) existe un único estado termodinámico a la T_0 (d). (a) y (c) fueron calculados considerando un factor de asimetría $\alpha=1$. El efecto de la introducción de un factor $\alpha < 1$ se aprecia en las figuras (e), para un valor de β positivo, y (g) para un valor de β negativo. (f) y (h) corresponden a las distribuciones de probabilidad para (e) y (g) respectivamente. Puede verse como la introducción del factor de asimetría afecta el ancho relativo de los mínimos de energía libre. Figura tomada de [17].

que se pueblan durante la transición) es:

$$C_{P,exp}^{EX} = C_P - C_{P,N} \quad (6.28)$$

donde C_P es la obtenida con la Ecuación 6.18 a partir de los datos experimentales.

La integración numérica de la Ecuación 6.23 con $n = 1$ y $n = 2$ permite obtener el primer y el segundo momento de entalpía, con los cuales, en la Ecuación 6.24, se puede obtener la función de capacidad calorífica en exceso teórica (C_P^{EX}) que se utiliza para modelar los datos experimentales.

Para el ajuste es conveniente definir:

$$\Sigma\alpha = \alpha_N + \alpha_P \quad (6.29)$$

$$\alpha_N = \frac{\Sigma\alpha \cdot f}{2} \quad (6.30)$$

$$\alpha_P = \frac{\Sigma\alpha \cdot (2 - f)}{2} \quad (6.31)$$

donde f es un factor de asimetría de modo tal que si $f = 1$ la capacidad calorífica es igual para ambos mínimos a la T_0 , mientras que si $f < 1$ la capacidad calorífica de los macroestados de baja entalpía es menor que la capacidad calorífica de los estados de alta entalpía.

6.2. Calorimetría Diferencial de Barrido

A modo demostrativo se realizó un ajuste utilizando el programa Origin ®. Se utilizó el modelo ‘*non-two states*’ incluido en el programa, ya que este modelo no asume que la entalpía calorimétrica y la entalpía de Van’t Hoff sean iguales, como sí lo asumen los modelos de dos estados incluidos en el programa. El modelo ‘*non-two states*’ requiere la substracción de una línea de base, de construcción esencialmente arbitraria. Las ecuaciones del modelo figuran en el Apéndice A.

6.3. Perturbación térmica seguida por RMN

6.3.1. Fundamentos

El proceso de desnaturalización se puede analizar con mayor resolución recurriendo a la resonancia magnética nuclear [18, 61]. El procedimiento consiste básicamente en evaluar en distintas condiciones de temperatura el desplazamiento químico de varios residuos de una proteína marcada con ^{15}N y/o con ^{13}C . El desplazamiento químico de cada residuo es sensible tanto a cambios conformacionales en el elemento de estructura secundaria donde se encuentra, como al entorno químico. De esta forma es posible construir una curva de desplazamiento químico versus temperatura para cada residuo de la cadena carbonada. En principio estas curvas podrían relacionarse con la desnaturalización de la proteína, y obtener así un panorama de entorno químico y conformacional de cada residuo a lo largo de una curva de desnaturalización convencional. El objetivo de realizar este análisis con $\beta 2\text{S}$ –PDZ fue determinar si diferentes regiones de la proteína respondían diferencialmente al incremento de la temperatura del sistema.

6.3.2. Protocolos

Se tomaron espectros de ^{15}N – ^1H –HSQC de $\beta 2\text{S}$ –PDZ a temperaturas crecientes entre 5 °C y 50 °C, cada 5 °C, y posteriormente se volvió a tomar un espectro a 25 °C para comprobar la reversibilidad del proceso. Se utilizó ^{15}N – $\beta 2\text{S}$ –PDZ en una concentración de 102 μM , en solución de fosfato de sodio 50 mM pH 7.5, suplementada con D_{20} en una concentración final de 5 % v/v.

Los espectros fueron procesados con el programa NMRPipe [52], y analizados con el programa NMRView [53]. Dado que en esta instancia ya se contaba con la asignación del espectro de ^{15}N – ^1H –HSQC de $\beta 2\text{S}$ –PDZ, fue posible identificar cada residuo en los distintos ^{15}N – ^1H –HSQC (con excepción de los 9 residuos que no pudieron ser asignados, ver la Sección 7.2.1).

Parte III

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Capítulo 7

Producción de β 2S–PDZ y caracterización estructural y dinámica

7.1. Producción de β 2S–PDZ

En medio LB durante 4 hs a 37 °C la cantidad de β 2S–PDZ producida resultó insuficiente para nuestros objetivos (Figura 16). El rendimiento no mejoró significativamente al pasar a un protocolo de inducción de 16-18 hs a 18 °C, y por este motivo se optó por utilizar otros medios de cultivo.

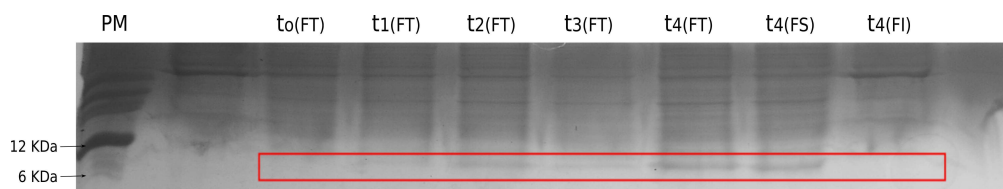


Figura 16. Expresión de β 2S–PDZ en medio de cultivo LB. Las muestras en las calles denominadas t_0 (FT), t_1 (FT), t_2 (FT), t_3 (FT) y t_4 (FT) corresponden a la fracciones totales (FT) del lisado celular, inmediatamente antes de la inducción de la expresión (t_0); luego de una (t_1), dos (t_2), tres (t_3) y cuatro (t_4) horas después de la inducción . FS y FI se refieren a las fracciones soluble e insoluble luego de la lisis celular respectivamente; PM es el marcador de peso molecular. En todas las calles (excepto PM) se sembraron 10 μ l de muestra, y el volumen total de cultivo fue de 2 litros.

La expresión de β 2S–PDZ en medio *Terrific Broth* (TB), con una inducción de 18-20 horas a 18 °C, permitió incrementar la cantidad de proteína expresada entre 10 y 100 veces; y por ende aumentar el rendimiento luego de su purificación. De este modo se eligió este medio para la expresión de β 2S–PDZ a lo largo de todo el

trabajo de tesis (excepto para los experimentos de RMN, para lo cual se expresó a la proteína en medio mínimo). La expresión en medio TB no modificó la partición de β 2S-PDZ en la fracción soluble luego de la lisis celular.

El cultivo de bacterias en medio TB incrementa de manera notoria la cantidad de ADN en la preparación final, por lo cual es necesario tratar intensivamente a la fracción soluble luego de la ruptura celular con DNasa. Los intentos de eliminar el ADN reteniéndolo en matrices de intercambio aniónico (como *Q-sepharose* o DEAE-celulosa) resultaron infructuosos, con pérdida de una importante masa de β 2S-PDZ.

Por otro lado, los clones almacenados por más de 6 meses pierden su capacidad de expresión. Por este motivo, todos los procedimientos de expresión de β 2S-PDZ se realizaron utilizando clones de *E. coli* BL21 (DE3) pLys periódicamente transformados con pET9b- β 2S-PDZ.

La expresión en medio mínimo (MM) no modificó significativamente el nivel de expresión de β 2S-PDZ respecto de la expresión en medio TB (no mostrado). Al expresar en MM, una fracción de β 2S-PDZ se localizó en la fracción insoluble, pero no se intentó purificar proteína desde esta fracción. Es frecuente que proteínas que son solubles cuando la expresión se induce con lactosa, presenten una fracción insoluble al inducir su expresión con IPTG.

Durante la primera etapa de este trabajo de tesis se puso a punto el protocolo de purificación de β 2S-PDZ. La utilización de la cromatografía de exclusión molecular con matrices *Sephacryl S100*, *Superosa12* y *Superdex75* luego de la lisis celular no permitía obtener β 2S-PDZ un nivel de pureza aceptable, motivo por el cual se introdujo la precipitación con NH_4Cl como paso previo a la cromatografía. La precipitación con NH_4Cl permitió eliminar de la muestra gran cantidad de contaminantes, sin pérdida de β 2S-PDZ, a juzgar por SDS-PAGE.

Los procesos de cromatografía de exclusión molecular diluyen las muestras, lo cual en nuestro caso, con un rendimiento de la expresión relativamente bajo, es una desventaja relevante. Por este motivo se ensayaron protocolos de purificación basados en intercambio iónico, aprovechando el pI alto de β 2S-PDZ. La purificación realizada como se describe en la Sección 4.4 permitió obtener un rendimiento de β 2S-PDZ de aproximadamente 1 mg de proteína por litro de cultivo, con una pureza de al menos 95 % en un SDS-PAGE, lo cual consideramos aceptable para los objetivos de esta tesis.

7.2. Caracterización estructural

7.2.1. Análisis bioinformático

El análisis de la estructura primaria con la herramienta ProtParam permitió cal-

cular una masa de 8955.4 Da (sin la metionina inicial) y un punto isoelectrico (pI) teórico de 10.9 para β 2S-PDZ.

La estructura depositada en el PDB (con el código 2vrf) es de una variante de β 2S-PDZ, ligeramente diferente de la utilizada en esta tesis. La estructura en el PDB consiste en 95 residuos, donde los 8 residuos ubicados en el extremo C corresponden a un ligando de PDZ. De esta manera, la estructura cristalina consiste en un dímero donde el extremo C de un protómero interactúa con el dominio PDZ del otro.

El dominio β 2S-PDZ que se usó en esta tesis abarca los residuos Val-113 a Lys-195 (según la numeración del PDB), que conforman el dominio PDZ de β 2-sintrofina propiamente dicho, y cuya secuencia primaria es:

VRRVR VVKQE AGGLG ISIKG GRENR MPILI SKIFP GLAAD QSRAL RLG
DA ILSVN GTDLR QATHD QAVQA LKRAG KEVLL EVK

Los dominios PDZ presentan estructuras altamente conservadas (Figura 17). La hélice α B y el *loop* que conecta con el extremo N de la hebra β F contienen los residuos más importantes para la interacción con ligandos. Cerca de este *loop* se encuentran la Lys-120 (altamente conservada entre los PDZ) y la Lys-184 (ver Figura 40), residuos positivos también involucrados en la unión del ligando [23].

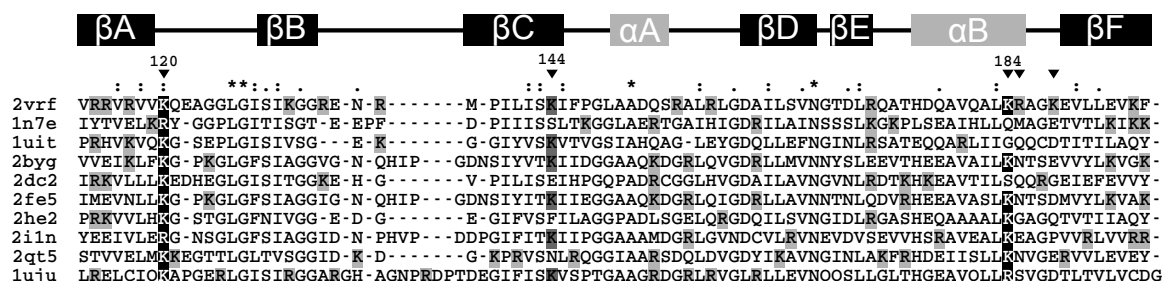


Figura 17. Alineamiento estructural de un conjunto de baja redundancia de dominios PDZ. Las cajas indican la posición canónica de los elementos de estructura secundaria. Los triángulos apuntan a los residuos básicos relevantes para la función del dominio o presentes solamente en β 2S-PDZ. Solo los aminoácidos básicos fueron destacados: los más conservados en negro, los menos conservados en gris. En la columna de la izquierda se indican los códigos del PDB de cada estructura: β 2S-PDZ (2vrf), dominios PDZ6 y PDZ12 de la proteína de interacción con el receptor de glutamato (1n7e y 1qt5, respectivamente), cuarto dominio PDZ de la proteína scribble-2 (1uju), segundo y tercer dominios PDZ de PSD-93 (2byg y 1he2, respectivamente), dominio PDZ asociado a Golgi (2dc2), primer y segundo dominios PDZ del DLG3 (2fe5 y 2i1n, respectivamente) y PDZ2 de PTP-BL (1gm1).

β 2S-PDZ presenta algunas particularidades respecto a la distribución de residuos cargados que lo diferencian de otros dominios PDZ. El potencial electrostático de varios dominios PDZ, calculado con el método APB solver de VMD, muestra que

β 2S-PDZ presenta una distribución más densa de cargas positivas alrededor del *loop* de unión de ligandos (Figura 18), asociada a la presencia de aminoácidos no conservados cargados positivamente, dos de los cuales están ubicados en el extremo C de la hélice α B (Figura 19). Así, en una extensión de cinco residuos, β 2S-PDZ posee tres residuos cargados positivamente (Lys-184, Arg-185 y Lys-188), que junto con Lys-120 configuran una región con un potencial positivo alto. Aunque este arreglo parece característico de los dominios PDZ de otras sintrofinas, β 2S-PDZ presenta tres residuos adicionales de arginina respecto del dominio PDZ de α 1-sintrofina (α 1S-PDZ). En el trabajo de Harris *et al.* [23], se describen dos curvas de desnaturación química en condiciones distintas de fuerza iónica, las cuales demuestran que α 1S-PDZ es un dominio más estable que β 2S-PDZ. Estos análisis nos llevaron a pensar que la distribución de cargas podría ser la responsable del inusual comportamiento de β 2S-PDZ en comparación con otros dominios PDZ.

Teniendo esto en cuenta, construimos un mapa de contactos de cuatro dominios PDZ (Figura 20) que demuestra la presencia de un mayor número de contactos positivos repulsivos en β 2S-PDZ. Estos contactos involucran a residuos en el *loop* de unión de ligandos, el *loop* entre las hebras β A y β B, y la interacción entre las Arg-114 y Arg-158. Es interesante notar que los estudios de Gianni *et al.* [29] demuestran que el *loop* entre las hebras β A y β B forma un agrupamiento (*cluster*) de interacciones nativas en las etapas iniciales del plegado del dominio PDZ2 de PTP-BL, el cual no tiene estas interacciones repulsivas.

En relación a su función biológica, recordemos que β 2S-PDZ es el dominio a través del cual la proteína β 2-sintrofina interactúa con la proteína ICA512, la cual a su vez une a la proteína utrofina, anclando los gránulos de secreción de insulina al citoesqueleto de actina. De esta forma, β 2S-PDZ tiene un rol activo en la regulación de la secreción de insulina. La regulación de la interacción entre β 2S-PDZ e ICA512 se da a través de la fosforilación de dos residuos de serina que se encuentran muy cercanos al dominio β 2S-PDZ en β 2-sintrofina [62, 37, 36] (entre β 2S-PDZ y el primer dominio PH, ver Figura 2.2). La fosforilación/desfosforilación de estas serinas regula la afinidad de β 2S-PDZ por su ligando. Dada la particular distribución de cargas en la superficie de β 2S-PDZ, es posible que la regulación de la afinidad se produzca a través de modulaciones en la estructura tridimensional de β 2S-PDZ dadas por interacciones electrostáticas.

7.2.2. Determinación del peso molecular por espectrometría de masa

El PM del dominio β 2S-PDZ puro fue confirmado por espectrometría de masa (Figura 21). En el espectro se observan dos especies mayoritarias, una de 9087.8 Da,

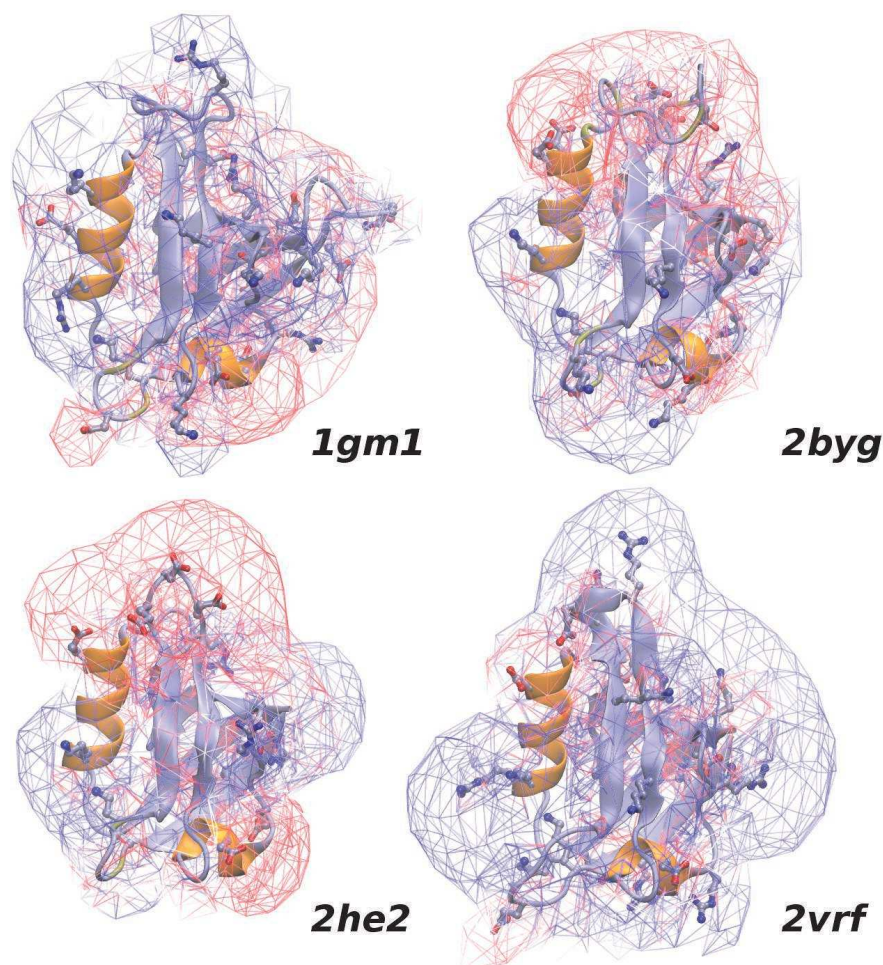


Figura 18. Potencial electrostático calculado sobre las estructuras de cuatro dominios PDZ, utilizando el método *APB Solver* implementado en VMD. Las estructuras analizadas fueron PDZ2 de PTP-BL (*1gm1*), segundo y tercer dominios PDZ de PSD-93 (*2byg* y *1he2*, respectivamente) y β 2S-PDZ (*2vrf*). Las superficies se representan como una red de líneas correspondiente a valores unitarios negativos (rojo) o positivos (azul) de potencial electrostático. Las proteínas se representaron como cintas con los residuos cargados positivamente en esferas y palitos.

y otra de 8956.8 Da, que se atribuyeron a especies de β 2S-PDZ con la metionina inicial y sin ella. Estas especies no se resuelven en un SDS-PAGE ni con las técnicas cromatográficas utilizadas en esta tesis. Dado que la especie mayoritaria corresponde a la forma sin la metionina inicial, se consideró que el PM de β 2S-PDZ es de 8956.8 Da tanto para los experimentos como para el análisis de los datos.

7.2.3. Análisis de la estructura secundaria por CD

Los espectros de CD en el UV-lejano de β 2S-PDZ se muestran en la Figura 22. A 20 °C presenta dos mínimos, uno en torno a 208 nm y otro a 225 nm, y una banda en torno a los 212 nm, lo cual indica que se trata de una estructura secundaria

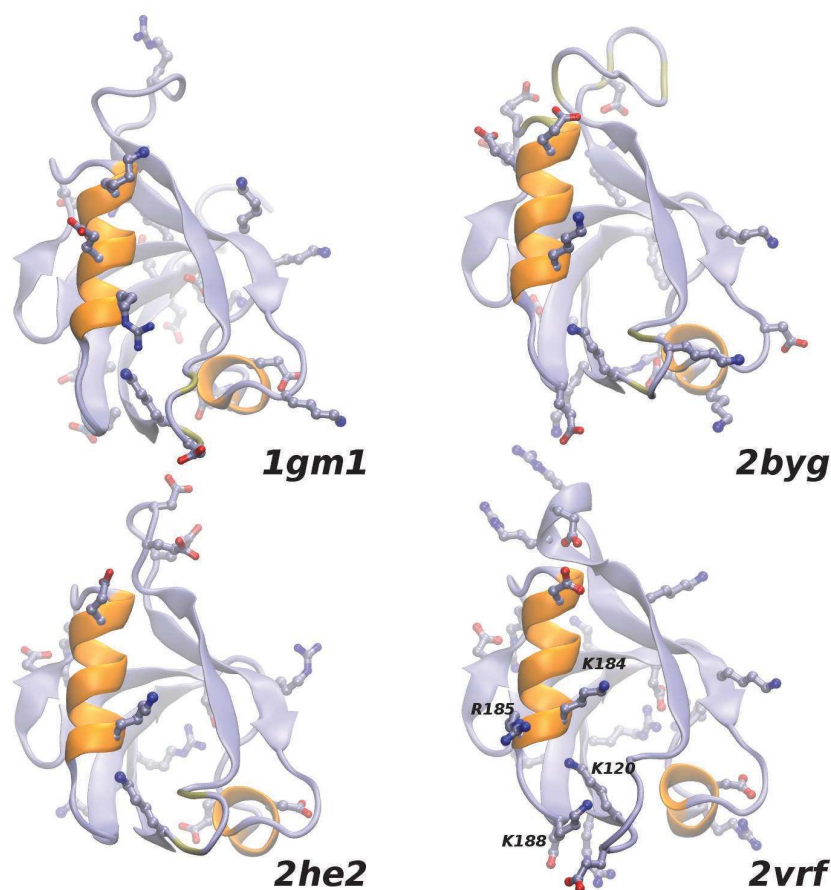


Figura 19. Representación de cintas de cuatro dominios PDZ. PDZ2 de PTP-BL (*1gm1*), segundo y tercer dominios PDZ de PSD-93 (*2byg* y *1he2*, respectivamente) y β 2S-PDZ (*2vrf*). En primer plano se muestran la hélice α B y el bolsillo de unión a ligandos. Las cadenas laterales de los residuos cargados se muestran en las estructuras. Se etiquetaron los aminoácidos más relevantes en β 2S-PDZ.

de tipo $\alpha+\beta$, como se esperaba para β 2S-PDZ según la estructura cristalográfica reportada [46]. Por otro lado, no se observa a esta temperatura una banda a 200 nm que señale la presencia de elementos desestructurados. La muestra incubada a 90 °C posee un espectro con una banda de absorción en torno a los 200 nm, característico de proteínas que se despliegan parcialmente, y que en condiciones desestabilizantes poseen algún grado de estructura secundaria α -helicoidal residual [63]. Por otro lado, puede observarse que a 4 °C el espectro varía ligeramente a bajas longitudes de onda, posiblemente indicando el comienzo de un proceso de desnaturalización a bajas temperaturas.

7.2.4. Asignación del espectro de ^{15}N - ^1H -HSQC

La Figura 23 muestra el espectro de ^{15}N - ^1H -HSQC de β 2S-PDZ. La alta resolución de los picos confirma que se trata de una proteína con estructura tridimensional

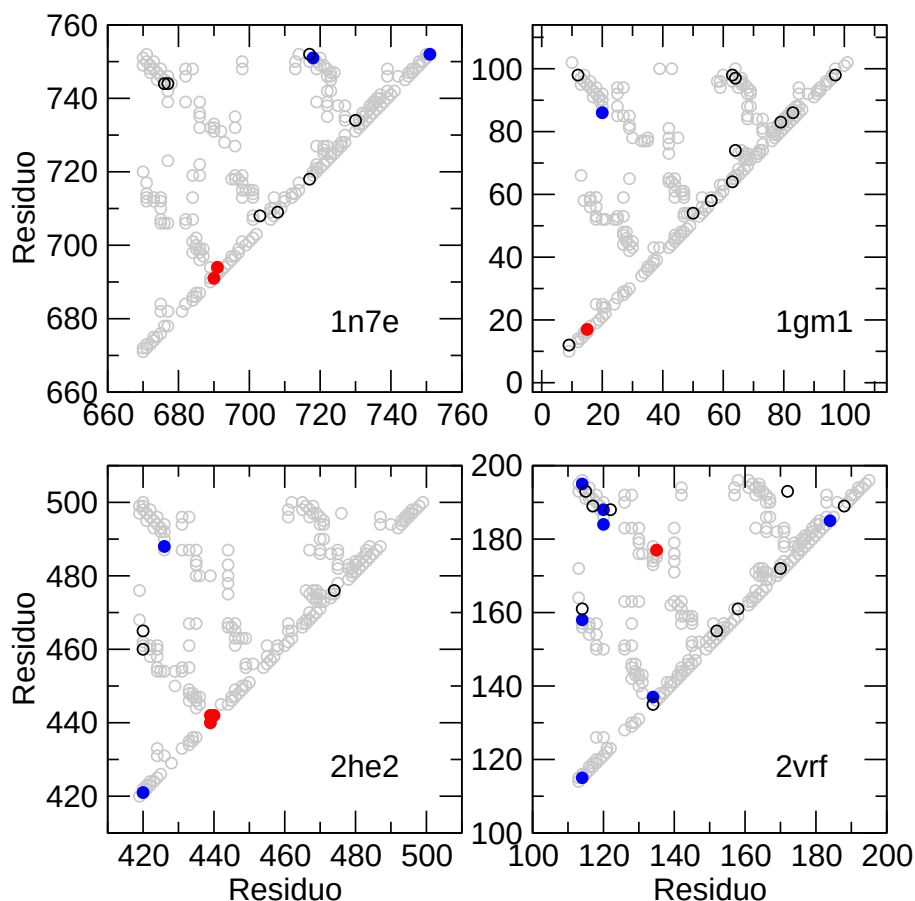


Figura 20. Mapas de contactos de $C\beta$ para cuatro dominios PDZ. Los círculos corresponden a los contactos repulsivos positivos (*círculos azules*), contactos repulsivos negativos (*círculos rojos*), contactos atractivos (*círculos vacíos negros*) y contactos no iónicos (*círculos vacíos grises*). Los códigos del PDB se indican en cada panel, y corresponden al dominio PDZ6 de la proteína 1 de interacción con el receptor de glutamato (*1n7e*), PDZ2 de PTP-BL (*1gm1*), PDZ3 de PSD-93 (*2he2*) y β 2S-PDZ (*2vrf*).

compacta (plegada). La hebra βF (Figura 25) presenta dos picos por residuo. De esta manera el espectro revela la presencia de dos conformaciones en equilibrio en las condiciones de trabajo, una de ellas muy minoritaria respecto de la otra. Esta hipótesis de una doble conformación para la hebra βF se confirma con los valores de NOE heteronuclear que indican una mayor flexibilidad en esa región (ver Sección 7.2.6). Además, como se indicará más adelante, las constantes de relajación por residuo indican que el intercambio entre ambas conformaciones se da en un régimen temporal lento, contrariamente con lo que sucede en el resto de la proteína.

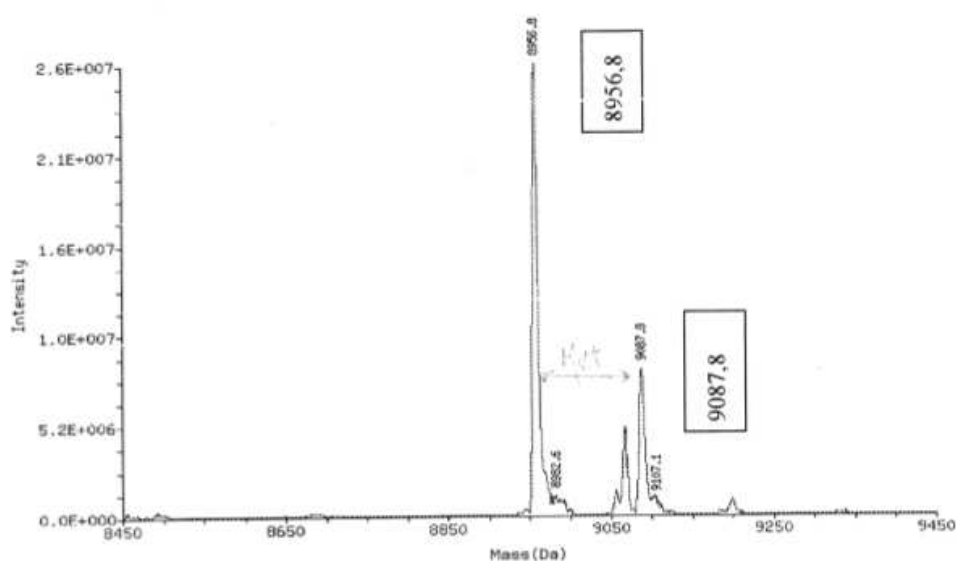


Figura 21. Espectro de masa de $\beta 2S$ -PDZ. Espectro de una muestra pura de $\beta 2S$ -PDZ. Puede identificarse un pico mayoritario cuyo PM corresponde al esperado para $\beta 2S$ -PDZ, y otro pico de menor intensidad que corresponde a una fracción de $\beta 2S$ -PDZ que conserva la metionina inicial.

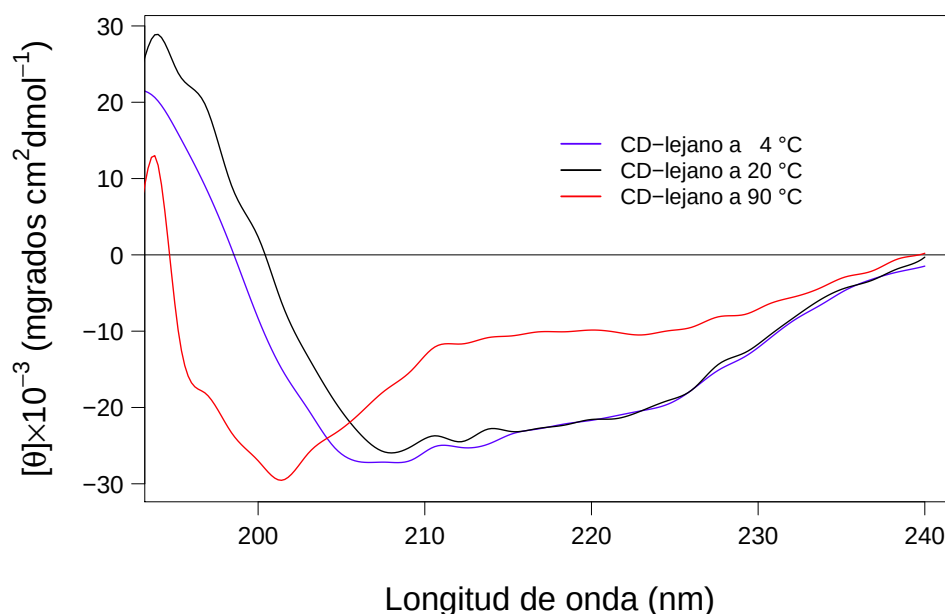


Figura 22. Espectros de CD en el UV-lejano de $\beta 2S$ -PDZ. A 20 °C se observa un espectro típico de una estructura tipo $\alpha + \beta$, la cual se pierde al llevar a la proteína a 90 °C. A esta temperatura se obtiene el espectro típico de una proteína que al desplegarse presenta una estructura residual aleatoria. A 4 °C existe algún grado de desnaturalización por frío, aunque el espectro no cambia de forma significativa respecto de aquél a 20 °C.



Figura 23. Asignación del espectro de ^{15}N - ^1H -HSQC de $\beta 2\text{S}$ -PDZ. El espectro presenta una buena resolución de los picos, y prácticamente todos los residuos pudieron ser asignados. Las líneas azules indican los picos que corresponden a grupos amino de cadenas laterales. Los picos etiquetados en rojo son aquellos que aparecen duplicados, es decir, aquellos de la hebra βF que aparecen en una conformación alternativa minoritaria.

En el Anexo B figuran los valores de desplazamiento químico de cada par H_N -N asignado. Prácticamente todo el esqueleto carbonado ha podido asignarse, con excepción de los residuos Val-113 (extremo N_t), las Pro-139 y Pro-147, y el segmento que abarca desde el Glu-122 hasta la Gly-127, estos últimos pertenecen a una región no estructurada de la proteína (*loop*), muy expuestos al solvente, de modo tal que están sometidos a un rápido intercambio de protones con el solvente.

7.2.5. Determinación del radio hidrodinámico por RMN

El R_h determinado por RMN fue de 17.1 ± 0.3 Å. El R_h esperado para una proteína globular de 83 residuos es de 17.3 Å[55], de modo que el valor obtenido experimentalmente indica un estado de agregación monomérico y compacto a pH 7.5 y a una concentración de 93 μ M. En la Figura 24 se muestra el espectro de RMN en una dimensión (RMN-1D) de β 2S-PDZ.

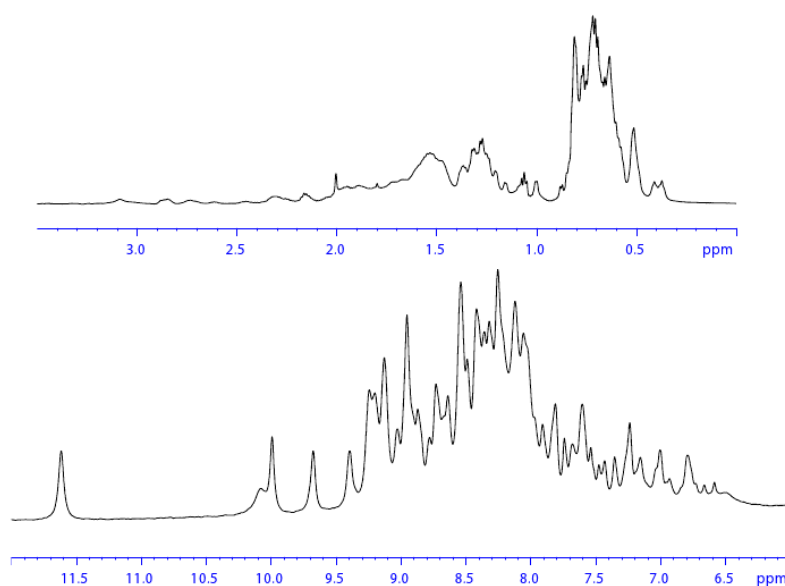


Figura 24. Espectro de RMN-1D de β 2S-PDZ. La dispersión de las señales es alta, especialmente en la región amídica (entre 7.5 y 9.0 ppm). Esto indica que cada H tiene un entorno químico distinto, y que por lo tanto la proteína está plegada.

7.2.6. Experimentos de dinámica: T_1 , T_2 y NOE heteronuclear

Los resultados de los experimentos de relajación del ^{15}N se muestran en los gráficos de la Figura 26. En los gráficos, el eje de las abscisas indica los valores de R_1 y

R_2 , que corresponden a los valores $1/T_1$ y $1/T_2$ respectivamente. De aquí en adelante se hará referencia a estos valores R_1 y R_2 cuando se hable de los experimentos de dinámica por RMN.

Los resultados indican que β 2S-PDZ es una estructura relativamente rígida, con excepción de la hélice αA (Figura 25), que presenta valores de R_2 mayores que el resto de la proteína (de orden de los μ s-ms). Estos valores estarían indicando que sufre un cambio conformacional lento y, probablemente con movimientos más amplios. El tiempo de correlación rotacional calculado a partir de la Ecuación 5.5.4 es de 4.92 ns, valor esperado para un monómero globular del tamaño de β 2S-PDZ.

El resultado del experimento de hnNOE confirma que en general la cadena carbonada principal es rígida, a juzgar por el hecho de que la mayoría de los residuos presentan una media de valores de hnNOE de 0.75-0.8, valores característicos para proteínas en conformación rígida. La hebra βF , ubicada en el extremo C de la proteína, presenta los valores más bajos de hnNOE, indicando mayor flexibilidad en esa región. Además, en los experimentos de dinámica, como en los HSQC, es posible detectar la presencia de un estado conformacional alternativo minoritario para la hebra βF (indicado en azul en la Figura 25).

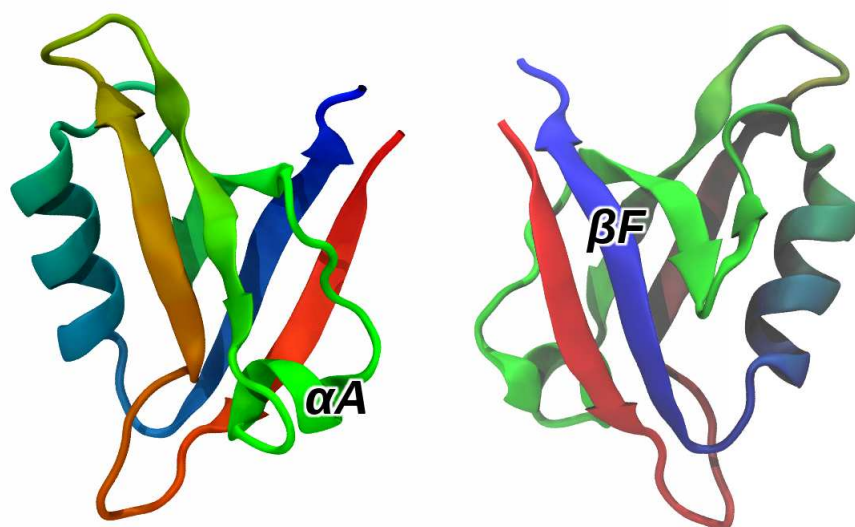


Figura 25. Elementos móviles en β 2S-PDZ. La hélice αA presenta valores de R_2 más altos que el resto de los residuos, lo que sugiere un cambio conformacional lento. Por otro lado, la hebra βF presenta una mayor flexibilidad que el resto de las estructuras del dominio.

En general, los valores de R_1 y R_2 demuestran que la proteína se encuentra en un régimen de intercambio rápido (conocido como *fast exchange regime*) en el que las fluctuaciones dinámicas ocurren en tiempos mucho menores que el experimento de RMN. La única excepción es la hélice αA . Además, en las temperaturas que

7.2. Caracterización estructural

ensayamos, la mayoría de las señales asignadas no se ensanchan, por lo que podemos afirmar que la proteína se mantiene en un régimen dinámico rápido.

7.2.7. Resumen de los parámetros estructurales de utilidad

- Peso molecular por ESI-MS: 8956.4 Da
- Cantidad de residuos: 83
- R_h : 17.1 ± 0.3 Å
- R_g : 11.99 Å
- Absortividad molar (ϵ_{214}) : $249735 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- pI (teórico): 10.9

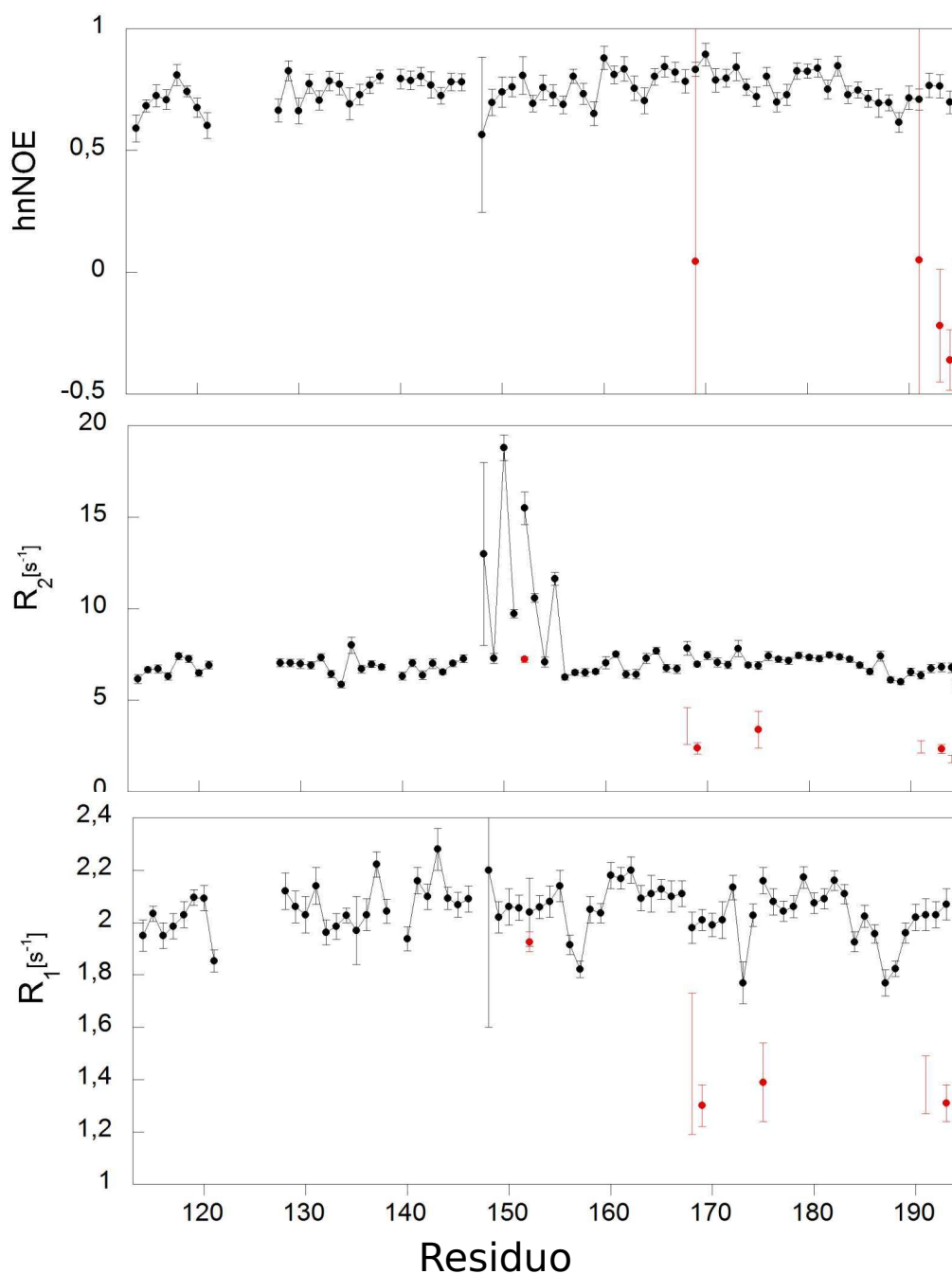


Figura 26. Experimentos de dinámica por RMN. Los residuos marcados en rojo son aquellos de la hebra β F que aparecen en una conformación alternativa y minoritaria. Los resultados del ^1H - ^1H NOE indican que esta región en la conformación alternativa es flexible y carecería de estructura.

Capítulo 8

Caracterización termodinámica y estructural de la desnaturalización de β 2S–PDZ

8.1. Desnaturalización seguida por CD

8.1.1. Desnaturalización química con urea

La desnaturalización química de β 2S–PDZ muestra que la proteína se encuentra completamente desnaturalizada en concentraciones de urea mayores que 3 M a pH 7.0 (Figura 27). El ajuste de un modelo de dos estados a los datos experimentales permite estimar que al menos un 5 % de la proteína está desplegada en ausencia del desnaturalizante. Los valores de energía libre de desplegado ($\Delta G_U^{\text{H}_2\text{O}}$) y el parámetro m (Ecuación 6.11) estimados con este modelo son $1.36 \pm 0.36 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ y $1.18 \pm 0.28 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ respectivamente. La ausencia de una pre-transición clara es la mayor fuente de incertidumbre respecto de la validez de la aplicación de este modelo ya que dificulta la estimación de una línea de base confiable para la señal del estado nativo. De esta forma, los parámetros termodinámicos estimados deben ser interpretados teniendo en cuenta estas consideraciones.

8.1.2. Desnaturalización térmica y doble perturbación

La Figura 28 muestra que la desnaturalización térmica de β 2S–PDZ es completamente reversible en las condiciones experimentales de trabajo, ya que luego de llevar la proteína hasta 90 °C y de enfriarla hasta temperatura ambiente se recupera completamente el espectro característico del estado nativo.

El efecto combinado del calor y un agente caótico (en este caso urea) sobre la estructura secundaria de la β 2S–PDZ se muestra en las curvas de la Figura 29.

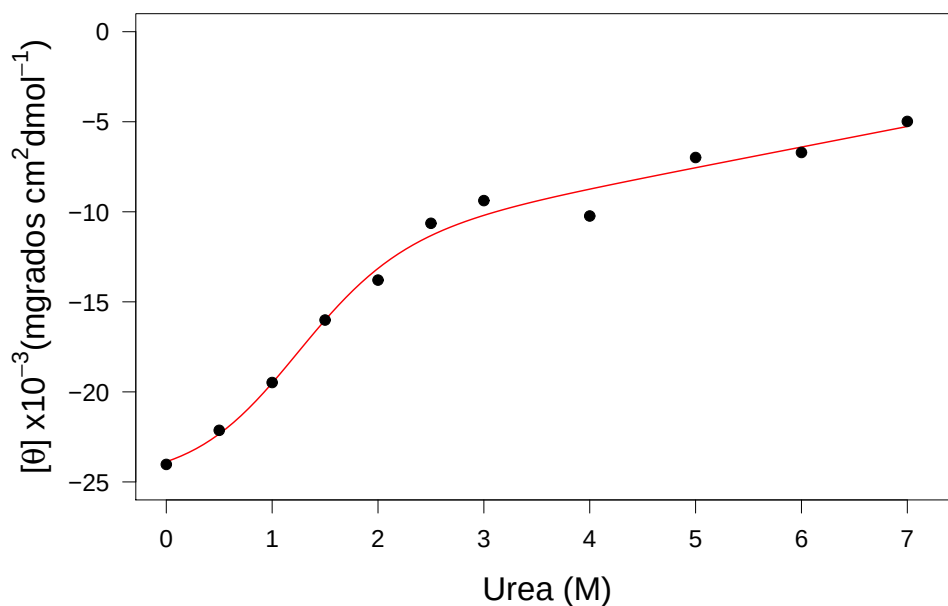


Figura 27. Desnaturalización química de β 2S-PDZ. Se grafica la elipticidad molar a 220 nm (puntos negros) en función de la concentración de urea. La línea roja es el resultado del ajuste de un modelo de dos estados. A bajas concentraciones de urea no existe una pre-transición definida correspondiente a la señal del estado nativo.

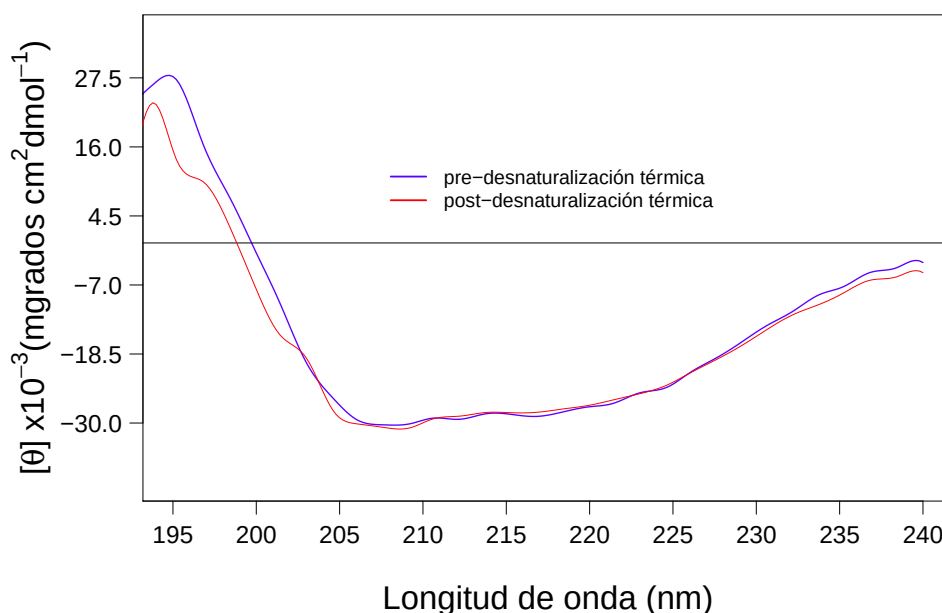


Figura 28. Reversibilidad de la desnaturalización térmica. Se muestran los espectros de CD lejano antes de someter a β 2S-PDZ a la desnaturalización térmica (trazo azul), y luego de la desnaturalización (trazo rojo). Puede verse que esencialmente se conserva la forma del espectro.

8.1. Desnaturalización seguida por CD

Se observa que la proteína también sufre desplegado a bajas temperaturas, efecto que se incrementa junto con la concentración de urea. También se observa que las transiciones son anchas, indicando poca cooperatividad en el proceso. El ensanchamiento de las transiciones en las curvas de la Figura 29 fue el primer indicio de que el plegado de β 2S-PDZ no se explica adecuadamente como una transición clásica entre dos estados.

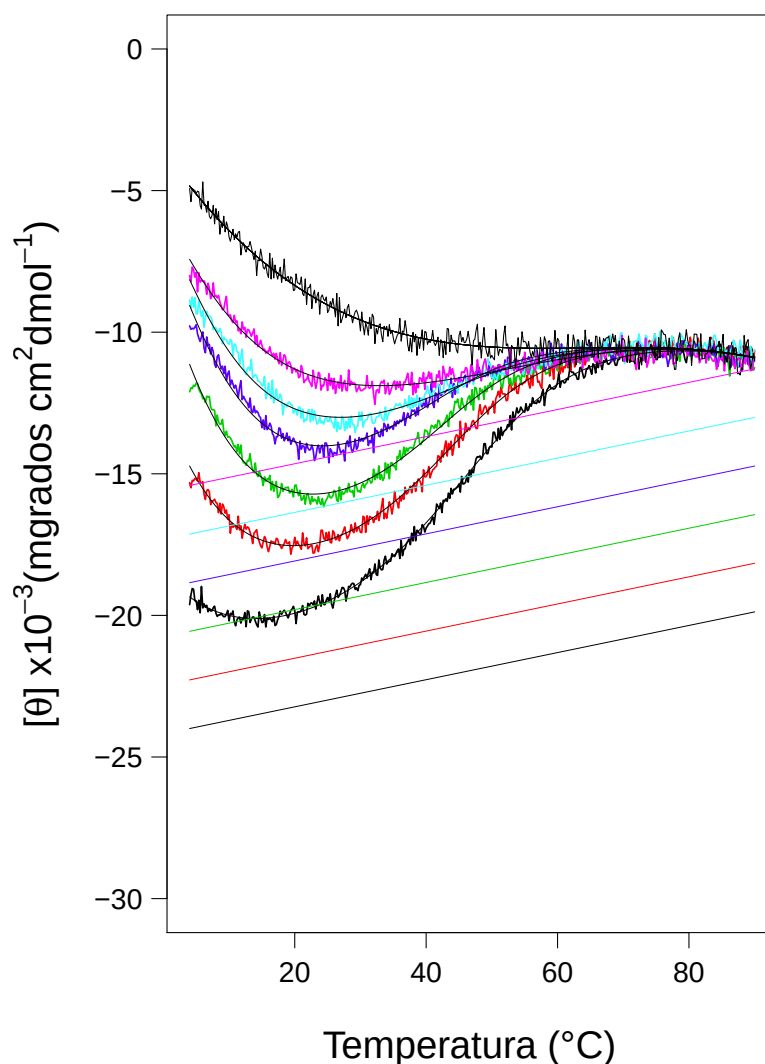


Figura 29. Desnaturalización por doble perturbación. Las líneas rectas de pendiente positiva corresponden a las líneas de base del estado nativo para las distintas concentraciones de urea: 0 M (negro); 0.4 M (rojo); 0.8 M (verde claro); 1.2 M (azul); 1.6 M (celeste) y 2 M (magenta). La curva en 7.5 M urea se utilizó para construir la línea de base del estado desplegado.

La desnaturalización térmica en presencia de agentes osmolitos no generó efectos significativos en la estabilidad termodinámica de β 2S-PDZ (datos no mostrados). Sin embargo, a pH 9.4 se obtuvieron valores de T_{max} y de T_{m} mayores que a pH 7.5

(Figura 30)

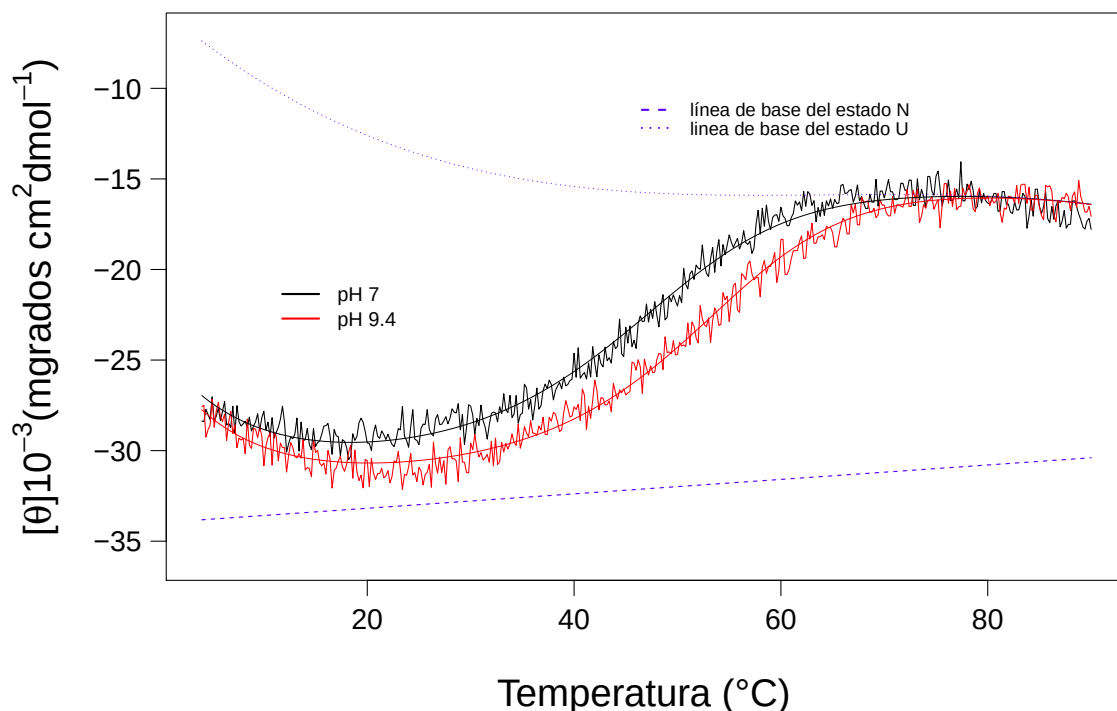


Figura 30. Desnaturalización térmica de β 2S-PDZ a distintos pH. Las líneas suavizadas sobre el trazo de las curvas experimentales son el ajuste de un modelo de dos estados. Las líneas de puntos y rayas son las líneas de base del estado U y del estado N respectivamente.

En los casos de desplegamiento térmico de proteínas con un comportamiento marcadamente cooperativo las curvas son sigmoideas con transiciones abruptas, y las líneas de base de los estados N y U suelen ser fácilmente identificables, ya que se superponen a los datos experimentales en las zonas previa y posterior a la transición. En estos casos se suelen utilizar líneas de base rectas con dependencia lineal de la temperatura para ajustar los datos y así estimar los valores de los parámetros termodinámicos. Un simple análisis visual de las curvas de la Figura 29 permite ver que esta estrategia carece de sentido en nuestro caso, ya que no hay forma de establecer un criterio para ubicar la línea de base del estado N; además, en el caso de la línea de base del estado U, una recta cruzaría los datos experimentales a bajas temperaturas y altas concentraciones de urea. A esto hay que agregar que β 2S-PDZ parece presentar desnaturalización a bajas temperaturas, lo que provocaría que, de acuerdo a un modelo de dos estados, haya una fracción apreciable de proteína desnaturalizada a la temperatura de máxima estabilidad, y por ello, la línea de base nativa no podría superponerse con la curva experimental.

Para mejorar la construcción de las líneas de base de los estados N y U se recurrió a los resultados experimentales de las desnaturalizaciones químicas. La curva de

8.1. Desnaturalización seguida por CD

desplegado térmico en 7 M urea (Figura 29), la cual es descripta satisfactoriamente con un polinomio de grado 3 dependiente de la temperatura (Ecuación 6.1.3), es una buena aproximación al comportamiento del estado U en todo el rango de temperaturas. Por otro lado, la pendiente de la línea de base del estado N se obtuvo a partir del ajuste a un modelo de dos estados del termograma a pH 9.4, condición en la cual se observó mayor estabilidad termodinámica de β 2S-PDZ (Figura 30), utilizando una línea de base N lineal dependiente de la temperatura. A partir de la ecuación de esta recta se construyeron las líneas de base del estado N de las curvas de la Figura 29.

Un ajuste global de un modelo de dos estados con líneas de base como las recién descriptas tampoco resultó satisfactorio, dado que el ajuste se desviaba de los datos experimentales de forma sistemática, sobre todo a bajas temperaturas. Un modelo de tres estados tampoco resultó satisfactorio. La función de ajuste presenta múltiples mínimos locales, y los parámetros termodinámicos estimados resultaron inconsistentes con los esperados para una proteína del tamaño de β 2S-PDZ, o bien no reflejaban lo observado experimentalmente.

Un mejor ajuste se obtuvo al utilizar un modelo de dos estados con parámetros termodinámicos independientes y líneas de base del estado N construidas como se describe más arriba. Este tipo de aproximaciones ya fue utilizada satisfactoriamente para una proteína de dos estados, pero cuyas transiciones son poco cooperativas [14], y para la proteína BBL, identificada como ‘cuesta abajo’ [13, 12].

El resultado de este ajuste en el caso de β 2S-PDZ se muestra como líneas suavizadas en la Figura 29, y los parámetros termodinámicos estimados de esta forma se muestran en la Tabla 6. El valor ΔC_p estimado es más bajo que el esperado para una proteína correctamente plegada del tamaño de β 2S-PDZ [1], y los parámetros $\Delta G_{\max}$ y ΔH_{T_m} son bajos comparados con los valores de los mismos parámetros de otras proteínas del mismo tamaño que β 2S-PDZ [31, 64, 65, 66].

Urea (M)	ΔH_{T_m} (Kcalmol ⁻¹)	T_m (°C)	ΔC_p (Kcalmol ⁻¹ K ⁻¹)	$T_{\max}$ (°C)	$\Delta G_U^{\max}$ (Kcalmol ⁻¹)
0	17.33±0.11	39.88±0.07	0.55±0.01	9.95±0.55	0.84±0.02
0.4	16.25±0.14	36.51±0.08	0.81±0.01	17.16±0.32	0.51±0.01
0.8	15.08±0.19	34.42±0.11	1.04±0.01	20.23±0.29	0.35±0.01
1.2	11.47±0.27	30.77±0.19	1.14±0.02	20.84±0.35	0.19±0.01
1.6	9.69±0.36	31.80±0.30	1.01±0.02	22.39±0.51	0.15±0.01
2	0.00±1.05	23.69±1.4	0.76±0.02	23.69±1.97	0.00±0.00

Tabla 6. Parámetros termodinámicos de la transición térmica de β 2S-PDZ. Los parámetros fueron obtenidos por ajuste de un modelo de dos estados a los datos de la Figura 29. Como se describe en el texto, estos parámetros muestran una serie de particularidades que ponen en duda la validez de la aplicación del modelo de dos estados a nuestros datos experimentales.

La Figura 31 muestra que existe una fuerte dependencia de los parámetros termodinámicos ΔH_{T_m} , T_m y ΔC_p con la concentración de urea, una característica de

proteínas que se (des)pliegan cruzando barreras de energía muy bajas o poco significativas. Además, la relación de ΔH_{T_m} con la concentración de urea no es lineal, y la relación lineal entre ΔG_{max} y la concentración de urea tiene una pendiente negativa de ≈ 0.4 , más baja que el valor de m obtenido en la desnaturalización química.

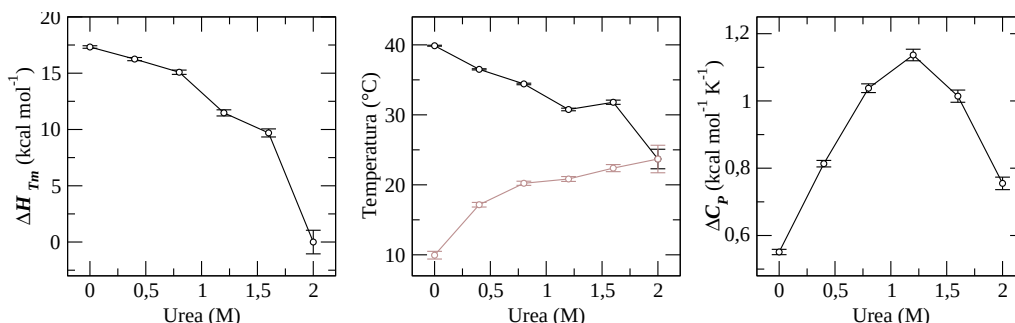


Figura 31. Parámetros termodinámicos obtenidos a partir de un ajuste de un modelo de dos estados a las curvas de desnaturalización térmica en diferentes concentraciones de urea. En el panel central, en negro se grafica la T_m y en rojo la T_{max} en función de la concentración de urea.

En la Figura 33 se muestra la variación del espectro de CD en el UV-lejano de β 2S-PDZ en función de la temperatura. Estos termogramas espectrales fueron analizados por descomposición en valores singulares. Solo los dos primeros componentes de la matriz $U \cdot D$ son relevantes (Figura 34(A)), mientras que los otros componentes son ruido. La variación de estos dos componentes relevantes con la temperatura está contenida en la matriz V , de modo tal que el producto $D \cdot V^T$ permite construir curvas de desnaturalización para cada uno de estos componentes. Estos componentes varían de forma independiente entre sí, lo cual explica la ausencia de un punto isodicroico en la Figura 33. La suma de estos dos componentes permite construir la curva de desnaturalización que se muestra en la Figura 34(B). Esta curva permite extraer algunas conclusiones importantes acerca del desplegamiento de β 2S-PDZ. La curva revela un cambio estructural gradual a bajas temperaturas, debido mayormente al componente 1, seguido de un proceso más cooperativo dado por el componente 2. Este análisis permite interpretar la reacción de desplegamiento de β 2S-PDZ como un cambio gradual del estado N inicial hacia una transición de carácter más cooperativo, con mayores cambios conformacionales, que lleva hacia el estado final U.

En la Figura 32 pueden verse los termogramas obtenidos siguiendo la desnaturalización térmica de β 2S-PDZ en ausencia de urea a 204 nm, 208 nm, y 220 nm. Estas longitudes de onda permiten seguir a los distintos componentes estructurales de una proteína: la señal a 204 nm permite detectar componentes de estructura aleatoria, a 208 nm se sensan principalmente las hebras β y hélices α , mientras que a 220 nm la respuesta dicróica es mayormente del componente α -helicoidal. Las curvas no son

8.1. Desnaturalización seguida por CD

superponibles como se esperarí si se tratase de un desplegado en dos estados.

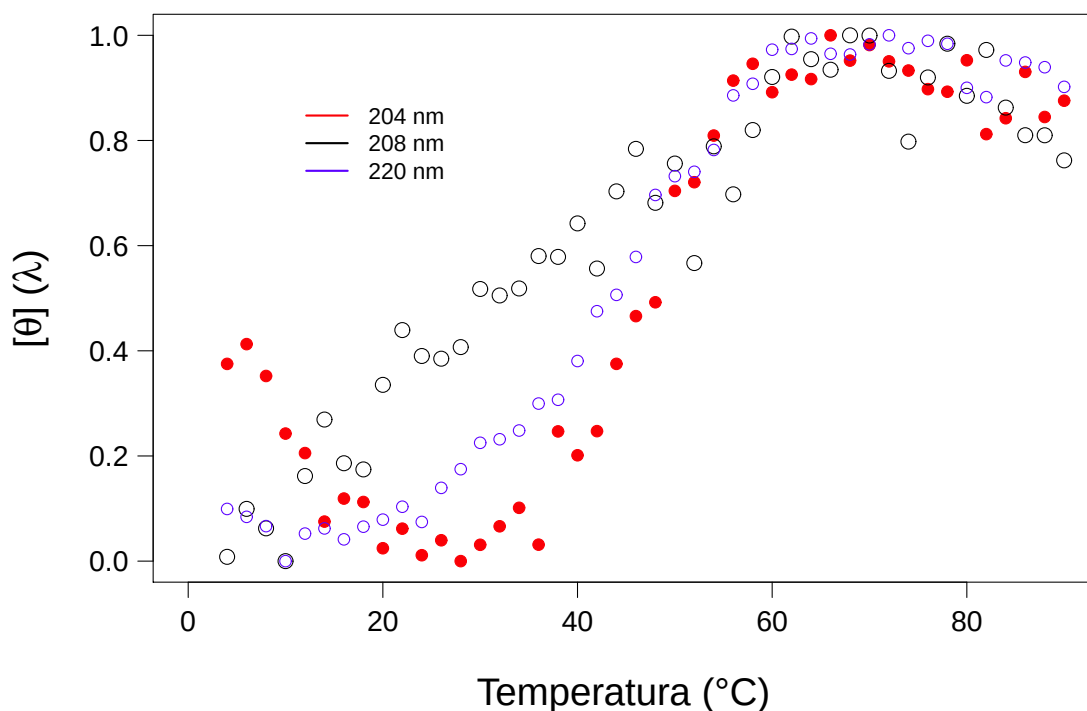


Figura 32. Señal de CD normalizada a distintas longitudes de onda, obtenida a partir de la Figura 33. La señal se muestra normalizada para facilitar la comparación entre las curvas. La principal característica de las curvas a distintas longitudes de onda es que no son superponibles.

Analizados en forma conjunta, los resultados obtenidos hasta este punto llevaron a postular la hipótesis de que el proceso de plegado de $\beta 2\text{S-PDZ}$ ocurría por un mecanismo más complejo que un modelo de estados discretos.

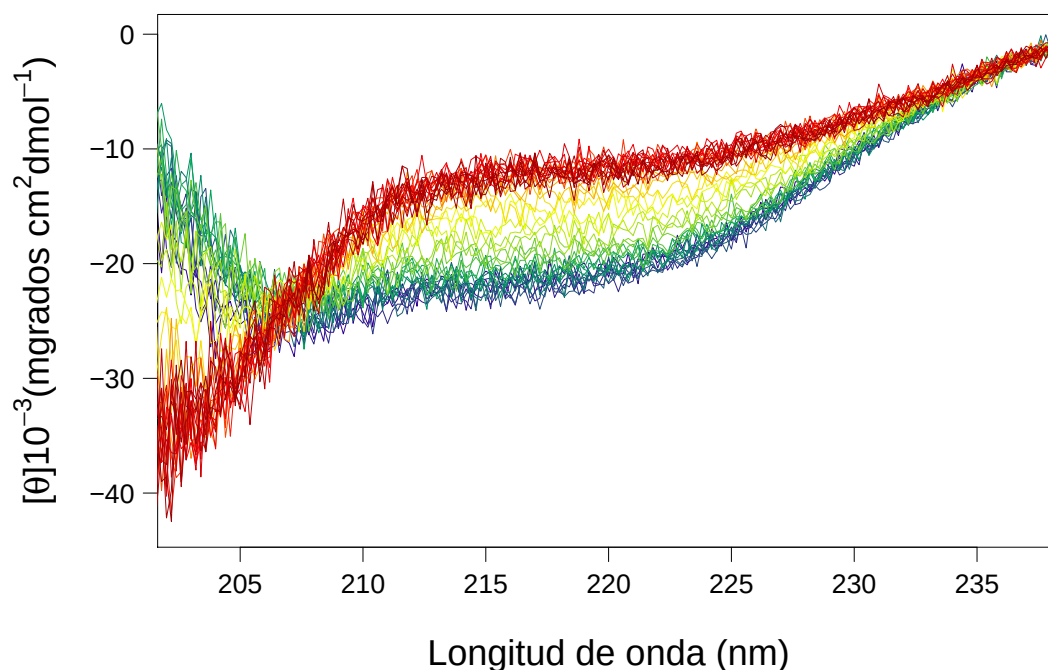


Figura 33. Termograma espectral. Espectros completos de CD en el UV-lejano tomados cada 2 °C. Se grafican en un gradiente de colores desde el azul más intenso (4 °C) hasta el rojo más intenso (90 °C).

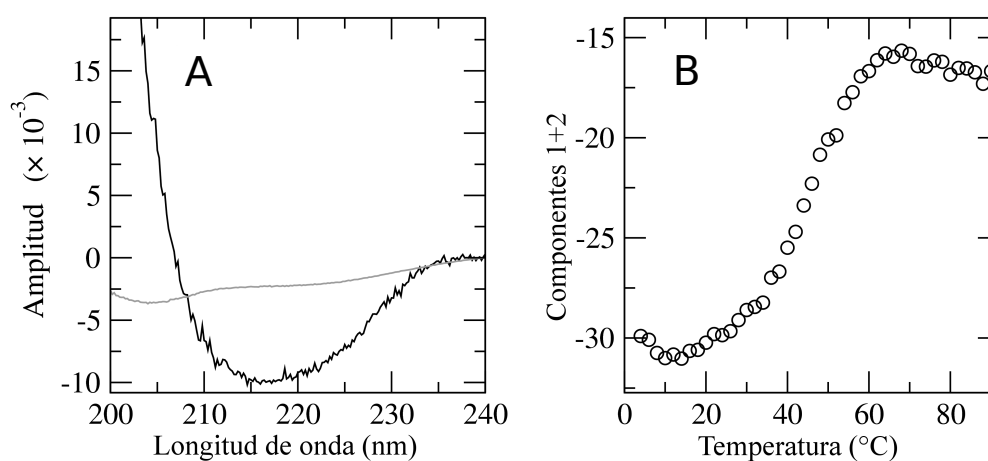


Figura 34. En el panel A se grafica la amplitud de los dos componentes principales del termograma espectral en la Figura 33, pesada por sus valores singulares. El componente 1 se grafica en gris, y el componente 2 en negro. En el panel B se grafica la curva de desnaturalización reconstruida a partir de los componentes principales.

8.2. Desnaturalización seguida por DSC

Los termogramas se realizaron a varias concentraciones. A las concentraciones más bajas (menores a 2 mg/ml), la desnaturalización mostró ser completamente reversible, mientras que a 2 mg/ml se observa agregación recién a altas temperaturas. Por otro lado, la temperatura correspondiente al valor máximo de C_p (T_m) no varía con la concentración de proteína, al menos hasta la concentración de 2 mg/ml, lo que descarta la posible formación de dímeros o agregados de orden superior (oligómeros) en estas condiciones experimentales.

Los termogramas presentan transiciones anchas (Figura 35) e indicios de desnaturalización por frío.

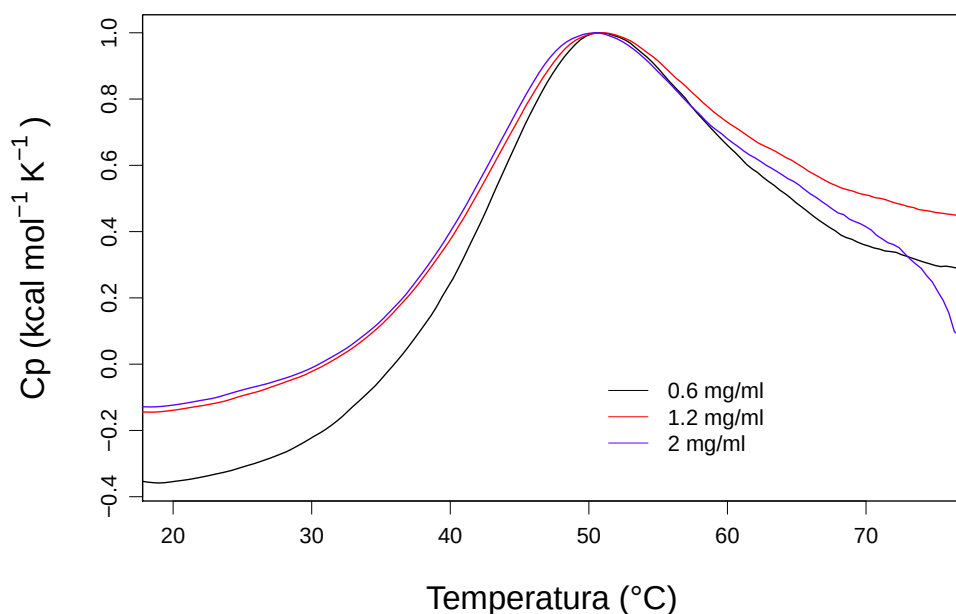


Figura 35. Termogramas de DSC de β 2S-PDZ en distintas concentraciones. Dado que el máximo de las curvas no se corre al aumentar la concentración de proteína, puede decirse que β 2S-PDZ no produce oligómeros al menos hasta 2 mg/ml.

Los experimentos de DSC presentados en este Capítulo tienen el objetivo de profundizar y complementar la información presentada en la Sección anterior sobre CD. La ventaja de los experimentos de DSC frente a los espectroscópicos es que la entalpía de la reacción de desplegado, y por ende el cambio de capacidad calorífica durante el proceso, se obtienen directamente a partir de los datos experimentales. Esto permite, a través de herramientas de la termodinámica estadística, estudiar la función de partición del sistema, y con ello las poblaciones presentes en una muestra durante el desplegado. En este capítulo presentamos el resultado del análisis de los termogramas de DSC de β 2S-PDZ con un modelo que permite discernir entre la presencia o no de una barrera energética termodinámica en el proceso de desplegado;

y por ende discenir entre un modelo de dos estados o uno continuo.

En el análisis resulta determinante la asignación de las líneas de base de los termogramas. La cuestión de las líneas de base en los estudios calorimétricos ha sido ampliamente discutida [59, 12]. De particular importancia es el recorte arbitrario de los termogramas que se produce en la elección de las líneas de base, ya que puede eliminarse información importante de la capacidad calorífica en exceso. Como sucedió con los resultados de CD, en nuestro caso tampoco resultó posible determinar la posición de las líneas de base $C_{P,N}$ y $C_{P,U}$ con certeza. En este contexto, el análisis recurriendo a un modelo de dos estados resulta inadecuado. Aún así, se intentó el ajuste utilizando el programa Origin-DSC. Los parámetros termodinámicos obtenidos carecen de sentido, y no fue posible establecer un criterio a partir del cual mejorar el procedimiento de ajuste.

El modelo de barrera variable presentado en la Sección 6.2.3 resulta de utilidad para estimar la altura de la barrera energética del proceso, o bien para descartar la presencia de una barrera. El resultado de este ajuste se muestra en la Figura 36.

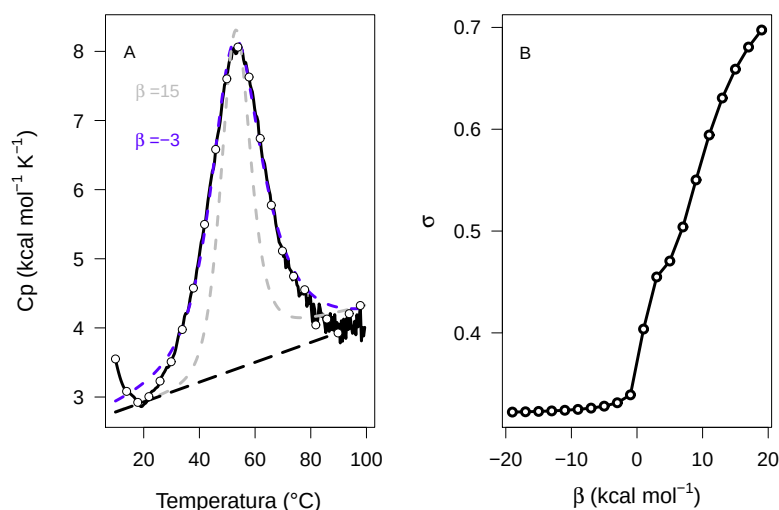


Figura 36. Ajuste del modelo de barrera variable a un termograma de DSC de β 2S–PDZ. Con un valor de β negativo se tiene un mejor ajuste a los datos experimentales, lo cual se aprecia en la Figura (B), que muestra que se obtiene una menor varianza entre el modelo y los datos con valores de β negativos. Con un valor de $\beta = -3$ se obtiene el ajuste del trazo azul en la Figura (A).

Los termogramas de β 2S–PDZ analizados con este modelo indican que esta proteína no cruzaría una barrera energética durante el proceso de desplegado.

Para descartar la posibilidad de estar introduciendo un sesgo experimental en nuestro análisis, decidimos probar el modelo de barrera variable utilizando los termogramas de la proteína RNasa A, cuyo plegado ha sido descrito como en dos estados [67]. El resultado del ajuste se muestra en la Figura 37.

La aplicación del modelo de barrera variable sirve satisfactoriamente en casi

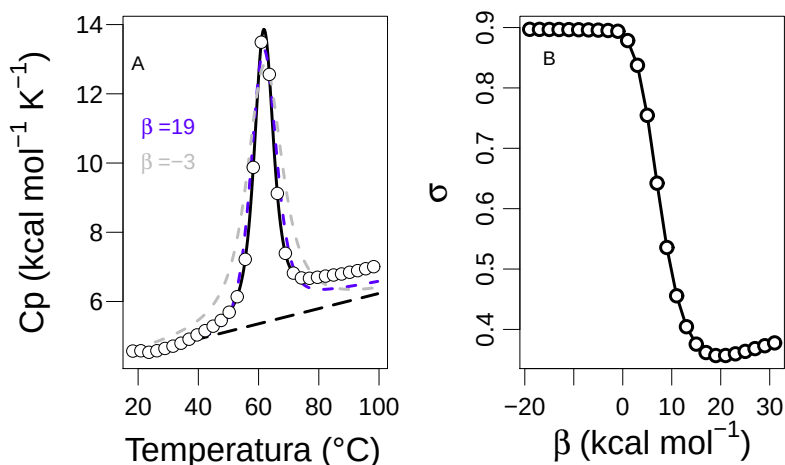


Figura 37. Ajuste del modelo de barrera variable a un termograma de DSC de la RNasa A. Al contrario de lo que sucede con β 2S-PDZ, en este caso el ajuste mejora cuando se utilizan valores de β positivos. La Figura (B) muestra que se obtiene una menor varianza entre el modelo y los datos experimentales cuando se utilizan valores de β positivos. En la Figura (A) se muestra en trazo azul el resultado del ajuste al utilizar un valor de $\beta = 19$, y el trazo gris muestra cómo se desvía el ajuste al utilizar un valor de β bajo.

todo el rango de temperaturas experimentales, indicando que esta proteína podría desplegarse por un mecanismo que no involucra barreras energéticas altas respecto de la energía térmica del sistema ($< 3k_B T$). La zonas de bajas temperaturas de nuestro experimento no ajustan tan satisfactoriamente, debido a que este modelo no contempla la desnaturalización en frío.

8.3. Perturbación térmica seguida por RMN

La idea subyacente a este experimento es poder analizar la estructura de la proteína en distintas condiciones de temperatura al nivel de los residuos individuales, utilizando el desplazamiento químico como sonda. De esta forma es posible, al menos en teoría, poder graficar curvas de desnaturalización ‘desplazamiento químico versus temperatura’ para cada residuo de la proteína. Si una proteína se despliega siguiendo un modelo de estados discretos se espera que los desplazamientos químicos de los residuos se comporten de forma concertada. En cambio, si el desplegamiento de una proteína sigue un modelo continuo, se espera que las curvas de desnaturalización individuales no sean superponibles [61, 18, 68]. Esta aproximación se basa en que el cambio en el valor del desplazamiento químico de un residuo en función de la temperatura correlaciona con cambios en su entorno químico, que en estos casos se atribuyen a la desnaturalización térmica de la proteína. Esta aproximación presenta algunas limitaciones, siendo una de las más relevantes en nuestro caso la imposibilidad de elevar la temperatura por encima de los 60 °C, que es la máxima temperatura que puede alcanzarse con el espectrómetro de RMN utilizado en esta tesis, de modo tal que no fue posible realizar una curva completa de desnaturalización térmica de β 2S-PDZ. Sin embargo, los espectros de ^{15}N - ^1H -HSQC colectados hasta 40 °C brindan información importante acerca de los eventos tempranos del proceso de desnaturalización de β 2S-PDZ, que, a juzgar por los resultados del SVD presentados en la Sección 8.1.2, corresponden a una etapa de cambio gradual en la estructura, previa a una etapa de transición más cooperativa.

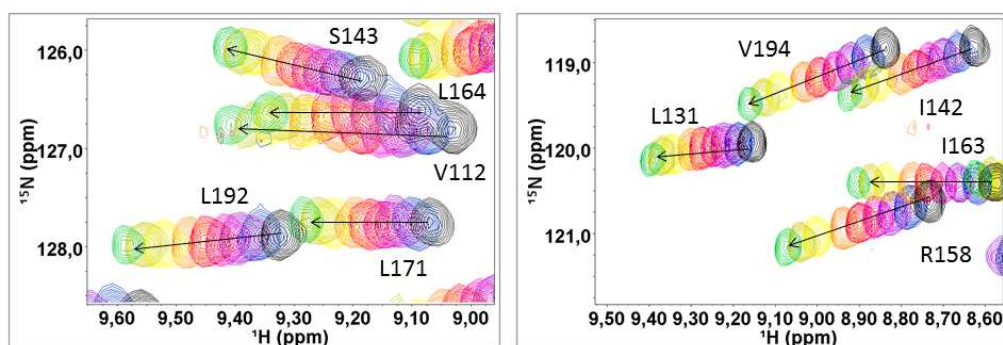


Figura 38. La figura muestra un recorte de los HSQC a distintas temperaturas. Se pudo comprobar que la dispersión de las señales no cambia al aumentar la temperatura, lo cual permite decir que la proteína se encuentra en un régimen de intercambio rápido.

En nuestro caso la aproximación consistió en medir los desplazamientos químicos de 74 nitrógenos de la cadena carbonada de β 2S-PDZ a distintas temperaturas

(Figura 39). Este es el número de residuos que fueron asignados en el ^{15}N - ^1H -HSQC y cuya señal era claramente observable en los espectros. Dado el número de residuos de $\beta 2\text{S}$ -PDZ, se esperaba identificar 80 señales ($\beta 2\text{S}$ -PDZ tiene 83 residuos, pero el N_t y las prolinas no tienen grupos NH amídicos); sin embargo, las señales de los residuos del *loop* entre las hebras βA y βB no fueron detectadas en los espectros, probablemente debido a una alta exposición al solvente. Elegimos el nitrógeno como sonda ya que el nitrógeno es un núcleo cuyo desplazamiento químico es más sensible que el del hidrogeno a las perturbaciones del entorno. Asimismo, las señales del nitrógeno son mas estrechas y con un ancho de línea más homogéneo que las del protón.

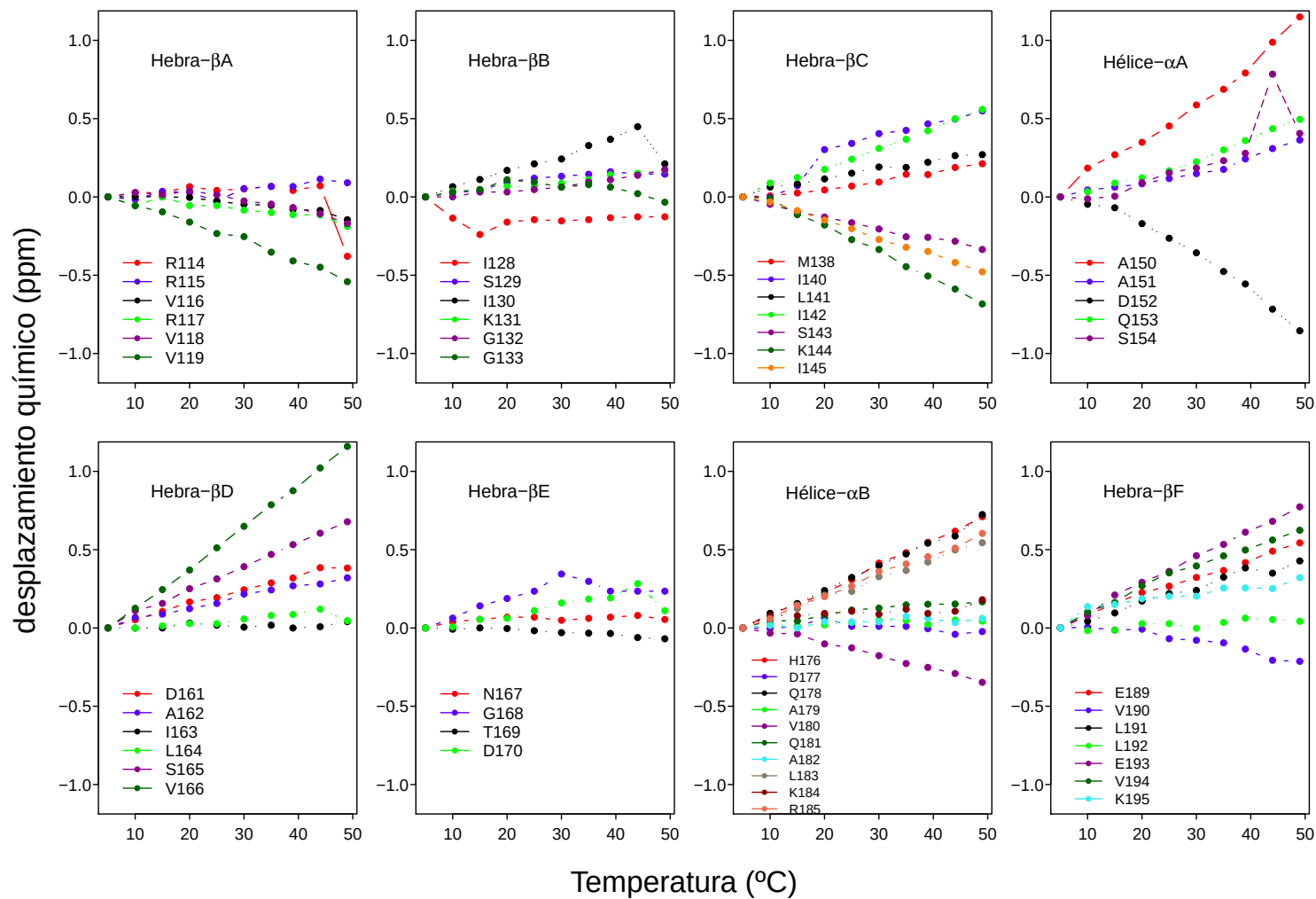


Figura 39. Desplazamiento químico versus temperatura de la cadena principal de β 2S-PDZ. Se graficaron los valores de desplazamiento químico de cada residuo en función de la temperatura, agrupando los residuos por su pertenencia a determinado elemento de estructura secundaria. De los 83 nitrógenos de la cadena principal de β 2S-PDZ se grafican 74. Los no representados corresponden a dos residuos de prolina, y a 7 residuos no asignados.

Este análisis permitió observar algunas particularidades en el comportamiento de los residuos. En general se distinguen dos regiones en la proteína. Una responde al incremento de la temperatura antes de los 40 °C, formada por las hebras β D, β F y el extremo C_t de la hélice α B, el extremo N_t de la hélice α B, y el extremo C_t de la hebra β C junto con la hélice α A. Otra región, formada por las hebras β A, β E β B y la hélice α B permanece estable al menos hasta los 40 °C.

Respecto de los residuos que sufren mayor perturbación con la temperatura (Figura 40) podemos decir que se encuentran en las regiones más superficiales de la proteína, son mayormente residuos polares, y, como es de esperar, muchos se encuentran en los extremos de varios elementos de estructura secundaria. Además, vale la pena recordar que la hélice α A, que se encuentra entre los elementos que se perturban a $T < 40^\circ\text{C}$, posiblemente sufre un cambio conformacional lento de acuerdo con sus tiempos de relajación transversal. Esto significa que presenta movimientos internos en la escala de los μs -ms, más lentos que el *tumbling* global de la proteína en solución. Es probable que estos movimientos se incrementen con el aumento de la temperatura.

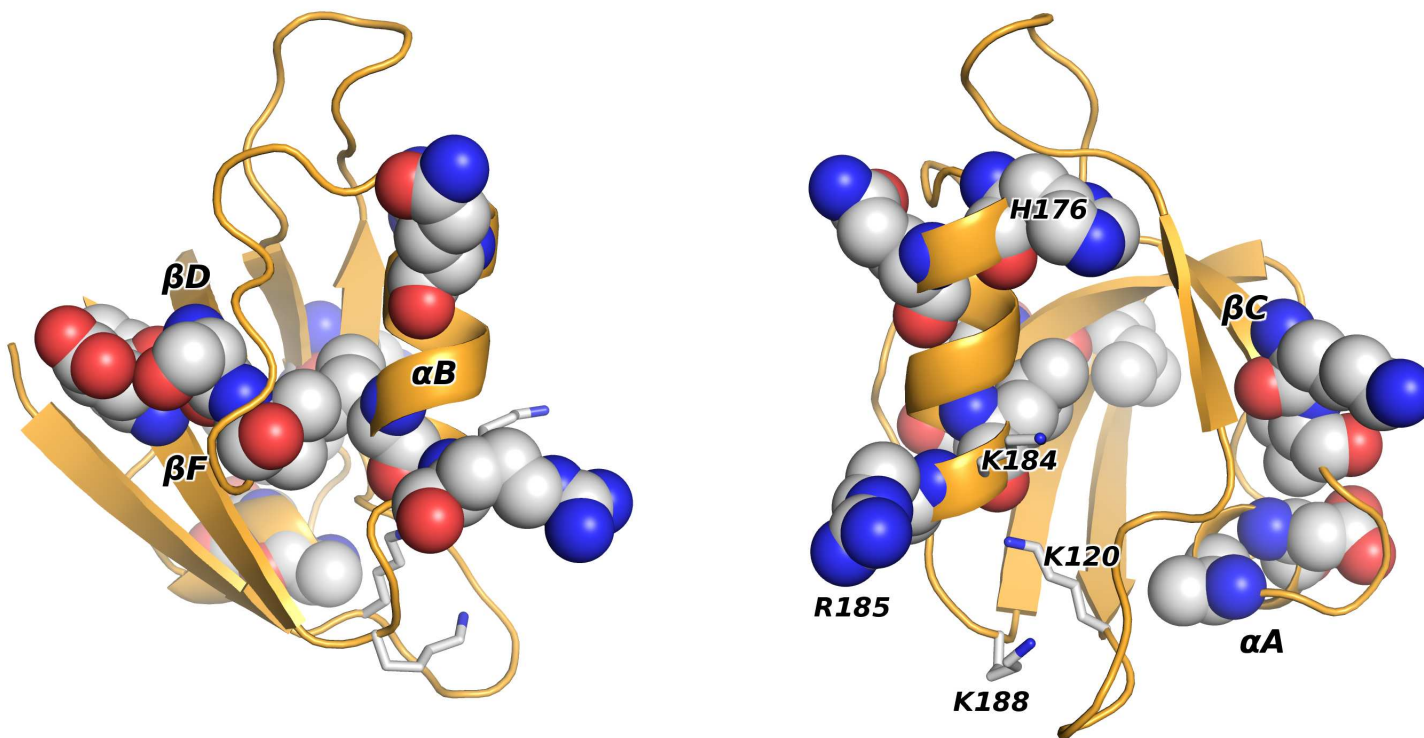


Figura 40. Estructura tridimensional de β 2S-PDZ en la cual se destacan los residuos que se perturban primero al aumentar la temperatura, es decir, aquellos que primero sufren cambios en su entorno químico al aumentar la temperatura. Estos elementos se encuentran en los extremos de varios elementos de estructura secundaria, y en regiones involucradas en la unión de ligandos.

Parte IV

CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS

Capítulo 9

CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS

9.1. Conclusiones

En el presente trabajo de tesis se estudió el desplegado en el equilibrio del dominio PDZ de la proteína β 2-sintrofina mediante distintas técnicas biofísicas. La idea detrás de esta estrategia que combinó experimentos de CD, DSC y RMN fue obtener de cada una de estas técnicas información diferente y complementaria acerca del desplegado de β 2S-PDZ.

La motivación inicial para comenzar este estudio fue que los resultados de la desnaturalización térmica seguida por CD en el UV-lejano de β 2S-PDZ no pudieron ser explicados con modelos tradicionales de dos o tres estados (o como también los hemos llamado en este trabajo, estados discretos). Como se mencionó en el Capítulo 1, la primera aproximación al analizar datos de estabilidad termodinámica en el equilibrio suele ser el ajuste de modelos de dos o tres estados a los datos experimentales. Por lo general estos modelos son satisfactorios en casos donde los termogramas de desplegado presentan transiciones angostas (por CD y DSC), y en las cuales las líneas de base (que se atribuyen a modificaciones de la señal de los estados N y U inducidas por la temperatura más que a cambios conformacionales) son fácilmente identificables. En el caso de los datos de la desnaturalización térmica de β 2S-PDZ, los resultados estuvieron marcados por dos particularidades: transiciones anchas, y zonas de pre- y post- transición poco definidas. En este contexto, el análisis de nuestros datos con estos modelos clásicos resultó arbitrario y los resultados carecían de sentido físico. Cabe mencionar que el dominio β 2-PDZ utilizado en esta tesis no posee modificaciones de ningún tipo (mutaciones, marcas, etc.), con lo cual se pueden descartar las incertidumbres acerca de los artefactos experimentales que introducen las modificaciones en la secuencia.

La revisión exhaustiva de bibliografía, y un análisis pormenorizado de nuestros resultados, nos llevaron a plantear como hipótesis que β 2S-PDZ se despliega siguiendo un modelo continuo, en el cual no se atraviesan barreras termodinámicas durante la reacción de plegado, o bien estas barreras son de energía muy baja. Los resultados presentados de los experimentos de CD y DSC nos sugieren que β 2S-PDZ se despliega siguiendo un patrón más complejo que en estados discretos:

- presenta transiciones anchas en los termogramas de CD y DSC;
- los parámetros ΔH_{T_m} , T_m y ΔC_p dependen de la concentración del agente caótopo (cuando se ajusta un modelo de dos estados);
- en las condiciones de trabajo ensayadas no existe oligomerización de β 2S-PDZ;
- el modelo de barrera variable revela que β 2S-PDZ no cruzaría una barrera energética significativa durante su desplegado.

En este sentido, presentamos al dominio β 2S-PDZ como un nuevo caso de estudio en el aún limitado conjunto de proteínas de plegado continuo. Nuestro estudio permitió además poner a prueba un modelo poco utilizado como es el modelo de barrera variable.

Los experimentos de RMN muestran que distintas regiones de la proteína responden de forma diferencial al incremento de la temperatura, existiendo un núcleo que se mantiene sin perturbación al menos hasta los 40 °C, mientras que algunos elementos de estructura secundaria parecen comenzar a desestructurarse antes de esta temperatura. Este experimento resultó crucial además para confirmar que en el caso de β 2S-PDZ no es correcto construir una línea de base atribuible a un único estado nativo en las zonas previas a la transición en los termogramas de CD y/o DSC. Hemos comprobado que es posible aplicar la técnica de RMN para estudiar al dominio β 2S-PDZ a nivel de residuos individuales, abriendo la posibilidad de estudiar el plegado de esta proteína con alta resolución.

Desde el punto de vista de la función, se ha propuesto para otras proteínas que se pliegan sin cruzar barreras energéticas, o cruzando barreras de energía muy baja, que podrían actuar como ‘reostatos moleculares’, cuyo comportamiento es regulado por las condiciones ambientales [69, 70]. En este sentido, y con los resultados presentados en este trabajo de tesis, esta hipótesis podría ser planteada también en el caso de β 2S-PDZ, abriendo una interesante línea de investigación vinculada a la regulación de la secreción de insulina.

9.2. Perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis constituyen el punto de partida de varios potenciales trabajos de investigación. Los próximos pasos que proponemos seguir para profundizar este estudio son:

- realizar el ensayo de desnaturalización térmica seguida por RMN con la proteína marcada con ^{13}C , y de esta forma obtener curvas de desnaturalización para los carbonos α y β , aumentando significativamente el volumen de sondas estructurales.
- asignar las cadenas laterales de los residuos. El posterior seguimiento de los desplazamientos químicos de los átomos de las cadenas laterales en función de la temperatura permitiría una caracterización de mucha mayor resolución de la reacción de (des)plegado.
- realizar los ensayos de los ítems anteriores midiendo también espectros de HSQC al disminuir la temperatura; es decir, obtener curvas de desplazamiento químico versus temperatura para el pasaje desde el estado U al estado N.
- estudiar el (des)plegado de $\beta 2\text{S-PDZ}$ desde una perspectiva cinética.
- estudiar la interacción de $\beta 2\text{S-PDZ}$ con ligandos y estudiar el efecto de mutaciones de residuos importantes para la unión y el plegado en la estabilidad y afinidad por ligandos.

Parte V

APÉNDICES

Apéndice A

Ecuaciones del modelo *Non-two states* del programa Origin

Para el ajuste es necesario restar a los datos experimentales una línea de base (*‘progress baseline’*), ya que este modelo no considera el parámetro ΔC_p de las transiciones. Este procedimiento también lleva a que $C_{p,N}=0$ a todas las temperaturas.

Este modelo no considera que la entalpía calorimétrica y la entalpía de van’t Hoff ($\Delta H_{T_m}^{vH}$) sean iguales, de modo tal que ambas deben incluirse en las ecuaciones de ajuste:

$$C_{p,N}(T) = \frac{K_U(T) \cdot \Delta H_{T_m}^{vH} \cdot \Delta H_{T_m}}{[1 + K_U(T)]^2 RT^2} \quad (A.1)$$

En este caso la constante de equilibrio de desplegado en el equilibrio K_U se calcula considerando la entalpía de van’t Hoff:

$$K_U = \exp \left[\frac{-\Delta H_{T_m}^{vH}}{RT} \cdot \left(1 - \frac{T}{T_m} \right) \right] \quad (A.2)$$

Estas ecuaciones se usan para ajustar a los termogramas, y los parámetros de ajuste son T_m , ΔH_{T_m} y $\Delta H_{T_m}^{vH}$.

Apéndice B

^1H - δ y ^{15}N - δ de $\beta 2\text{S}$ –PDZ

La siguiente tabla contiene el valor de desplazamiento químico del ^{15}N y del ^1H del esqueleto carbonado para cada residuo identificado en el ^{15}N - ^1H -HSQC de $\beta 2\text{S}$ –PDZ.

Residuo	^1H δ (ppm)	^{15}N δ (ppm)
R2	9.23495	125.13486
R3	8.53254	122.44815
V4	9.07850	125.15125
R5	8.58014	128.42741
V6	9.18571	126.75537
V7	8.39519	126.11190
K8	9.00273	125.93413
I16	7.63479	113.27997
S17	8.51263	117.63556
I18	8.56778	116.23708
K19	9.27118	119.94865
G20	8.67793	106.48289
G21	7.06601	109.84290
R22	8.53731	122.50562
E23	11.68694	125.47996
N24	7.95803	118.36914
R25	8.17225	115.50772
M26	7.40373	116.78222
I28	8.19355	118.69706
L29	8.59888	127.04015
I30	8.76670	119.03735
S31	9.28709	126.06824

Continúa en la página siguiente.

Residuo	^1H δ (ppm)	^{15}N δ (ppm)
K32	7.31798	121.29115
I33	8.44576	124.79875
F34	8.41683	127.94459
G36	10.14297	111.91706
Q9	8.07257	119.38338
L37	6.97286	120.27961
A38	7.87647	118.67783
A39	8.29549	118.93061
D40	9.16261	124.17556
Q41	8.30585	115.58326
S42	7.70612	113.43906
R43	7.63980	115.29485
A44	7.85963	120.34326
L45	8.09314	118.62244
R46	8.90181	120.81162
L47	8.33287	120.68208
G48	8.77839	111.93301
D49	7.77011	120.83210
A50	8.89148	123.51303
I51	8.74762	120.38219
L52	9.24585	126.67544
S53	7.67172	109.20825
V54	8.12553	116.39503
N55	9.73405	128.69348
G56	8.70033	103.44021
T57	8.47763	120.39124
D58	8.77476	128.55284
L59	9.17449	127.68057
R60	8.92620	124.39757
Q61	8.46953	114.39056
A62	6.86196	121.50382
T63	8.35571	111.67252
H64	10.00087	122.60113
D65	8.96344	115.34750
Q66	7.72753	117.87495
A67	8.07969	122.64714
V68	8.40560	118.46629

Continúa en la página siguiente.

Residuo	$^1\text{H } \delta$ (ppm)	$^{15}\text{N } \delta$ (ppm)
Q69	8.05615	116.52733
A70	7.88925	121.01279
L71	8.06082	116.71677
K72	8.02258	119.43131
R73	7.72294	116.05429
A74	7.08669	121.69917
G20	8.04961	106.70142
K76	8.09838	118.42170
E77	7.63266	115.08960
V78	8.95184	125.58521
L79	9.01966	128.57111
L80	9.44667	127.89867
E81	7.63350	120.68944
V82	8.99722	119.10558
K83	8.42600	125.04119

Bibliografía

- [1] A. D. Robertson and K. P. Murphy. Protein Structure and the Energetics of Protein Stability. *Chemical reviews*, 97(5):1251–1268, August 1997.
- [2] T. E. Creighton. *PROTEINS, Structures and Molecular Properties*. 2nd ed edition, 1993.
- [3] T. Lazaridis and M. Karplus. Thermodynamics of protein folding: a microscopic view. *Biophysical chemistry*, 100(1-3):367–95, January 2003.
- [4] J. Klein-Seetharaman, M. Oikawa, S. B. Grimshaw, J. Wirmer, E. Duchardt, T. Ueda, T. Imoto, L. J. Smith, C. M. Dobson, and Schwalbe H. Long-range interactions within a non-native protein. *Science.*, 295:1719–1722, 2002.
- [5] C. B. Anfinsen. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181, 1973.
- [6] J. D. Bryngelson, J. N. Onuchic, N. D. Socci, and P. G. Wolynes. Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: A synthesis. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 21(3):167–195, 1995.
- [7] J. N. Onuchic, Z. Luthey-Schulten, and P. G. Wolynes. Theory of protein folding: the energy landscape perspective. *Annual review of physical chemistry*, 48(1):545–600, January 1997.
- [8] K. A. Dill and H. S. Chan. From Levinthal to pathways to funnels. *Nature structural biology*, 4:10–19, 1997.
- [9] M. M. Garcia-Mira, M. Sadqi, N. Fischer, J. M. Sanchez-Ruiz, and V. Muñoz. Experimental identification of downhill protein folding. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5601):2191–5, December 2002.
- [10] A. Fung, P. Li, R. Godoy-Ruiz, J. M. Sanchez-Ruiz, and V. Muñoz. Expanding the realm of ultrafast protein folding: gpW, a midsize natural single-domain with alpha+beta topology that folds downhill. *J. Am. Chem. Soc.*, 130(23):7489–95, 2008.

- [11] F. Liu and M. Gruebele. Tuning lambda6-85 towards downhill folding at its melting temperature. *Journal of molecular biology*, 370(3):574–84, July 2007.
- [12] A. N. Naganathan, R. Perez-Jimenez, J. M Sanchez-Ruiz, and V. Muñoz. Robustness of downhill folding: guidelines for the analysis of equilibrium folding experiments on small proteins. *Biochemistry*, 44(20):7435–49, May 2005.
- [13] F. Y. Oliva and V. Muñoz. A simple thermodynamic test to discriminate between two-state and downhill folding. *Journal of the American Chemical Society*, 126(28):8596–7, July 2004.
- [14] D. J. Felitsky and M. T. Record. Thermal and urea-induced unfolding of the marginally stable lac repressor DNA-binding domain: a model system for analysis of solute effects on protein processes. *Biochemistry*, 42(7):2202–17, February 2003.
- [15] N. Ferguson, P. J. Schartau, T. D. Sharpe, S. Sato, and A. R. Fersht. One-state downhill versus conventional protein folding. *Journal of molecular biology*, 344(2):295–301, November 2004.
- [16] S. S. Cho, P. Weinkam, and P. G. Wolynes. Origins of barriers and barrierless folding in BBL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(1):118–23, January 2008.
- [17] V. Muñoz and J. Sánchez-Ruiz. Exploring protein-folding ensembles: A variable-barrier model for the analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 51:17646–17651, 2004.
- [18] M. Sadqi, D. Fushman, and V. Muñoz. Atom-by-atom analysis of global downhill protein folding. *Nature*, 442(7100):317–21, July 2006.
- [19] H. Lee and J. J. Zheng. PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification. *Cell communication and signaling : CCS*, 8:8, January 2010.
- [20] B. Z. Harris and W. Lim. Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *Journal of cell science*, 114(Pt 18):3219–31, October 2001.
- [21] W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten. Vmd: visual molecular dynamics. *J Mol Graph*, 14(1):33–8, 27–8, Feb 1996.
- [22] B. Z. Harris, B. J. Hillier, and W. A. Lim. Energetic determinants of internal motif recognition by PDZ domains. *Biochemistry*, 40(20):5921–30, May 2001.

- [23] B. Z. Harris, F. W. Lau, N. Fujii, R. K. Guy, and W. A. Lim. Role of electrostatic interactions in pdz domain ligand recognition. *Biochemistry*, 42(10):2797–805, Mar 2003.
- [24] G. Birrane, J. Chung, and J. Ladas. Novel mode of ligand recognition by the Erbin PDZ domain. *The Journal of biological chemistry*, 278(3):1399–402, January 2003.
- [25] N. J. Skelton, M. F. T. Koehler, K. Zobel, W. L. Wong, S. Yeh, M. T. Pisabarro, J. P. Yin, L. A. Lasky, and S. S. Sidhu. Origins of PDZ domain ligand specificity. Structure determination and mutagenesis of the Erbin PDZ domain. *The Journal of biological chemistry*, 278(9):7645–54, February 2003.
- [26] B. J. Hillier. Unexpected Modes of PDZ Domain Scaffolding Revealed by Structure of nNOS-Syntrophin Complex. *Science*, 284(5415):812–815, April 1999.
- [27] N. Basdevant, H. Weinstein, and M. Ceruso. Thermodynamic basis for promiscuity and selectivity in protein-protein interactions: PDZ domains, a case study. *J Am Chem Soc*, 42(3):227–233, 2008.
- [28] P. Jemth and S. Gianni. Current Topics PDZ Domains : Folding and Binding. *Biochemistry.*, 46(30):8701–8708, 2007.
- [29] S. Gianni, C. D. Geierhaas, N. Calosci, P. Jemth, G. W. Vuister, C. Travaglini-Allocatelli, M. Vendruscolo, and M. Brunori. A pdz domain recapitulates a unifying mechanism for protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(1):128–33, Jan 2007.
- [30] J. Murciano-Calles, E. S. Cobos, P. L. Mateo, A. Camara-Artigas, and J. C. Martinez. An oligomeric equilibrium intermediate as the precursory nucleus of globular and fibrillar supramacromolecular assemblies in a PDZ domain. *Biophysical journal*, 99(1):263–72, July 2010.
- [31] C. N. Chi, S. Gianni, N. Calosci, C. Travaglini-Allocatelli, K. Engström, and P. Jemth. A conserved folding mechanism for PDZ domains. *FEBS letters*, 581(6):1109–13, March 2007.
- [32] N. Calosci, C. N. Chi, B. Richter, C. Camilloni, A. Engström, L. Eklund, C. Travaglini-Allocatelli, S. Gianni, M. Vendruscolo, and P. Jemth. Comparison of successive transition states for folding reveals alternative early folding pathways of two homologous proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(49):19241–6, December 2008.

- [33] G. Hultqvist, S. W. Pedersen, C. N. Chi, K. Strø mgaard, S. Gianni, and P. Jemth. An expanded view of the protein folding landscape of PDZ domains. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 421(3):550–553, May 2012.
- [34] A. Sicorello, S. Torrassa, G. Soldi, S. Gianni, C. Travaglini-Allocatelli, N. Taddei, A. Relini, and F. Chiti. Agitation and high ionic strength induce amyloidogenesis of a folded PDZ domain in native conditions. *Biophysical journal*, 96(6):2289–98, March 2009.
- [35] A. H. Ahn, C. A. Freener, E. Gussoni, M. Yoshida, E. Ozawa, and L. M. Kunkel. The three human syntrophin genes are expressed in diverse tissues, have distinct chromosomal locations, and each bind to dystrophin and its relatives. *The Journal of biological chemistry*, 271(5):2724–30, February 1996.
- [36] S. Schubert, K. Knoch, J. Ouwendijk, S. Mohammed, Y. Bodrov, M. Jäger, A. Altkrüger, C. Wegbrod, M. E. Adams, Y. Kim, S. C. Froehner, O. N. Jensen, Y. Kalaidzidis, and M. Solimena. β 2-syntrophin is a cdk5 substrate that restrains the motility of insulin secretory granules. *PLoS One*, 5(9):e12929, 2010.
- [37] T. Ort, S. Voronov, J. Guo, K. Zawalich, S. C. Froehner, W. Zawalich, and M. Solimena. Dephosphorylation of β 2-syntrophin and ca^{2+}/μ -calpain-mediated cleavage of ica512 upon stimulation of insulin secretion. *EMBO J*, 20(15):4013–23, Aug 2001.
- [38] M. P. Sica, M. E. Primo, M. R. Ermácora, and E. Poskus. High-yield expression of properly folded insulinoma-associated protein intracellular domain (IA-2ic) in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 37(3):301–309, 2003.
- [39] J. Sambrook, E.F. Fritsch, and T. Maniatis. *Molecular cloning : a laboratory manual*. 1 edition, 1989.
- [40] F. W. Studier. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1):207–234, May 2005.
- [41] G. M. Torchio. *Clonado, expresión y purificación de dos dominios proteicos involucrados en la regulación de la secreción de insulina*. Tesina de licenciatura, licenciatura en biotecnología, Universidad Nacional de Quilmes, 2008.
- [42] von J. G. Schägger H. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, 166(2):368–79, 1987.

- [43] N. A. Baker, D. Sept, S. Joseph, M. J. Holst, and J. A. McCammon. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(18):10037–41, Aug 2001.
- [44] M. A. Buck, T. A. Olah, C. J. Weitzmann, and B. S. Cooperman. Protein estimation by the product of integrated peak area and flow rate. *Analytical Biochemistry*, 182(2):295–299, 1989.
- [45] G. D. Fasman. *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. Springer, 1996.
- [46] S. M. Kelly, T. J. Jess, and N. C. Price. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1751(2):119–139, August 2005.
- [47] J. Wu, J.T. Yang, and C.S. Wu. Beta-ii conformation of all-beta proteins can be distinguished from unordered form by circular dichroism. *Anal Biochem.*, 200(2):359–64, 1992.
- [48] Press W.H., S.A. Teukolsky, W.T. Vetterling, and B.P. Flannery. *Numerical Recipes in C. The art of scientific computing*. Cambridge University Press, 1992.
- [49] J. Keeler. Understanding nmr spectroscopy. on line. <http://www-keeler.ch.cam.ac.uk/lectures/Irvine/>, 2002.
- [50] Ruso, J. and Piñeiro, A. *Proteins in Solution and at Interfaces: Methods and Applications in Biotechnology and Materials Science*. 1st edition, 2013.
- [51] Cavanagh, J. and Fairbrother, W. and Palmer III, A. and Rance, M. and Skelton, N. *Protein NMR Spectroscopy. Principles and Practice*. 2nd edition, 2007.
- [52] F. Delaglio, S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, and A. Bax. NMR-Pipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *Journal of Biomolecular NMR*, 6(3):277–293, 1995.
- [53] B. A. Johnson and R. A. Blevins. NMR View: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. *Journal of Biomolecular NMR*, 4(5):603–614, 1994.
- [54] Y. Shen, F. Delaglio, G. Cornilescu, and A. Bax. Talos+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from nmr chemical shifts. *Journal of Biomolecular NMR*, 44(4):213–223, 2009.

- [55] D. K. Wilkins, S. B. Grimshaw, V. Receveur, C. M. Dobson, J. A. Jones, and L. J. Smith. Hydrodynamic Radii of Native and Denatured Proteins Measured by Pulse Field Gradient NMR Techniques†. *Biochemistry*, 38(50):16424–16431, November 1999.
- [56] J. R. Warren and J. A. Gordon. On the refractive indices of aqueous solutions of urea. *The Journal of Physical Chemistry*, 70(1):297–300, 1966.
- [57] R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2008. ISBN 3-900051-07-0.
- [58] J. K. Myers, C. Nick Pace, and J. Martin Scholtz. Denaturant m values and heat capacity changes: Relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Science*, 4(10):2138–2148, 1995.
- [59] E. Freire. Chapter 9. differential scanning calorimetry. In B. A. Shirley, editor, *Protein Stability and Folding. Theory and Practice*, pages 191–218. Humana Press Inc., 1995.
- [60] E. Freire and R. L. Biltonen. Statistical mechanical deconvolution of thermal transitions in macromolecules. I. Theory and application to homogeneous systems. *Biopolymers*, 17(2):463–479, February 1978.
- [61] N. Ferguson, P. J. Schartau, T. D. Sharpe, S. Sato, and A. R. Fersht. One-state downhill versus conventional protein folding. *Journal of molecular biology*, 344(2):295–301, November 2004.
- [62] T Ort, E Maksimova, R Dirkx, A M Kachinsky, S Berghs, S C Froehner, and M Solimena. The receptor tyrosine phosphatase-like protein ica512 binds the pdz domains of beta2-syntrophin and nnos in pancreatic beta-cells. *Eur J Cell Biol*, 79(9):621–30, Sep 2000.
- [63] N. J. Greenfield. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *NIH Public Access*, 1(6):2527–2535, 2009.
- [64] H. Feng, N. Vu, and Y. Bai. Detection of a hidden folding intermediate of the third domain of PDZ. *Journal of molecular biology*, 346(1):345–53, February 2005.
- [65] S. Gianni, N. Calosci, J. M. a Aelen, G. W. Vuister, M. Brunori, and C. Travaglini-Allocatelli. Kinetic folding mechanism of PDZ2 from PTP-BL. *Protein engineering, design & selection : PEDS*, 18(8):389–95, August 2005.

- [66] J. Murciano-Calles, E. S. Cobos, P. L. Mateo, A. Camara-Artigas, and J. C. Martinez. A comparative analysis of the folding and misfolding pathways of the third PDZ domain of PSD95 investigated under different pH conditions. *Biophysical chemistry*, 158(2-3):104–10, October 2011.
- [67] A. Ulrich. Chapter 3. stability and stabilization of proteins: The ribonuclease a example. In Eric C. Walters, editor, *Protein Folding*, pages 83–118. Nova Science Publishers, 2011.
- [68] N. Ferguson, T. D. Sharpe, C. M. Johnson, P. J. Schartau, and A. R. Fersht. Structural biology: analysis of 'downhill' protein folding. *Nature*, 445(7129):E14–5; discussion E17–8, February 2007.
- [69] A. N. Naganathan, U. Doshi, Ad. Fung, M. Sadqi, and V. Muñoz. Dynamics, energetics, and structure in protein folding. *Biochemistry*, 45(28):8466–75, Jul 2006.
- [70] V. Muñoz. Conformational dynamics and ensembles in protein folding. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 36:395–412, January 2007.