



Universitat
de les Illes Balears

Aplicación de la RMN al estudio a nivel residual de la termodinámica de desplegamiento y plegamiento del dominio H2H3 de la proteína priónica

Joan Mas Monserrat

Memoria del Trabajo de Fin de Máster

Máster Universitario en Ciencia y tecnología química
(Especialidad de Química Biológica)

de la

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS

Curso Académico 2016/17

Fecha: 31/08/2017

Tutor del Trabajo: Miquel Adrover Estelrich

Índice

1. Resumen	4
2. Introducción.....	5
2.1. La estructura de las proteínas es la clave de su función.....	5
2.2. Fuerzas que definen la estructura proteica	6
2.3. Mecanismos de plegamiento/desplegamiento.....	8
2.4. Técnicas experimentales para estudiar el plegamiento/desplegamiento proteico	11
2.5. El desplazamiento químico en la RMN como sensor estructural....	14
2.6. La proteína priónica	16
2.6.1. Transición PrP^C → PrP^{Sc}	17
2.6.2. Formación de agregados amiloides	19
3. Objetivos	20
4. Materiales y métodos.....	22
4.1. Producción recombinante y purificación del dominio V del RAGE humano.....	22
4.1.1. Optimización de los métodos de producción y purificación	23
4.2. Preparación de la muestra del dominio H2H3	24
4.3. Estudio estructural del dominio H2H3.....	24
4.3.1. Procesado de los espectros	25
4.4. Análisis de los datos experimentales.....	26

4.5. Visualización de la estructura.....	27
5. Resultados y discusión.....	28
5.1. Optimización de los métodos de producción y purificación	28
5.2. Estudio macroscópico del desplegamiento y replegamiento del dominio H2H3	29
5.2.1. Espectroscopia de fluorescencia.....	29
5.2.2. Espectroscopia de dicroísmo circular.....	30
5.3. Estudio a nivel residual del desplegamiento y replegamiento del dominio H2H3	33
5.3.1. Perfiles de desplegamiento.....	34
5.3.2. Temperatura de fusión de desplegamiento	36
5.3.3. Entalpia de desplegamiento.....	39
5.3.4. Constante calorífica a presión constante de desplegamiento.....	41
5.3.5. Curvas de estabilidad para el desplegamiento.....	41
5.3.6. Comparación de los perfiles de desplegamiento y replegamiento.....	43
5.3.7. Comparación de la Tm de desplegamiento y replegamiento	45
5.3.8. Comparación de la $\Delta H(T_m)$ de desplegamiento y replegamiento	48
5.3.9. Constante calorífica a presión constante de replegamiento.....	50
5.3.10. Comparación de las curvas de estabilidad del desplegamiento y el replegamiento	51
6. Conclusión	56
7. Bibliografía.....	57

1. Resumen

La comprensión de los procesos moleculares que conllevan a la modificación estructural proteica y en numerosos casos, a su agregación, es clave para la comprensión de los mecanismos que implican el desarrollo de gran número de patologías neurodegenerativas. Una de ellas es la encefalitis espongiforme, conocida en humanos como la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. Dicha patología aparece debido a la modificación estructural de la proteína priónica (PrP), la cual posteriormente agrega y se deposita sobre las neuronas, causando su muerte.

El dominio H2H3 (formado por las hélices α -2 y 3) presenta la misma estructura tanto aislado, como cuando está integrado en el total de la proteína. A su vez, es capaz de reproducir el patrón de agregación de la proteína nativa, por lo que constituye una entidad independiente y de gran relevancia dentro del PrP. Por todo ello, la comprensión del mecanismo mediante el cual el H2H3 modifica su estructura, generando especies parcialmente plegadas que inician el proceso de agregación, es de vital importancia para entender cómo se desarrollan las patologías asociadas al PrP, pero también para el diseño de inhibidores efectivos de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.

En este trabajo se ha estudiado el proceso de desplegamiento y posterior replegamiento del dominio H2H3 del PrP ovino. Inicialmente, se utilizaron las espectroscopias de fluorescencia y de dicroísmo circular para obtener una idea macroscópica de la estabilidad del H2H3 a diferentes temperaturas. Posteriormente, se analizó a nivel residual y mediante el uso de la RMN (concretamente mediante la adquisición de espectros ^{15}N -HSQC a diferentes temperaturas) la estabilidad térmica, es decir estructural, de cada residuo y como afectaba a ella su entorno particular. Para la gran mayoría de residuos se determinaron los parámetros termodinámicos de desplegamiento y replegamiento. Entre otros aspectos, los resultados obtenidos demuestran que el desplegamiento se inicia en el extremo N-terminal del H3, para proseguir ya a temperaturas mayores y de manera simultánea sobre los extremos N-terminal del H2 y C-terminal del H3. El extremo C-terminal de H2 es la región de mayor estabilidad. El replegamiento parece ocurrir en el mismo orden secuencial, pero mediante un proceso ligeramente diferente.

2. Introducción

2.1. La estructura de las proteínas es la clave de su función

Las proteínas son unas biomoléculas que participan en gran cantidad de procesos biológicos (por ejemplo: catalizando reacciones, regulando la entrada de moléculas en las células, reconociendo células extrañas, formando el citoesqueleto, transportando moléculas por la sangre,...). Su funcionalidad está directamente relacionada con la estructura tridimensional que adquieren los aminoácidos que la forman. Es más, ligeras modificaciones estructurales suelen implicar una pérdida de la función proteica. Dichas observaciones conllevan al planteamiento de diferentes preguntas, las cuales son claves para la comprensión del binomio estructura-función: ¿Qué relación hay entre la secuencia y la estructura? ¿Cuál es el mecanismo de plegamiento de una proteína? ¿Es un proceso cooperativo entre aminoácidos o independiente? ¿Cuáles son las fuerzas inductoras? En cualquier caso, las proteínas son polímeros de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos que adoptan una determinada conformación en el espacio. Estas diferentes conformaciones vienen determinadas por cuatro niveles estructurales^[1] (Figura 1):

- **Estructura primaria:** está formada por simplemente la secuencia de los aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos.
- **Estructura secundaria:** son los contactos locales formados por enlaces de hidrógeno entre los grupos NH y CO de los enlaces peptídicos que forman el esqueleto. Estos contactos dan lugar a hélices α (si los enlaces de hidrógeno se dan entre residuos $i \rightarrow i+4$), láminas β (los enlaces de hidrógeno se dan entre residuos alejados secuencialmente [$i \rightarrow i+n$]) y giros β (caracterizados por un enlace de hidrógeno $i \rightarrow i+3$).
- **Estructura terciaria:** es la disposición en el espacio (el plegamiento) de la proteína debido al conjunto de interacciones intramoleculares que se establecen los diferentes elementos con una estructura secundaria definida.
- **Estructura cuaternaria:** es la agrupación de dos o más polipéptidos con una estructura terciaria igual o diferente. Únicamente las proteínas que necesitan de la formación de dímeros, trímeros u otros oligómeros para el desarrollo de su función, llegan a este nivel estructural.

La adopción del plegamiento adecuado es fundamental. Si la proteína no se pliega de forma correcta, no puede llevar a cabo su función^[2,3]. Este plegamiento es, en general, muy eficaz, pero en algunos casos, las proteínas no adquieren la estructura funcional y se quedan en una especie de estado intermedio de plegamiento. Este estado, conocido con el nombre de *misfolded*, generalmente se adquiere debido a mutaciones potencialmente patológicas^[4]. Sin embargo, factores “ambientales” como el estrés

oxidativo o la glicación mediante compuestos carbonílicos, facilita la adquisición de este estado parcialmente plegado^[3]. Para sobreponerse a estos errores, la célula ha desarrollado sistemas de control, como las chaperonas o las proteasas, que evitan el plegamiento parcial de la proteína y ayudan a plegarlas correctamente, o en caso de no poder evitarlo, eliminan la proteína.

Desafortunadamente, estos mecanismos tampoco son infalibles y las proteínas *misfolded* tienden a formar agregados^[2,3]. Estos agregados se depositan en tejidos celulares y se han asociado con enfermedades como la de Alzheimer, la de Parkinson, la diabetes tipo II o la encefalitis espongiforme (enfermedad de Creutzfeldt–Jakob),...^[5]

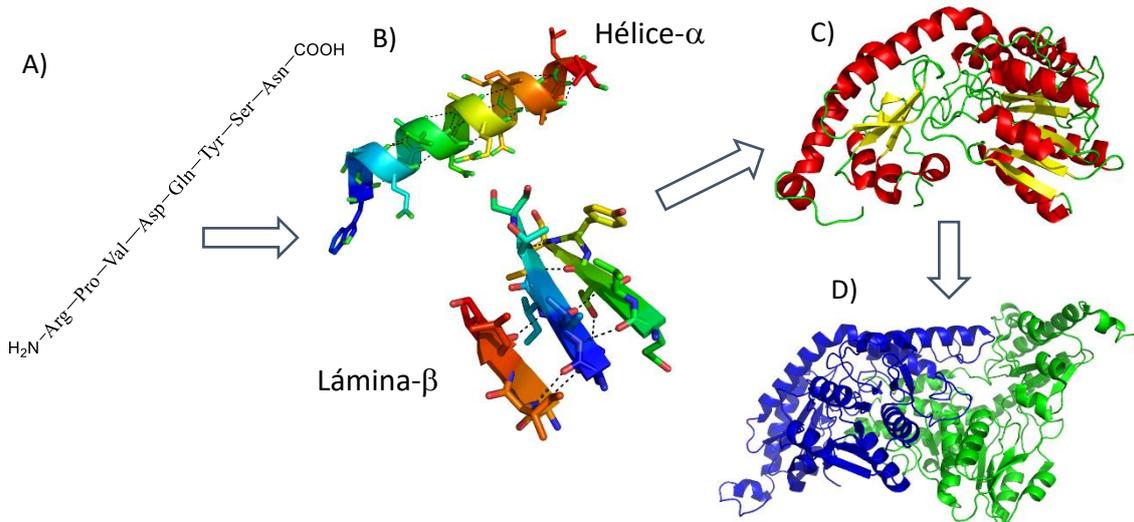


Figura 1: Ejemplos de los diferentes niveles estructurales de las proteínas: A) estructura primaria, la secuencia de los aminoácidos que forman la proteína. B) estructura secundaria, los contactos locales formados por enlaces de hidrógeno entre los grupos NH y CO del enlace peptídico que dan lugar a las hélices- α y las láminas- β . C) estructura terciaria, el plegamiento de la proteína debido al conjunto de interacciones intermoleculares. D) estructura cuaternaria, la agrupación de dos o más polipéptidos con una estructura terciaria igual o diferente. Imágenes creadas a partir de la estructura PDB: 3LVM^[99]

2.2. Fuerzas que definen la estructura proteica

En una proteína globular el estado estructuralmente funcional es el nativo. Este estado se caracteriza por una baja entropía, así como un elevado valor absoluto de la entalpía intramolecular, al presentar el mejor balance posible entre las interacciones atractivas y repulsivas^[6]. Para poder adoptar este estado es necesario vencer la penalización entrópica, pero también se tiene que superar la barrera entálpica que implica la rotura de las interacciones proteína-disolvente y compensarla con las interacciones intramoleculares. Algunas de las interacciones que se pueden encontrar en las proteínas son:

- **Enlaces de hidrógeno.** Los enlaces de hidrógeno se dan entre un donador (un hidrógeno enlazado a un átomo electronegativo) y un aceptor (un átomo electronegativo). Tanto el esqueleto de la proteína (*backbone*), como las cadenas laterales pueden formar enlaces de hidrógeno entre ellas y con el disolvente. En

el proceso de plegamiento, estos contactos con el disolvente se rompen y se compensan con interacciones intramoleculares.

- **Interacciones iónicas.** En la superficie proteica es habitual encontrar lisinas, histidinas y argininas cargadas positivamente, así como glutamatos y aspartatos cargados negativamente. Todos ellos son capaces de establecer interacciones iónicas. Si bien esta interacción en fase gas es la más energética, en disolución acuosa el efecto de la solvatación reduce el alcance de dicha interacción.
- **Interacciones hidrofóbicas.** En la mayoría de las proteínas hay residuos hidrofóbicos, los cuales tienden a formar clústeres entre sí para aislarse del disolvente polar, minimizando las repulsiones. Según C. Pace *et al* (2011)^[7], en proteínas pequeñas el efecto hidrofóbico representa un 60% de la estabilidad estructural y este se produce mediante diferentes geometrías, aunque las dos mayoritarias son: face-to-face y edge-to-face.
- **Interacciones catión- π .** Las cadenas laterales cargadas positivamente también pueden encontrarse en el interior de la proteína interaccionando con electrones π de las fenilalanina, tirosina o triptófano. Según J. Gallivan y D. Dougherty (1999)^[8], el 26% de todos los triptófanos del *Protein Data Bank* participan en interacciones catión- π .
- **Enlaces disulfuro.** Estos implican la formación de un enlace covalente entre dos átomos de azufre. Los enlaces disulfuro son el resultado de la oxidación de los azufres de dos cisteínas y contribuyen notablemente a la estabilidad estructural (entre 8-20 kJ/mol^[9]). Se ha observado que estos enlaces disminuyen la entropía del estado desplegado, lo cual restringe los grados de libertad posibles^[10].

El estado totalmente opuesto al nativo es el desplegado. La entropía de este estado es elevada, ya que no presenta las restricciones del estado nativo. La conformación característica del estado desplegado no debe confundirse con un plegamiento al azar o *random coil*. Al desnaturalizarse una proteína, parte de sus residuos hidrofóbicos quedan expuestos provocando que el disolvente forme cajas de solvatación a su alrededor. En estas cajas, las moléculas de agua se ordenan para compensar al máximo sus momentos dipolares y evitar orientarlos hacia las zonas apolares. La formación de las cajas de solvatación implica una disminución de la entropía del disolvente y un incremento de la entalpía, debida a que el agua pasa a formar 3.5 enlaces a 4 por molécula^[11]. Este gasto entrópico y la desestabilización que implica exponer los residuos aromáticos al medio, explica porque el estado desnaturalizado tiene cierta estructura, en concreto, los núcleos hidrofóbicos^[6,12-14]. De hecho, algunos estudios sugieren que el grado de conservación de la estructura nativa en el estado desplegado está relacionado con la estabilidad térmica de la proteína^[14].

2.3. Mecanismos de plegamiento/desplegamiento

La comprensión general del mecanismo de plegamiento que siguen las proteínas ha sido, desde hace tiempo, un tema de profundo debate y estudio. Sin embargo, todavía se conoce muy poco sobre ello. Un investigador pionero fue C. B. Anfinsen, quien observó que si desnaturalizaba la ribonucleasa con urea 8 M, al retirar el agente desnaturalizante esta volvía a adoptar su estructura nativa y recobraba su actividad enzimática^[15]. Según la hipótesis termodinámica propuesta por Anfinsen para las proteínas globulares pequeñas, la estructura nativa viene determinada por la secuencia de aminoácidos que la forman^[16].

Pero la hipótesis de Anfinsen no consideró el término cinético. Fue C. Levinthal quien propuso que debido al gran número de grados de libertad que presenta una proteína desplegada, debería haber un número enorme de posibles conformaciones (3^{100} o 10^{143})^[17,18]. Por tanto, una proteína necesitaría más tiempo que la edad del universo para plegarse. Pero las proteínas tardan del orden de μ s o ms en plegarse.

La hipótesis de Anfinsen indica que hay unos pocos grados de libertad permitidos, pero aun así la pregunta que muchos plantean es: ¿Cómo ocurre a nivel de estructura secundaria y terciaria el plegamiento? Son varios los modelos propuestos.

El modelo de la nucleación, propuesto por Wetlauder en 1973^[19], sugiere que un primer núcleo local de estructura secundaria induce la rápida formación de toda la estructura secundaria de la proteína y por tanto, no habría intermedios durante el proceso de plegamiento.

El modelo de difusión-colisión de Karplus y Weaver (1976)^[20], propone que al formarse los primeros vestigios de estructura secundaria, estos se propagan por difusión y/o colisión a través de toda la cadena, pudiendo formar regiones con estructura transitoria. Al final, todos los grupos locales se fusionan formando la estructura.

El modelo armazón o *framework* fue propuesto por Kim y Baldwin en 1982^[21], y sugiere que los elementos de estructura secundaria se forman independientemente, aunque se propagan formando toda la estructura secundaria (ya sea mediante nucleación o difusión-colisión) fusionándose al final para formar la estructura terciaria.

El modelo del colapso hidrofóbico dice que el plegamiento se inicia con el colapso de los residuos hidrofóbicos, restringiendo los grados de libertad y formando inicialmente la estructura terciaria, la cual induce la formación de la secundaria dentro del volumen permitido por la terciaria.

Un modelo unitario (nucleación-condensación) fue el propuesto por Fersht y Daggett^[13,22], quienes sugieren que inicialmente se forman núcleos hidrofóbicos, los cuales restringen las posibles estructuras y guían el plegamiento hacia un estado de transición con estructura secundaria y terciaria semi-formadas. En este modelo, las estructuras secundaria y terciaria no son dos entes separados, sino que durante el proceso de formación de la estructura nativa van de la mano.

Todos estos modelos sugieren que las proteínas se pliegan gracias a interacciones atractivas. Sin embargo, el propio proceso de estructuración impide que se establezcan todas las interacciones posibles, ya que la formación de una interacción puede impedir la formación de otra; creando una situación de *frustración*. El estado de menor energía es el de menor frustración, permitiendo así la formación del mayor número de interacciones atractivas.

Según Levinthal, todos los estados intermedios previos a la adquisición final de la estructura nativa tienen la misma probabilidad de formarse. Por tanto, la superficie de potencial del plegamiento debería ser una superficie plana con un mínimo en el centro, correspondiente al estado nativo. Sin embargo, si se considera que cada estado intermedio tiene diferente energía, debido a su diferente frustración, el modelo más preciso es el del embudo (*folding funnel model*)^[23]. Según este modelo, la superficie de potencial es rugosa debido a las diferentes interacciones que pueden formarse durante el plegamiento, aunque tiende hacia un claro mínimo de energía (el estado nativo). Con este modelo se explica porque algunas proteínas no se pliegan correctamente y terminan atrapadas en un estado parcialmente plegado, cayendo en una ruta que las aleja del estado nativo (Figura 2).

Al analizar el proceso de formación de la estructura nativa, se observa que en la zona alta del embudo que conduce al mínimo energético, coexisten muchos estados plegados de forma aleatoria (hay muchos grados de libertad y la cantidad exacta dependerá de la entropía del sistema). A medida que se desciende se van formando las interacciones intramoleculares y se restringen los grados de libertad, hasta llegar al estado nativo. Será la altura de las paredes (la barrera energética) la que permitirá adquirir el estado nativo con mayor o menor velocidad.

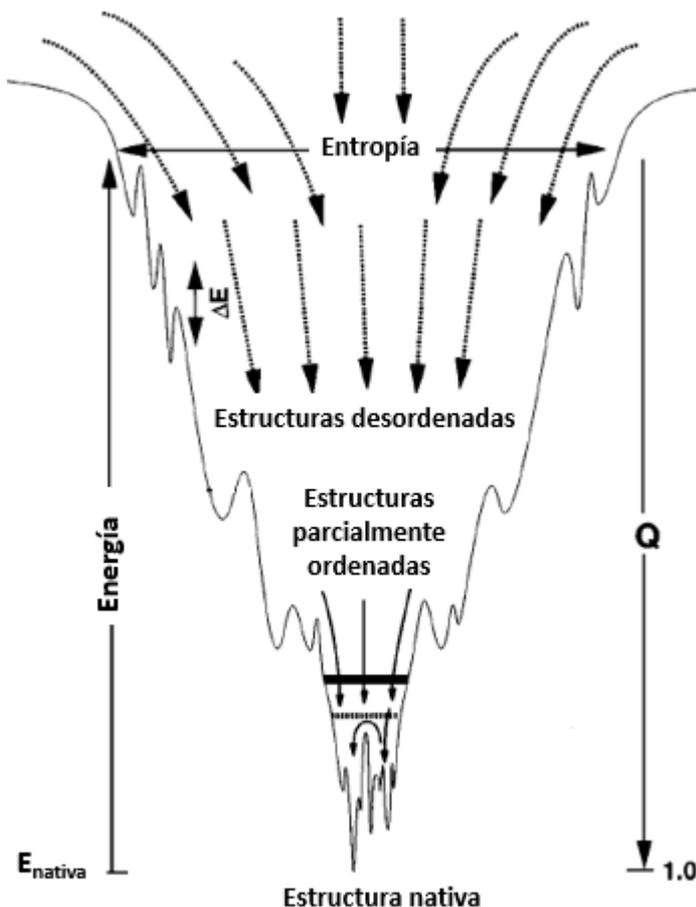


Figura 2: Modelo del embudo. La altura del embudo representa la energía del sistema y la amplitud del embudo representa la entropía. La Q es la fracción de estructura nativa, siendo 1 cuando la estructura es totalmente nativa y 0 completamente desplegada. Puede verse como hay diversos mínimos locales con elevadas barreras energéticas que harían inviable a la proteína parcialmente plegada llegar al estado nativo. Figura modificada y traducida de J. N. Onuchic, Z. Luthey-Schulten y P. G. Wolynes (1997)^[23]

El modelo del embudo abre la puerta a la existencia de intermedios. Clásicamente, el plegamiento de las proteínas se ha tratado con el modelo de dos estados: la proteína se pliega de forma continua y sin ninguna pausa mediante un proceso en el que todos los residuos cooperan para plegar la proteína. Sin embargo, podría darse el caso que se produjera un plegamiento gradual y sin cooperación entre los residuos. En el extremo del no-cooperativismo se sitúa el llamado *downhill folding* o plegamiento cuesta abajo. Según este modelo, en la coordenada de reacción sólo hay un mínimo energético (el estado nativo) y la transición no está limitada por una barrera energética^[24,25] (Figura 3). Si este fuera el caso, es razonable pensar que hay estados intermedios con pequeñas barreras energéticas que a nivel del global no pueden apreciarse^[25]. Según Fersht y Daggett^[12], aunque a nivel macroscópico no se observan intermedios, estos estados pueden presentarse de forma “silenciada” y no observarse. Por lo tanto, parece que en función del mecanismo de plegamiento seguido y de la cooperatividad, los estados intermedios se podrán apreciar o no.

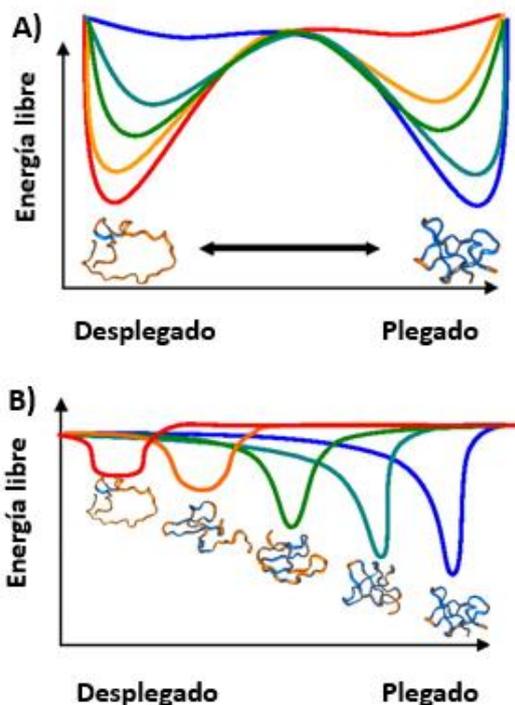


Figura 3: A) Representación de la posible ruta de plegamiento de una proteína según el modelo de dos estados. La proteína pasa de un estado totalmente desplegado (rojo) al totalmente plegado (azul) a través de un estado de transición. B) Representación de la posible ruta de plegamiento de la misma proteína según el modelo downhill folding. En este modelo se considera como gradual el proceso de plegamiento y sin una elevada barrera energética. Este modelo deja la puerta abierta a posibles estados intermedios con pequeñas barreras energéticas que a nivel del global no pueden apreciarse. Figura modificada y traducida de S. Cho, P. Weinkam y P. Wolynes PNAS (2008)^[100]

Otro escollo para poder comprender cómo se pliegan las proteínas *in vivo*, es el efecto de la propia naturaleza celular. Por mucho que se intente copiar *in vitro* el ambiente celular, muchos aspectos son imposibles de reproducir. Una diferencia es la concentración de macromoléculas (300-400 mg/ml *in vivo* y <1 mg/ml en los medios *in vitro*)^[3,26]. Esta diferencia puede parecer menor, pero cuando una proteína se está formando, sale del ribosoma al citosol^[27] (sólo después de unir entre 20 y 40 aminoácidos^[28]), hecho que expone los aminoácidos al medio de uno en uno. Esta forma de “tejer” a la proteína puede ser fundamental para que se formen las interacciones adecuadas^[29].

Uno de los mecanismos que tiene la proteína para evitar los estados *misfolded* son las chaperonas. Las chaperonas estabilizan y guían a la proteína hacia su estructura nativa. Parece que una gran parte de las proteínas sintetizadas necesitan de esta ayuda para plegarse correctamente^[2,3], sobre todo las multi-dominio, que precisan de una síntesis secuencial y un ensamblaje complejo^[12].

2.4. Técnicas experimentales para estudiar el plegamiento/desplegamiento proteico

El estudio del mecanismo particular de plegamiento y/o desplegamiento de una proteína, así como la elucidación de la existencia (o no) de estados intermedios, puede realizarse mediante diferentes técnicas experimentales aplicadas de forma individual o combinada. Algunas de ellas son:

- ***Espectroscopia de absorción UV-Vis***: se utiliza para calcular la concentración de proteína o para seguir cambios conformacionales en función de pH, temperatura o fuerza iónica.
- ***Espectroscopia de Dicroísmo circular (CD)***: se utiliza para estimar la estructura secundaria de las proteínas, revelando perfiles característicos en función del porcentaje de estructuras tipo α -hélice (dos mínimos: 208 y 220 nm), lámina- β (mínimo a 217 nm y máximo a 195 nm) o *random coil* (mínimo a 194 nm). Al desnaturalizarse la proteína se pierden estos perfiles característicos tendiendo a presentar el de tipo *random coil*.
- ***Espectroscopia de fluorescencia (FS)***: los aminoácidos fluorescentes (Trp, Tyr y Phe) pueden utilizarse para estudiar los cambios estructurales que ocurren en su entorno a medida que se perturba el sistema. Cada uno de ellos presenta una longitud de onda de excitación diferente (280, 275 y 255 nm, respectivamente) y presenta espectros de emisión diferentes. Al modificar el entorno, la intensidad de fluorescencia máxima cambia. Esta variación puede deberse a dos motivos: la exposición al disolvente (que atenúa la fluorescencia debido a los choques con el fluoróforo) o al distanciamiento de un atenuante (algún residuo cercano en el espacio que atenúe la fluorescencia en el estado nativo). En el primer caso la desnaturalización provoca una disminución de la fluorescencia, mientras que en el segundo se ve un incremento de la fluorescencia.
- ***Espectroscopia de masas (MS)***: puede aplicarse al estudio del desplegamiento proteico en combinación con experimentos de intercambio hidrógeno/deuterio. Se somete una determinada proteína a dicho intercambio durante un tiempo constante en diferentes condiciones (a diferente temperatura, diferente pH, ...) y posteriormente se digiere para analizar los fragmentos han variado su velocidad de intercambio, lo que da una idea del mecanismo de desplegamiento.
- ***Calorimetría diferencial de barrido (DSC)***: se utiliza para determinar la estabilidad térmica de una proteína y su entalpía de desplegamiento. Mide el calor entre dos celdas: la muestra y una referencia, y aplica una rampa de temperatura en función del tiempo. El procesador determina la diferencia de flujo de calor entre la muestra y la referencia.
- ***Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)***: a diferencia de las demás técnicas enumeradas (todas ellas de baja resolución) permite estudiar las variaciones de entorno para cada residuo en función de diferentes condiciones experimentales (siguiendo concretamente núcleos como ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ...).

Por tanto, la RMN ha de permitir estudiar el proceso de desplegamiento proteico a nivel residual. Para ello se pueden adquirir espectros para un solo tipo de núcleo (mono-dimensional) o para varios (espectros bi-, tri- o tetra-dimensional). Además, la espectroscopia de RMN puede utilizarse sola o complementarse con el resto de técnicas, las cuales darán una idea global del proceso de plegamiento/desplegamiento proteico.

En cualquier caso, la disección del mecanismo de plegamiento o desplegamiento global (o a nivel residual) requiere estudiar el proceso de transición desde el estado nativo hasta el desplegado, o viceversa. De manera general, el proceso de plegamiento o desplegamiento puede inducirse mediante la variación de los siguientes factores:

- **Temperatura:** la fortaleza de las fuerzas intramoleculares que definen la estructura dependen de los tipos de amino ácidos que las establecen y de su entorno. Así, cuando el valor del producto kT (dónde k es la constante de Boltzman) sea mayor que la fortaleza de cada interacción, estas se romperán. Por tanto, no todas las interacciones que definen la estructura proteica se rompen a la vez, a no ser que exista un proceso cooperativo entre ellas. La temperatura regula el peso relativo de los factores entálpico y entrópico en la ecuación:

$$G_i = H_i - T \cdot S_i \quad (1)$$

Así, para un proceso general de desplegamiento:

$$\Delta G_{despl}(T) = \Delta H_{D-N}(T) - T \cdot \Delta S_{D-N}(T) \quad (2)$$

Si la diferencia es positiva, el estado nativo está favorecido. Sin embargo, no es tan sencillo, ya que la proteína está solvatada y las moléculas de agua influyen sobre el calor específico (C_p) de cada residuo y por tanto, sobre la energía libre de Gibbs del sistema. Por tanto, el valor de C_p determina la dependencia de la entalpía y de la entropía con la temperatura:

$$\Delta H_{D-N}(T_2) = \Delta H_{D-N}(T_1) + \Delta C_p(T_2 - T_1) \quad (3)$$

$$\Delta S_{D-N}(T_2) = \Delta S_{D-N}(T_1) + \Delta C_p \ln\left(\frac{T_2}{T_1}\right) \quad (4)$$

Así, incorporando las ecuaciones 3 y 4 en la ecuación 2 se obtiene:

$$\Delta G_{despl}(T_2) = \Delta H_{D-N}(T_1) + \Delta C_p(T_2 - T_1) - T_2 \cdot \left[\Delta S_{D-N}(T_1) + \Delta C_p \ln\left(\frac{T_2}{T_1}\right) \right] \quad (5)$$

Para el proceso de plegamiento o desplegamiento, los datos termodinámicos se obtienen referidos a la temperatura de fusión (T_m), temperatura a la que un 50% de la proteína (o un 50% de un residuo dado) se encuentra en el estado plegado mientras que el 50% restante se encuentra en el estado desplegado. Por tanto:

$$\Delta S(T_m) = \frac{\Delta H(T_m)}{T_m} \quad (6)$$

Si se incorpora la ecuación (6) dentro de la (5), se obtiene la ecuación (7):

$$\Delta G_{despl}(T) = \Delta H_{D-N}(T_m) \cdot \left(\frac{T_m - T}{T_m}\right) - \Delta C_p \left[T_m - T \cdot \left(1 - \ln \frac{T_m}{T}\right)\right] \quad (7)$$

- **Agentes desnaturalizantes:** son diversos los agentes químicos que pueden desnaturalizar las proteínas. Los más comunes son la urea y el cloruro de guanidinio (GdmCl), ya que tienen una gran capacidad para formar enlaces de hidrógeno y competir con el agua en la esfera de solvatación. Además, compiten con los enlaces de hidrógeno intramoleculares, provocando la pérdida del empaquetamiento y de la estructura^[30,31].
- **Variaciones de pH:** los residuos ácidos y básicos, así como grupos protonables/desprotonables pueden estar formando interacciones claves para la adquisición de la estructura nativa. Al alterar el pH del medio, es inevitable que se cambie el patrón de enlaces de hidrógeno o de las interacciones iónicas y que, por tanto, se altere la estructura proteica.

En base a todo ello, se puede afirmar que los mecanismos de plegamiento y desplegamiento son muy sensibles al entorno. Por ello, no es de extrañar que modificaciones químicas o mutaciones de alguno de los residuos, provoque alteraciones estructurales. Estas modificaciones pueden llevar a estabilizar el estado desnaturalizado de tal manera que se cree una barrera energética tal que desplace notablemente el equilibrio entre la forma nativa y la desnaturalizada. Por otra parte, se ha descrito que el uso de agentes desnaturalizantes reduce el peso relativo de determinadas barreras^[25,32].

Entre las diferentes técnicas experimentales que pueden aplicarse al estudio del proceso de plegamiento y/o desplegamiento proteico, quizás la menos utilizada sea la más completa. La RMN es capaz de proporcionar información de nivel macroscópico y microscópico del mecanismo de plegamiento^[33,34]. Aun así, son escasos los trabajos en los que se ha aplicado con dicho fin. Un ejemplo es el llevado a cabo por el grupo de V. Muñoz, quienes en 2006 publicaron el mapa de las interacciones a nivel residual (enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, ...) de la proteína BBL^[35]. Más recientemente (2015) estudiaron la proteína gpW, mostrando que los aminoácidos presentaban diferentes perfiles de desplegamiento en función de la temperatura, los cuales dependían de su entorno estructural^[36]. Mediante este estudio, pudieron obtener el mapa de interacciones y entender como ocurre el plegamiento de esta proteína. Por otra parte, Matejková *et al* (2009), utilizaron la RMN para demostrar que la desnaturalización de la proteína ns-LTP1b (una proteína de transporte de lípido) es irreversible y ocurre a 105°C. Ajustando los datos a diversos modelos se pudieron obtener los parámetros termodinámicos de activación (ΔH^\ddagger y ΔG^\ddagger) y se comprobó cómo los resultados obtenidos por RMN eran idénticos a los obtenidos por DSC^[37].

Pero la RMN no puede aplicarse a todas las proteínas, únicamente podrá ser útil para estudiar los mecanismos de plegamiento/desplegamiento a nivel residual de aquellas que presenten una rápida velocidad de intercambio entre los estados plegados y desplegados. En estos casos, podrá observarse la señal promedio entre ambos estados poblacionales para cada condición experimental estudiada^[35].

La RMN permite controlar la temperatura de la muestra, por tanto, se puede utilizar la temperatura como inductor progresivo del desplegamiento. De hecho, la

RMN permite evaluar el proceso de desplegamiento/plegamiento proteico mediante indicadores independientes, entre los que destacan la variación del desplazamiento químico y la velocidad de intercambio H/D^[38]. Además, y de manera adicional, permite calcular parámetros termodinámicos globales y locales^[38,39] y obtener indicadores estructurales de los estados nativos y desnaturalizados, así como calcular la estructura de estados parcialmente plegados, en el caso de que sean estables.

2.5. El desplazamiento químico en la RMN como sensor estructural

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la RMN es una técnica muy sensible a los cambios de entorno de un átomo en concreto. La señal que se obtiene de cada núcleo en RMN es el desplazamiento químico o *chemical shift* (CS).

Cada núcleo posee un momento magnético (μ) que depende el espín nuclear, determinado por el número de protones y de neutrones. En la RMN se detecta la señal de los núcleos con espín nuclear $\frac{1}{2}$. Estos núcleos tienen, por lo tanto, dos posibles estados $m = +1/2$ (α) o $m = -1/2$ (β). Sin un campo magnético, estos dos niveles se encuentran degenerados, pero al introducirlos en un campo magnético intenso (\vec{B}_0), en el sentido del eje z, se desdoblan y su energía depende del valor de m:

$$E = -\vec{B}_0 \cdot \vec{\mu} = -m\hbar\gamma B_0 \quad (8)$$

Para que haya absorción de la radiación se debe satisfacer:

$$h\nu = \Delta E = \hbar\gamma B_0 \quad (9)$$

por tanto, la frecuencia de absorción detectada será:

$$\nu = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (10)$$

Cada núcleo se encuentra rodeado de electrones en movimiento, por lo tanto, al introducir el campo magnético externo estos generarán un movimiento para oponerse al campo externo (ley de Lenz). Así, el núcleo no percibirá el campo externo, sino una modificación proporcional (B_i):

$$B_i = B_0 - \sigma_i B_0 = B_0(1 - \sigma_i) \quad (11)$$

donde σ_i es la constante de apantallamiento. Si se introduce la ecuación (11) en la (10), cada núcleo tendrá una frecuencia de absorción (ν_i) en función de la constante de apantallamiento:

$$\nu_i = \frac{\gamma}{2\pi} \cdot B_0(1 - \sigma_i) \quad (12)$$

Para referenciar los valores de ν_i y hacerlos más manejables se transforman las frecuencias de absorción en desplazamientos químicos (δ_i), dados en ppm:

$$\delta_i = \frac{\nu_i - \nu_{ref}}{\nu_{trabajo}} \cdot 10^6 \quad (13)$$

donde generalmente, ν_{ref} es el valor de la frecuencia de absorción de trimetilsilano (TMS) y $\nu_{trabajo}$ es el valor de la frecuencia del aparato (MHz).

Como se ve en la ecuación (12), pequeños cambios en el apantallamiento del núcleo pueden afectar a la frecuencia de absorción, provocando variaciones en el CS. Las moléculas pequeñas en disolución presentan un entorno idéntico. Sin embargo, en las proteínas, cada aminoácido presenta un entorno diferente y por tanto un valor propio de CS. Los primeros en estudiar este efecto fueron Bundi y Wüthrich (1979)^[40,41] estableciendo una base de datos de los desplazamientos químicos de ^1H de los aminoácidos. En el 1995, Wishart *et al* realizaron un estudio con el fragmento Gly-Gly-X-Y-Gly-Gly, donde X e Y representaban los 20 aminoácidos naturales combinados en todas las sus posibilidades^[42]. Con este estudio, se observó que el desplazamiento químico del ^1H de la amida del *backbone* variaba unas 0.2 ppm hacia campo bajo en el fragmento Gly-Gly-X-Ala-Gly-Gly respecto al fragmento Gly-Gly-X-Gly-Gly-Gly. Pero aún se obtuvieron unos datos más interesantes. Al comparar los datos del fragmento Gly-Gly-X-Ala-Gly-Gly con los del Gly-Gly-X-Pro-Gly-Gly se vio que los CS de los $^1\text{H}^\alpha$ variaban en promedio -0.287 ± 0.036 ppm y los del $^{13}\text{C}^\alpha$ variaban 1.95 ± 0.37 ppm. Estos valores son muy similares a las variaciones del CS observadas en láminas- β ^[43], por lo tanto este simple modelo deja de proporcionar simplemente información del efecto vecinal y empieza a mezclarlo con el efecto de la estructura. Para evitar la influencia de este efecto, Tamiola *et al* (2010) estudiaron el CS de 14 proteínas intrínsecamente desplegadas y ajustaron los datos experimentales a los calculados, obteniendo errores muy bajos^[44]. En este estudio, para calcular el efecto de los residuos vecinos sobre un aminoácido dado a , se desarrolló la ecuación (14):

$$\delta^n(x, a, y, i) = \delta_{RC}^n(a) + \Delta_{-1}^n(x) + \Delta_{+1}^n(y) + \varepsilon^n(i) \quad (14)$$

donde n hace referencia al núcleo observado ($^1\text{H}^\alpha$, $^1\text{H}^\text{N}$, $^{13}\text{C}^\alpha$, ...), $\delta_{RC}^n(a)$ es el CS del aminoácido a en estado *random coil*, $\Delta_{-1}^n(x)$ es la corrección por presencia del aminoácido x en la posición anterior a a , $\Delta_{+1}^n(y)$ es la corrección por la presencia del aminoácido y en la posición posterior a a , y $\varepsilon^n(i)$ es el efecto de otros factores (temperatura, pH, ...).

Otra situación donde el entorno afecta al CS es cuando se forman estructuras secundarias. La formación de α -hélices tiene un efecto sobre los núcleos diferente a la formación de láminas- β . En los $^1\text{H}^\alpha$, la formación de α -hélices provoca una disminución de los CS, mientras que las láminas- β provocan el efecto contrario^[42,43,45]. Por otra parte, el CS de los $^{13}\text{C}^\alpha$ varia hacia campo bajo cuando están en una α -hélice y hacia campo alto cuando se encuentran en una lámina- β . Este fenómeno tiene la explicación en los ángulos diedros de cada aminoácido en dichas conformaciones^[43,45].

Otro factor que afecta al CS es el pH. La modificación del pH afecta a los equilibrios de ionización de los protones lábiles, variando el CS de la proteína en función del pH en aquellos casos que los residuos ionizables presenten interacciones claves en la estructura proteica^[46].

Los CS proteicos son también muy sensibles a la temperatura. Merutka *et al* (1995) observaron que el efecto de la temperatura sobre los hidrógenos de las cadenas laterales era mínimo. Sin embargo, en los hidrógenos del grupo amida, la variación era en promedio de ~ -7 ppb/K^[47]. En 1997, Baxter y Williamson fueron más allá y obtuvieron los CS de los $^1\text{H}^{\text{N}}$ y $^{13}\text{C}^{\alpha}$ de la BPTI entre 269 y 369 K^[48]. Su representación en función de la temperatura mostró un buen ajuste lineal para la mayoría de los aminoácidos, indicando que se puede predecir el efecto de la temperatura sobre dichos núcleos. Por otra parte, el estudio realizado por Kjaergaard *et al* (2011) utilizando el fragmento Gly-Gly-X-Gly-Gly, donde X representa cada uno de los 20 aminoácidos naturales, determinó el efecto de la temperatura sobre todos los núcleos. Se llegó a la conclusión de que la temperatura tiene un efecto despreciable sobre el $^{13}\text{C}^{\alpha}$, mientras que la mayor variación se da sobre el ^{15}N y el $^1\text{H}^{\text{N}}$ ^[49].

La variación CS ha sido utilizada para la descripción de las estructuras secundarias de las proteínas en función de su secuencia. Por tanto, constituye una herramienta excelente para estudiar los pasos consecutivos mediante los cuales se despliega una proteína^[33–36,38,39,50–52]. En los casos en que se utiliza la temperatura como agente desnaturizante, no se modifica el entorno proteico y por tanto, las variaciones del CS son debidas exclusivamente a movimientos estructurales y por tanto, los efectos explicados anteriormente pueden eliminarse mediante valores correctores^[49].

2.6. La proteína priónica

Ya se ha mencionado que las proteínas parcialmente plegadas tienden a formar agregados cuyo depósito neuronal parece ser el inductor de un amplio abanico de enfermedades neurodegenerativas como las de Alzheimer, Parkinson, o la de Creutzfeldt-Jakob. Esta última patología, conocida de manera general como encefalitis espongiiforme, se ha detectado en la mayoría de mamíferos y parece estar asociada al mal plegamiento de la proteína priónica (PrP)^[5,30,31,39,53–55]. La PrP es una proteína de membrana que se encuentra esencialmente en células del sistema nervioso de los mamíferos con una secuencia altamente conservada. Sin embargo, hoy día todavía no se conoce su función^[31,56].

Al terminarse de sintetizar, la PrP human está formada por 253 aminoácidos, pero es procesada por el retículo endoplasmático (RE) y el aparato de Golgi (AG). En el procesado se eliminan 22 residuos del extremo N-terminal y otros 23 del extremo C-terminal; además de la adición de un glicosilfosfatidilinositol (GPI) en el extremo C-terminal^[57]. En el AG se pliega y puede ser glicosilada en los residuos N181 y/o N197, pudiéndose encontrar sin glicosilar, con una y con dos glicosilaciones^[57,58]. El PrP se adhiere a la superficie celular mediante el GPI.

A la PrP, en su estado de plegamiento nativo, se le conoce cómo PrP^C (proteína priónica celular), mientras que a sus estados parcialmente desplegados se les llama PrP^{SC} (de *scrapie*, tembleque). La PrP^C presenta una región N-terminal (hasta el aminoácido 121¹) desestructurada, mientras que la región C-terminal (desde el 122 al

¹ La numeración de este párrafo hace referencia al caso concreto de la PrP de ratón^[60]

231) presenta mayoritariamente una estructura secundaria bien definida (Figura 4). La primera región incluye cinco repeticiones de un octapéptido, región que permite la unión de Cu(II), y un dominio hidrofóbico (HD) rico en alaninas y valinas^[31,58]. En el segundo dominio se encuentran dos láminas- β antiparalelas (S1: 128-130 y S2: 160-162) y tres hélices- α (H1: 143-153, H2: 171-192 y H3: 199-226)^[59]. Las H2 y H3 se conectan a través de un enlace disulfuro forzando su unión^[31,53].

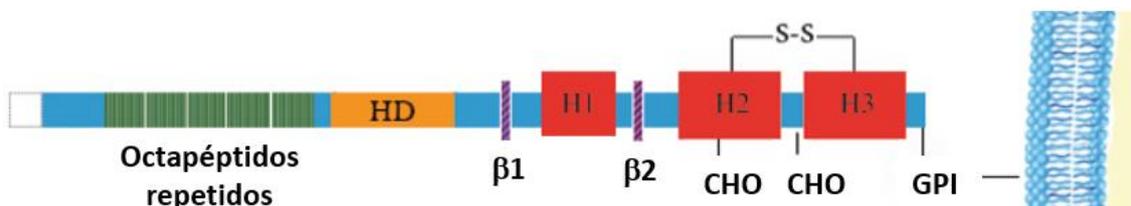


Figura 4: Representación de la estructura de la PrP^C. En la región N-terminal se encuentran cinco octapéptidos repetidos (verde) donde se unen iones cobre y el dominio hidrofóbico (HD) rico en alaninas y valinas (amarillo). En la región C-terminal se encuentran dos láminas- β antiparalelas ($\beta 1$ y $\beta 2$) y tres hélices- α (H1, H2 y H3). También se destacan los residuos N181 y N197 donde tiene lugar la glicosilación (CHO) y el enlace disulfuro (S-S) entre la H2 y H3. Finalmente se representa el GPI que adhiere la proteína a la membrana celular. Figura modificada y traducida de D. Ciric y H. Rezaei, *Front. cell Dev. Biol.* (2015)^[58]

La PrP ha sido caracterizada para muchas especies (ratones^[60], murinas^[61], humanos^[62], vacas^[63], gatos^[64], perros^[64], ovejas^[64], pollos^[65], ...) especialmente por el grupo de K. Wüthrich. A nivel global la estructura tridimensional de la PrP^C en mamíferos es casi idéntica (Figura 5), pero hay pequeñas diferencias locales. Por ejemplo, en ciervos, topillos rojos y hámsteres rusos (*Cervus elaphus*, *Myodes glareolus* y *Phodopus sungorus*, respectivamente) el *loop* que une los elementos S2 y H2 está más tenso y definido^[66], lo que se atribuye a la sustitución de la S170 por una asparagina.

Aparte de la descripción estructural, diferentes investigadores han centrado su trabajo en el estudio del mecanismo de plegamiento del PrP esencialmente utilizando RMN. Así, O. Julien *et al* (2009) siguieron el CS de varios ¹H y varias señales ¹H-¹H NOE en función de la concentración de urea, llegando a la conclusión de que no hay intermedios en la transición de la PrP bovina^[39]. En cambio, el estudio llevado a cabo por N. Kachel *et al* (2006) a elevadas presiones, sugiere la presencia de un estado intermedio en la PrP humana^[67]. Esta observación se corrobora con los estudios cinéticos de la PrP humana y ovina llevados a cabo por A. C. Apetri *et al* (2002)^[68] y K. C. Chen *et al* (2011)^[69].

2.6.1. Transición PrP^C \rightarrow PrP^{SC}

Según la hipótesis de sólo proteína (*protein-only*) el agente encargado de la propagación de la enfermedad son las mismas proteínas. Se cree que las PrP mal plegadas (PrP^{SC}) inducen el estado *misfolded* al resto^[54]. En un estudio de H. Büeler *et al* (1993) se infectaron ratones sin el gen que codifica para la PrP con PrP^{SC} de su mismo género. Como resultado se obtuvo que estos ratones no presentaban ningún síntoma de enfermedad^[70]. Como ya se ha dicho, el mecanismo por el cual una PrP^C se convierte en PrP^{SC} no se conoce aún. De hecho, de la PrP^{SC} ni siquiera se conoce su estructura, debido a que no se ha podido obtener con la suficiente pureza^[31] y únicamente se sabe que es una forma rica en láminas- β , al contrario que la PrP^C.

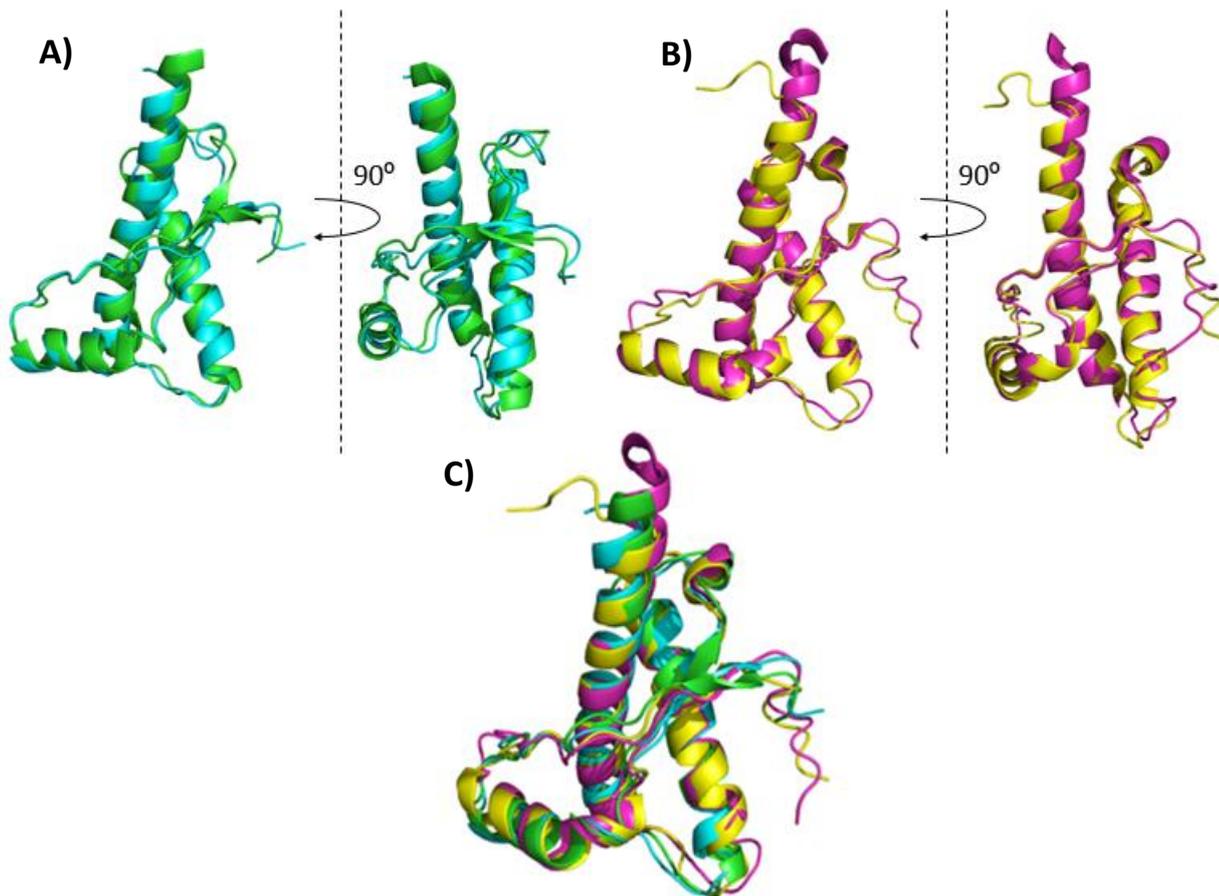


Figura 5: Comparación de cuatro estructuras resultas de PrP^C visualizando únicamente la región C-terminal. A) Comparación entre las estructuras resueltas humana (hPrP^C) (verde) y de vaca (boPrP^C) (cian). No hay grandes diferencias estructurales y sólo se diferencian ligeramente en la S1, principalmente debido a la flexibilidad de la zona. B) Comparación entre las estructuras resueltas ciervo (ePrP^C) (amarillo) y de ratón (moPrP^C) (rosa). No hay grandes diferencias estructurales entre ellas. C) Comparación de las cuatro estructuras. En el caso de las ePrP^C y moPrP^C la H1 es unos residuos de mayor longitud y S2 casi no se aprecia. Además, el loop entre S2 y H2 en ePrP^C y moPrP^C parece contener una pequeña hélice- α adicional debido a la mutación S170N (véase texto). Imágenes creadas a partir de las estructuras PDB: 1DWZ (boPrP^C)^[63], 1QM3 (hPrP^C)^[62], 1XYW (ePrP^C)^[60] y 2L1H (moPrP^C)^[60].

Pero lo que se preguntan muchos investigadores es: ¿qué provoca la formación de la primera PrP^{SC}^[54]? Cada vez parece estar más claro que las mutaciones tienen un peso importante en la conversión de las PrP^C en PrP^{SC}^[71]. Se han descrito los efectos de diversas mutaciones sobre la PrP: desestabilizan la forma PrP^C hacia un intermedio precursor de la PrP^{SC}, afectan a la estabilidad termodinámica del PrP^C, ...

En la región N-terminal se han identificado tres mutaciones con efectos diversos. Así, Forli *et al* (1999) observaron que el fragmento 89-106 se convertía en neurotóxico con la mutación P102L, pero no con la P105L^[72]. En el fragmento 106-126, la mutación A117V tiene efectos estructurales, ya que implica una rápida pérdida de la estructura secundaria^[73]. Un estudio de 2008 concluyó que *in vivo* coexisten la forma original con la forma mutada A117V^[74].

En la región C-terminal se han estudiado numerosas mutaciones. Algunos ejemplos son la D178N (afecta a una interacción iónica) y la T183A (afecta a la red de enlaces de hidrógeno). La mutación D178N incrementa significativamente la tendencia a la agregación y entre otros efectos, se ha observado que la PrP^{SC}(D178N) tiene propiedades diferentes a la PrP^{SC} formada a partir de la PrP sin mutar.^[75,76] A la par, las estabilidades de la S2^[77] y la H1^[78] son menores debido a dicha mutación, por lo que parece que la mutación D178N disminuye la barrera de activación de conversión^[71]. La

mutación T183A parece provocar una disminución notable de la estabilidad de la región C-terminal^[76]. Este efecto tan amplio parece ser debido a que la cadena lateral de la T183 interacciona con la Y162 posicionando la S2 cerca de las H2 y H3.

2.6.2. Formación de agregados amiloides

Lo que parece claro es que las PrP^{SC} terminan formando agregados insolubles (amiloides) potencialmente tóxicos para el organismo^[31,79]. Estos aparecen como resultado de minimizar las interacciones de las cadenas laterales hidrofóbicas con el disolvente en los estados parcialmente plegados. Para explicar la formación de los agregados amiloides a partir del PrP se han planteado dos hipótesis que difieren en la descripción del núcleo del agregado: la primera propone la aparición de hélices- β a raíz de un cambio conformacional proteico y que estas ejercen de núcleo de la agregación^[80] (Figura 6A). La segunda defiende que el núcleo lo forman tres láminas- β de cada monómero^[81] las cuales se asocian formando un trímero y el molde para la posterior unión de otras unidades (Figura 6B). En el primer modelo, se sugiere que la PrP^{SC} forma hélices- β internas y estas provocan la agregación en trímeros. Además, defiende que las hélices- α H2 y H3 se mantienen inalteradas. En el segundo modelo, se propone que se forma una tercera lámina- β y son las láminas- β las que están en el núcleo. Además, defiende que las tres hélices- α se mantienen inalteradas.

Sin embargo, en un estudio llevado a cabo por M. Adrover *et al* (2010)^[53] se concluye que el fragmento H2H3 del PrP de oveja y de ratón tiene la capacidad de reproducir el mismo patrón de agregación mostrado por el PrP de secuencia completa, hecho que no fue posible al analizar de forma separada el resto de la secuencia. Además, observaron que el fragmento H2H3 conservaba la estructura que presentan dichas hélices en el PrP de secuencia entera. Por lo tanto, parece que ambas hélices presentan un papel clave en la formación de fibras amiloides.

La formación de los agregados no explica porque el estado parcialmente plegado del PrP^C causa las enfermedades neurodegenerativas comentadas. Actualmente, se cree que este tipo de enfermedades tienen su origen en un incorrecto funcionamiento de la sinapsis neuronal. Este error en la sinapsis se inicia por el mal funcionamiento del axón de la neurona presináptica y por la pérdida del soma de la neurona^[82,83]. Aunque no se conoce la función de la PrP^C en la célula, se ha propuesto que tiene funciones protectoras del espacio sináptico^[84,85]. En las células presinápticas está presente en las vesículas que contienen los neurotransmisores^[86], mientras que en las células postsinápticas parece regular la actividad de los diferentes receptores de neurotransmisores^[82]. Se ha sugerido que la forma PrP^{SC} no lleva a cabo la función de la PrP^C en las vesículas presinápticas, provocando que el axón no funcione correctamente.

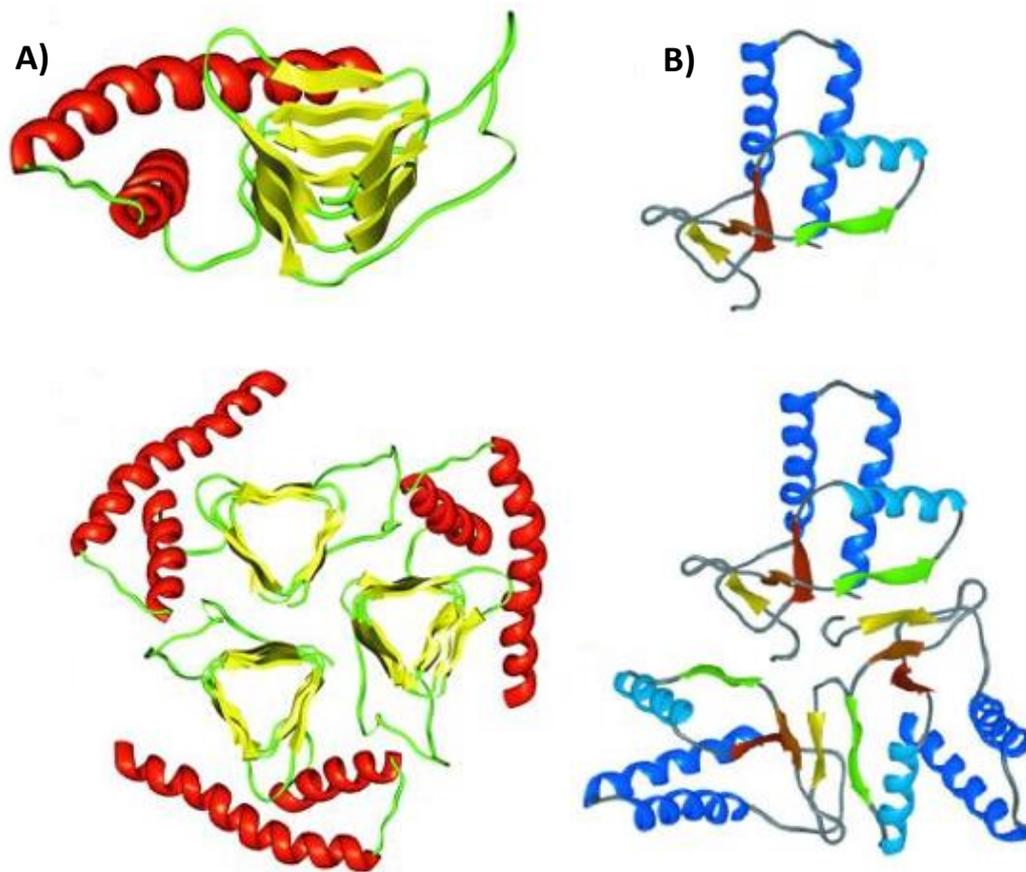


Figura 6: Modelos de cómo es la estructura de los agregados amiloideos. A) Modelo de las hélices- β . Según este modelo propuesto por Govaerts et al, la PrP^{Sc} forma hélices- β internas y estas provocan la agregación en trímeros^[80] B) Modelo de las láminas- β . Este modelo, propuesto por DeMarco et al, propone la formación de una tercera lámina- β en la región N-terminal y son las láminas- β las que están en el núcleo del agregado^[81].

3. Objetivos

Este trabajo de fin de máster presenta el objetivo fundamental de estudiar la estabilidad del dominio H2H3 del PrP^C en función de la temperatura. Mediante este estudio se pretende describir de forma detallada y a nivel residual el proceso de desplegamiento/replegamiento del H2H3 y determinar los parámetros termodinámicos tanto del desplegamiento como de su posterior replegamiento.

Este trabajo ha sido realizado mediante el uso combinado de las espectroscopias de fluorescencia y dicroísmo circular (técnicas de baja resolución que proporcionan información global de la proteína) con la RMN (una técnica que permite la obtención de detalles estructurales a nivel residual).

Para llevar a cabo este estudio se quiso utilizar el dominio V de la proteína RAGE humana (receptor para productos finales de la glicación avanzada) pero tal como se describe en el apartado de métodos, no se consiguió obtener en una pureza ni cantidad deseable. Sin embargo, este ejercicio sirvió para aprender la técnica recombinante de producción de proteínas. En base a ello, se optó por usar el fragmento H2H3 de la PrP, ya a disposición^[53].

4. Materiales y métodos

4.1. Producción recombinante y purificación del dominio V del RAGE humano

La expresión del dominio V del RAGE humano se llevó a cabo utilizando bacterias *E. Coli* BL21 infectadas con el plásmido *pET-22b(+)*. La secuencia del dominio V (aminoácidos 23-121) se obtuvo de diferentes trabajos que depositaron las estructuras resueltas en el *Protein Data Bank*: 2L7U^[87], 2MOV^[88], 3CJJ^[89] y 4YBH^[90]. Dicho plásmido incorporaba, un fragmento de seis histidinas (His₆ o *His-tag*) para poder llevar a cabo la purificación mediante una columna cromatográfica de afinidad; y un fragmento para eliminar el *His-tag* mediante la trombina. El plasmido fue construido por la empresa GenScript. El *pET-22b(+)* es un plásmido basado en el *pBR322*^[91], y presenta dos fragmentos importantes: el primero es el gen que codifica para una beta-lactamasa capaz de crear resistencia a la ampicilina, mientras que el segundo es un operador *lac* que activa la transcripción del gen con el dominio V en presencia de análogos a la lactosa (IPTG en este caso).

El dominio V fue expresado en bacterias *E. Coli* BL21 incubadas a 37°C en un medio que contenía LB (25 g/L) y ampicilina (100 µg/mL), hasta una densidad óptica a 600 nm de sobre 0.8, momento en el cual se indujo la expresión mediante IPTG 1 mM con incubación a 37°C y agitación durante 4.5 h. La muestra se centrifugó 20 min a 4,000 rpm desechando el sobrenadante. El precipitado se re-suspendió con 50 mL de Tampón A (20 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 mM imidazol, 300 mM NaCl y 5 µg/ml lisozima) agitando durante 1 h en hielo. Posteriormente se llevaron a cabo tres ciclos dentro de un baño de ultrasonidos (3 min con ultrasonidos y 5 de descanso) para posteriormente centrifugar la muestra durante 15 min a 10,000xg. El precipitado se re-suspendió en Tampón B (25 mM Tris pH 8, 1mM PMSF, 100 mM NaCl, 1 mM DTT y 2 M urea). Se repitió el mismo procedimiento de ultrasonidos y centrifugaciones, guardando el sobrenadante.

El sobrenadante se inyectó en una columna *His-Trap FF 1mL (GE-Healthcare)* previamente equilibrada con tampón 20 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl y 30 mM imidazol. El mismo tampón se utilizó para limpiar la columna después de inyectar la muestra. El dominio V fue eluido mediante un cambio de tampón utilizando el mismo tampón, pero en presencia de 500 mM de imidazol.

Con el fin de constatar que la proteína deseada se había expresado y a su vez, determinar su pureza se realizaron diferentes estudios sobre las fases recogidas durante la purificación.

- Electroforesis:

Los estudios electroforéticos se realizaron para determinar la presencia de una única o diversas proteínas en las diferentes fracciones recogidas. La electroforesis se realizó utilizando geles *Mini-PROTEAN*[®] de *Bio-Rad*[®] con un tampón 25 mM Tris, 192 mM glicina y 0.1% SDS, mientras que para la tinción del gel se utilizó el *Coomassie Brilliant Blue R-250* de *Bio-Rad*[®]. Para desteñir el gel se preparó una disolución 20% metanol y 10% ácido acético.

- Absorbancia UV-Vis:

Las medidas de absorbancia se realizaron para cuantificar la concentración de proteína en disolución. Para ello se midió su absorbancia a 280 nm utilizando el coeficiente de absorción molar determinado a partir de la secuencia del dominio V mediante la plataforma on-line *Protparam*^[92]. Dichas medidas de la absorbancia se realizaron utilizando un espectrofotómetro de doble rayo *Shimadzu UV-2401 PC* a temperatura ambiente y en cubetas de cuarzo con 1 cm de paso óptico. Como referencia se utilizó el tampón en el cual estaba la muestra en el momento de la lectura. En aquellos casos en los que se observó turbidez en alguna muestra, se centrifugó durante 10 min a 5,000 rpm antes de la lectura.

- Espectroscopia de masas:

El análisis de la muestra purificada se realizó mediante el equipo *Bruker Autoflex III Smartbeam* de los Servicios Científicotécnicos equipado con un láser de N₂ operado a $\lambda = 337\text{nm}$ en régimen pulsado.

4.1.1. Optimización de los métodos de producción y purificación

El método de obtención y purificación del dominio V de la proteína RAGE se optimizó con el fin de obtener el máximo rendimiento y la máxima pureza posible. Inicialmente se evaluó el tiempo de expresión (desde que se añade IPTG hasta que se centrifuga el cultivo) mediante la incubación de diferentes cultivos a 37°C durante 3.5, 4, 4.5 y 5 h. De cada uno de ellos se cogió una muestra antes y después de inducir la expresión y con todas ellas se realizó una electroforesis. También se evaluó la concentración óptima de IPTG para la expresión. Los cultivos de la prueba anterior se realizaron por duplicado, utilizando 1 o 2 mM de IPTG. A su vez, se estudió el efecto de la variación de la temperatura durante el período de expresión. Para ello, se indujo con IPTG 1 mM y se dejó durante 12 h en agitación a 15°C. Se cogió una muestra del cultivo antes de añadir el IPTG, una al transcurrir las 12 h.

Finalmente, se estudió que tampones eran los ideales para llevar a cabo la rotura de las células, utilizando siempre el mismo procedimiento de rotura detallado anteriormente. Los tampones utilizados fueron: Tampón A^[93] (20 mM Tris Base pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 mM imidazol, 300 mM NaCl y 5 µg/ml lisozima); Tampón B^[94] (25 mM Tris Bas pH 8.0, 1 mM PMSF, 100 mM NaCl, 1 mM DTT y 2 M urea); Tampón C^[94] (50 mM Tris Base pH 8.0, 10 mM DTT y 8 M urea) y Tampón

D^[87] (20 mM Hepes pH 7.8 y 8 M urea). En todos los casos se cogió una muestra del sobrenadante y del precipitado con los que se realizó una electroforesis.

Una vez estudiadas todas estas variables, se determinaron las condiciones ideales para la producción y purificación del dominio V de la proteína RAGE. Si bien los experimentos electroforéticos y de MALDI-TOF constataron la expresión de la proteína, en ninguno de los casos esta no se pudo obtener en cantidad ni pureza suficiente para proceder a su estudio. Es por ello, que una vez realizado todo este trabajo, se decidió utilizar el dominio H2H3 de la proteína PrP (ya a disposición del grupo) para los diferentes estudios de desplegamiento y repliegamiento proteico.

4.2. Preparación de la muestra del dominio H2H3

Inicialmente se preparó una disolución 0.4 mM del fragmento ¹⁵N-H2H3 de la proteína PrP, utilizado ya previamente por el grupo de investigación^[53]. La disolución se preparó a partir de sólido liofilizado y se disolvió en tampón citrato (5 mM) a pH 3.5. Para la determinación de la concentración en disolución se utilizó su absorbancia a 280 nm y un valor del coeficiente de extinción molar de 6085 (cm·M)⁻¹ (calculado previamente con la plataforma *on-line* Protparam^[92]).

4.3. Estudio estructural del dominio H2H3

- Espectroscopia de fluorescencia:

Los espectros de fluorescencia del dominio H2H3 se adquirieron a partir de una disolución 0.4 mM de H2H3 en tampón citrato (5 mM y pH 3.5). Los espectros se obtuvieron excitando las tirosinas a 270 nm y recogiendo la emisión entre 290 y 400 nm a diferentes temperaturas entre 2.5 a 90°C. El equipo utilizado fue un *Varian Cary Eclipse* equipado con un controlador de temperatura *Peltier Multicell Holder*. Con el fin de determinar si el proceso de desnaturalización térmica sigue el mismo camino que el repliegamiento, se adquirieron los espectros dos veces, la primera subiendo la temperatura y la segunda disminuyéndola.

- Espectroscopia de dicroísmo circular:

Los espectros de dicroísmo circular del dominio H2H3 se adquirieron a diferente temperatura a partir de una disolución 0.4 mM de H2H3 en tampón citrato (5 mM y pH 3.5). Para ello se utilizó un espectropolarímetro *J-715 (JACSO)*² equipado con un *Peltier Cell Holder*. Los espectros se adquirieron entre 260 y 190 nm utilizando una cubeta de cuarzo de 1 mm de paso óptico, entre 5 y 90°C a intervalos de 5°C. La velocidad del escáner fue de 50 nm/min con un tiempo de respuesta de 1 s y un ancho de banda de 1 nm. Cada espectro es el resultado del promedio de 5 escáneres. Las

² Equipo de la Vrije Universiteit Brussel (VUB) de Bruselas, Bélgica.

curvas de desplegamiento y replegamiento se obtuvieron utilizando el mismo espectropolarímetro, adquiriendo la señal a 220 nm en una rampa de temperatura de 1°C/min (velocidad de escáner de 50 nm/min, tiempo de respuesta de 1 s, ancho de banda de 1 nm y paso óptico de 1 mm). En todos los casos, la línea base fue corregida con el mismo tampón citrato.

- Espectroscopia RMN:

Los experimentos de RMN se realizaron sobre una muestra del dominio ¹⁵N-H2H3 de concentración 0.4 mM, preparada en tampón citrato 5 mM a pH 3.5 y en presencia de 10% (v/v) de D₂O. Se adquirieron los espectros ¹⁵N-HSQC correspondientes a diferentes temperaturas, en el intervalo de 2.5 a 90°C, utilizando un equipo *Bruker Avance III 600* operando a 14,1 T y con una criosonda CPTCI ¹H/¹⁵N Z-GRD. A fin de comprobar si el proceso de desplegamiento sigue el mismo mecanismo que el replegamiento se adquirieron los espectros dos veces, la primera subiendo la temperatura y la segunda disminuyéndola.

4.3.1. Procesado de los espectros

Los espectros ¹⁵N-HSQC adquiridos se procesaron mediante el programa *NMRPipe/NMRDraw*^[95]. Los diferentes espectros adquiridos se calibraron en la dimensión del ¹H utilizando la señal directa del agua a cada temperatura, mientras que la frecuencia del ¹⁵N se calibró indirectamente. Los espectros fueron posteriormente convertidos al formato para su análisis y estudio, proceso que se realizó utilizando el programa *Sparky*³. Las señales del espectro adquirido a 25°C se asignaron a los diferentes aminoácidos de la proteína utilizando los valores descritos en un trabajo previo (código BMRB: 16706)^[53]. Esta asignación a 25°C se tomó como punto de partida para asignar las señales de los espectros adquiridos a cada temperatura.

Una vez todos los aminoácidos estuvieron asignados a cada temperatura, su desplazamiento químico se corrigió con los valores teóricos calculados a partir de la secuencia considerando que esta se encontraba totalmente extendida. Así, los valores de desplazamiento químico obtenidos deberían únicamente contener información estructural de la proteína. Los valores de los desplazamientos químicos teóricos a partir de la secuencia fueron calculados para cada residuo a cada temperatura considerando el efecto de los residuos vecinos y el efecto del pH utilizando un algoritmo específico implementado en la página *SBiNLab*⁴. A partir de todo ello, se obtuvieron las curvas de desplegamiento/replegamiento para cada aminoácido en función de la temperatura.

³ T. D. Goddard and D. G. Kneller, SPARKY 3, University of California, San Francisco

⁴ Software desarrollado por el SBiNLab, Departamento de Biología, Universidad de Copenhague, Dinamarca (<http://www1.bio.ku.dk/english/research/bms/research/sbinlab/>)

4.4. Análisis de los datos experimentales

- Fluorescencia:

La relación entre las intensidades fluorescentes obtenidas a 360 nm y 307 nm (ratio FI) se utilizó para obtener la fracción de proteína desplegada (f_D) a cada temperatura mediante la siguiente ecuación (14)^[96]:

$$f_D = \frac{FI_T - FI_N}{FI_U - FI_N} \quad (14)$$

donde FI_T , FI_N y FI_U son las relaciones a cada temperatura, en el estado nativo (a 2,5°C) y en el estado desplegado (90°C) respectivamente.

Los valores de f_D obtenidos a cada temperatura se ajustaron a la ecuación (15) con el fin de obtener el valor de T_m promedio para la proteína H2H3:

$$f_D = F_N + \frac{F_U + F_N}{1 + e^{-\left[\frac{T-T_m}{b}\right]}} \quad (15)$$

- Dicroísmo circular:

Los valores de T_m de las curvas de dicroísmo circular se utilizó las mismas ecuaciones (14 y 15), aunque utilizando la elipticidad en lugar de los valores de FI. Los espectros de CD fueron utilizados para estudiar como variaba la estructura secundaria de la proteína H2H3 con la temperatura. Para derivar la estructura secundaria global de la proteína a partir de los espectros de CD se utilizó la plataforma on-line BeStSel (<http://bestsel.elte.hu/>)^[97].

- RMN:

Los datos corregidos de los desplazamientos químicos (CS) fueron ajustados al modelo teórico de dos estados ^[96,98]. Para ello, los valores de CS a cada temperatura se normalizaron con el valor de CS a 2.5°C. A partir de ellos, se calculó la fracción de proteína desplegada (α):

$$\alpha = \frac{CS_f - CS_T}{CS_f - CS_u} \quad (16)$$

donde CS_T , CS_f y CS_u son los desplazamientos químicos corregidos a cada temperatura, en el estado plegado (a 2.5°C) y en el estado desplegado (90°C) respectivamente. La constante de equilibrio entre los estados plegado y desplegado a una determinada temperatura viene dada por:

$$K_{eq} = \frac{\alpha}{1 - \alpha} \quad (17)$$

A partir de la constante de equilibrio puede obtenerse la energía libre de Gibbs a cada temperatura:

$$\Delta G = -RT \ln(K_{eq}) \quad (18)$$

Adicionalmente, la energía libre de Gibbs de la transición plegado/desplegado se relaciona con T_m , $\Delta H(T_m)$ y ΔC_p mediante la ecuación de Gibbs-Helmholtz (7):

$$\Delta G_{despl}(T) = \Delta H_{D-N}(T_m) \cdot \left(\frac{T_m - T}{T_m}\right) - \Delta C_p \left[T_m - T \cdot \left(1 - \ln \frac{T_m}{T}\right)\right] \quad (19)$$

Por lo tanto, al ajustar esta última ecuación a los datos experimentales se pueden obtener las T_m , $\Delta H(T_m)$ y ΔC_p para cada aminoácido.

Una vez obtenidos los valores de T_m , $\Delta H(T_m)$ y ΔC_p se pueden construir las curvas de estabilidad para cada aminoácido y obtener el valor de $\Delta S_{despl}(T)$.

4.5. Visualización de la estructura

A fin de poder ver los resultados de forma más visual se han construido diferentes representaciones de la proteína. Las figuras se han realizado utilizando el programa Pymol⁵ y con la estructura resuelta del dominio H2H3 (código PDB 2KTM^[53]).

⁵ The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.

5. Resultados y discusión

5.1. Optimización de los métodos de producción y purificación

Durante la producción del dominio V, se observó que la cantidad de proteína producida era baja. Por lo tanto, se analizaron tres variables que podían ser estudiadas a fin de conseguir un mayor rendimiento. La primera de ellas fue el tiempo de expresión (desde que se añade IPTG hasta que se centrifuga el cultivo). Para ello, se realizaron varios cultivos que se dejaron diferentes tiempos en agitación a 37°C. De cada uno, se cogió una muestra antes y después de inducir la expresión a las 3.5, 4, 4.5 y 5 h de incubación. Con todas las muestras se realizó una electroforesis y se comprobó que después de inducir la expresión, aparecía una banda de mayor intensidad en la zona de 13 kDa, característica del dominio V. La mayor diferencia entre antes y después de inducir, se dio a las 4.5h de incubación (Figura 7).

El segundo factor estudiado fue la cantidad de IPTG adecuada para conseguir la mayor expresión. Al realizar la electroforesis, se vio como la banda más intensa aparecía al inducir con IPTG 1 mM (Figura 7).

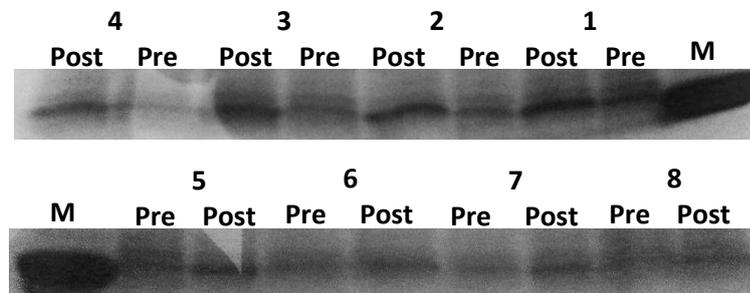


Figura 7: Geles de electroforesis enseñando la dependencia del tiempo de expresión (T_{Exp}) y de la concentración de IPTG (C_{IPTG}). Las líneas **Pre** indica que la muestra se tomó antes de inducir la expresión del plásmido, mientras que las **Post** indica que la muestra se tomó al final del tiempo de expresión estipulado. Experimento 1: T_{Exp} : 3.5 h C_{IPTG} : 1 mM; 2: T_{Exp} : 3.5 h C_{IPTG} : 2 mM; 3: T_{Exp} : 4 h C_{IPTG} : 1 mM; 4: T_{Exp} : 4 h C_{IPTG} : 2 mM; 5: T_{Exp} : 4.5 h C_{IPTG} : 1 mM; 6: T_{Exp} : 4.5 h C_{IPTG} : 2 mM; 7: T_{Exp} : 5 h C_{IPTG} : 1 mM; 8: T_{Exp} : 5 h C_{IPTG} : 2 mM. Marcador (M): lisozima 50 μ M.

El tercer factor analizado fue la temperatura de expresión. Para ello, se incubó el cultivo celular a 15°C durante 12 h y los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos al inducir la expresión durante 4.5 h a 37°C. Al realizar la electroforesis correspondiente, se apreció que la intensidad de la banda correspondiente al peso del dominio V antes y después de expresar, era casi la misma (Figura 8). Por lo tanto, la disminución de la temperatura no ayuda a mejorar la producción de dominio V.

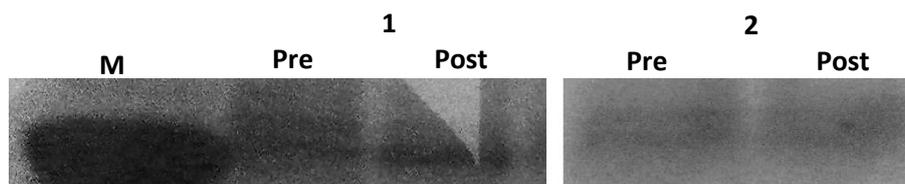


Figura 8: Geles de electroforesis para comprobar cómo afecta la temperatura de expresión. Marcador (M): lisozima 50 μ M, experimento 1: t_{exp} : 4.5 h, T_{exp} : 37°C; 2: t_{exp} : 12 h T_{exp} : 15°C. En los dos casos se indujo la expresión con IPTG 1mM. El experimento 1 es el mismo de la Figura 7-5. Las líneas Pre indica que la muestra se tomó antes de inducir la expresión del plásmido y estando a 37°C, mientras que las Post indica que la muestra se tomó al final del tiempo de expresión estipulado.

El último factor analizado fue el tampón para romper las células. Se utilizaron varios tampones de forma secuencial, cogiendo en cada caso una muestra del precipitado y del sobrenadante. Posteriormente, se realizó una electroforesis para ver con que tampón se conseguía una mejor extracción del dominio V. Los tampones A, C y D no fueron capaces de romper las células de forma eficiente y extraer la proteína. En cambio, la utilización del tampón B resultó en una banda electroforética de intensidad apreciable (Figura 9).

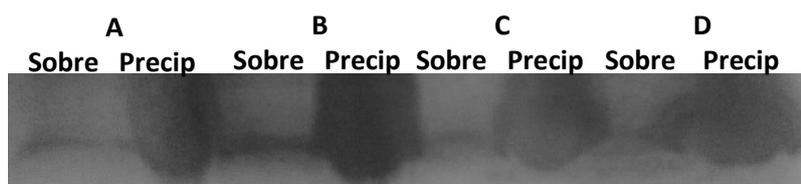


Figura 9: Geles de electroforesis para comprobar cómo afecta el tampón de rotura en la extracción de las proteínas. Las líneas Sobre indica que la muestra introducida es sobrenadante, mientras que las Precip indica que la muestra introducida fue parte del precipitado formada después de la centrifugación. Experimento A: tampón A (20 mM Tris Base pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 mM imidazol, 300 mM NaCl y 5 μ g/ml lisozima); B: tampón A seguido del tampón B (25 mM Tris Bas pH 8.0, 1 mM PMSF, 100 mM NaCl, 1 mM DTT y 2 M urea); C: tampón A seguido de los B y C (50 mM Tris Base pH 8.0, 10 mM DTT y 8 M urea); D: tampón A, seguido de B, C y D (20 mM Hepes pH 7.8 y 8 M urea).

5.2. Estudio macroscópico del desplegamiento y replegamiento del dominio H2H3

5.2.1. Espectroscopia de fluorescencia

Inicialmente, se estudió la estabilidad térmica global del dominio H2H3. Para ello, se adquirieron sus espectros de fluorescencia a diferentes temperaturas y a partir de ellos, se calculó la fracción de proteína desplegada (f_D) y se representó en función de la temperatura (Figura 10A). Los espectros de fluorescencia se adquirieron desde 0°C a 90°C (con el fin de estudiar el desplegamiento) y seguidamente, desde 90°C a 0°C (con el fin de estudiar el proceso de replegamiento) (Figura 10B).

Los datos obtenidos permitieron calcular la temperatura de fusión (T_m) tanto del proceso de desplegamiento como del posterior replegamiento, la cual indica la temperatura a la que la mitad de la proteína está desplegada y la otra mitad plegada, dando una idea de su estabilidad estructural. Al ajustar los datos experimentales de la Figura 10A a la ecuación (15), se obtuvieron valores de $51.4 \pm 1.9^\circ\text{C}$ y $44.0 \pm 1.2^\circ\text{C}$ para el desplegamiento y el replegamiento, respectivamente. Esta diferencia de $\pm 7^\circ\text{C}$ indica que el dominio H2H3 parece que no sigue el mismo camino en ambos procesos.

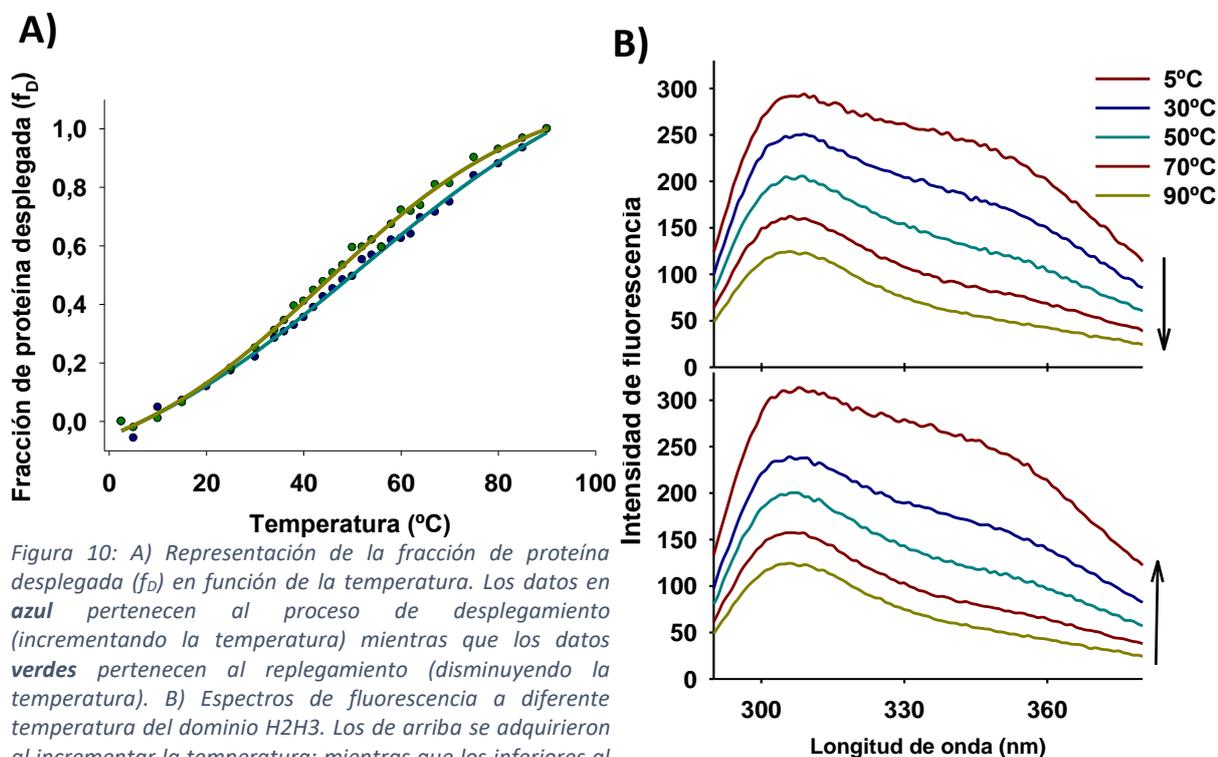


Figura 10: A) Representación de la fracción de proteína desplegada (f_D) en función de la temperatura. Los datos en azul pertenecen al proceso de desplegamiento (incrementando la temperatura) mientras que los datos verdes pertenecen al replegamiento (disminuyendo la temperatura). B) Espectros de fluorescencia a diferente temperatura del dominio H2H3. Los de arriba se adquirieron al incrementar la temperatura; mientras que los inferiores al disminuirla.

Sin embargo, la espectroscopia de fluorescencia no proporciona información estructural de cómo ocurren los procesos de desplegamiento y replegamiento, ni si después del replegamiento se adquiere la misma estructura tridimensional inicial. Para obtener dicha información a nivel macroscópico, se adquirieron los espectros de dicroísmo circular del dominio H2H3 a diferentes temperaturas. Inicialmente desde 0 a 90°C y posteriormente desde 90°C hasta 0°C . El perfil de los espectros de CD obtenidos, evidencian que la proteína pierde su estructura secundaria alfa-helicoidal a medida que se incrementa la temperatura, mientras que esta se recupera a disminuir la temperatura (Figura 11).

5.2.2. Espectroscopia de dicroísmo circular

A su vez, los valores de CD a 220 nm fueron utilizados para determinar la estabilidad térmica del dominio H2H3 durante los procesos de desplegamiento y replegamiento. El ajuste de las curvas sigmoideas a la ecuación (15) permite obtener los valores de T_m mediante CD, los cuales fueron de $42.2 \pm 0.8^\circ\text{C}$ y $39.5 \pm 1.0^\circ\text{C}$ para el desplegamiento y el replegamiento, respectivamente (Figura 12). Estos resultados son ligeramente inferiores a los obtenidos mediante fluorescencia, pero también parecen

indicar que el proceso de desplegamiento del dominio H2H3 no sigue el mismo camino que su replegamiento.

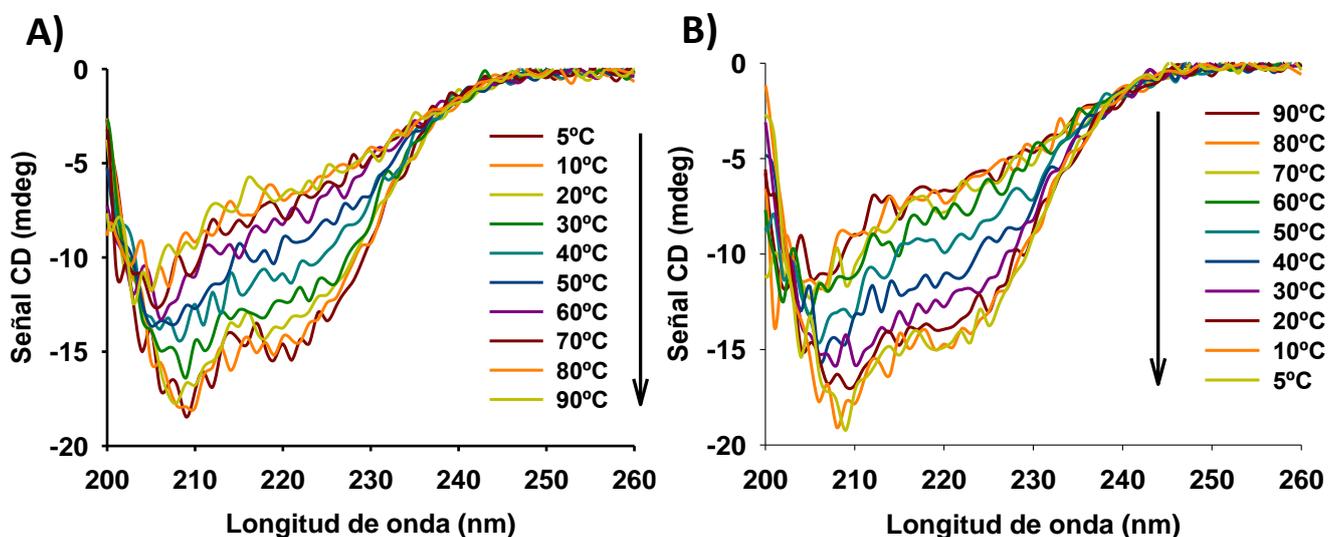


Figura 11: A) Representación de los espectros de dicroísmo circular (CD) en el proceso de desplegamiento. A bajas temperaturas pueden verse los dos mínimos característicos de las hélices- α (208 y 220 nm). B) Representación de los espectros de CD en el proceso de plegamiento. A altas temperaturas no puede apreciarse ningún mínimo característico.

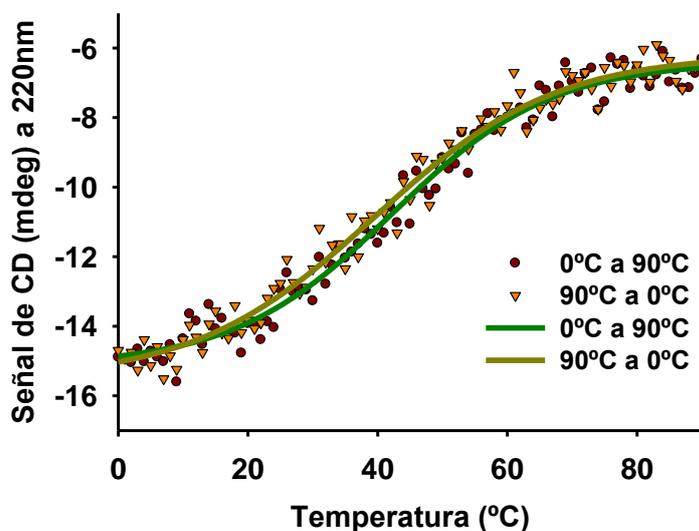


Figura 12: Representación de las señales de CD a 220 nm en función de la temperatura. Los círculos en rojo corresponden a los espectros del proceso de desplegamiento. Los triángulos invertidos en naranja corresponden a los espectros del replegamiento. La línea verde corresponde al ajuste de los puntos rojos, mientras que la línea amarilla se corresponde al ajuste de los puntos naranjas.

El valor de T_m de desplegamiento obtenido mediante CD a pH 3.5 es comparable con su valor a pH 7.0^[53]: $43.49 \pm 0.12^\circ\text{C}$. Sin embargo, este último es ligeramente superior, lo que podría ser debido a que a pH 7.0 se establece alguna interacción intramolecular inexistente a pH 3.5, dado que las cadenas laterales de glutamatos, aspártatos e histidinas presentan diferente estado de protonación.

Con el fin de evaluar el efecto del desplegamiento/replegamiento sobre el contenido en estructura secundaria de la proteína H2H3, se derivó la estructura secundaria global a partir de los espectros de CD obtenidos a diversas temperaturas (Tabla 1). Se observa claramente que, durante el proceso de desplegamiento, se produce una clara pérdida de estructura alfa-helicoidal, la cual se recupera a medida que disminuye la temperatura (durante el replegamiento). A su vez, se observa que la proporción de láminas- β es máxima a las temperaturas intermedias (40-65°C) y mínima en los dos experimentos tanto en altas como en bajas temperaturas. Este hecho sugiere que durante los procesos de desplegamiento/replegamiento podría pasarse por un intermedio de plegamiento, en donde hubiera una mayor cantidad de láminas- β que en los estados nativo y desplegado.

A su vez, se observa también que el contenido en alfa-hélice y lámina- β es mayor cuando la proteína proviene de su estado térmicamente desplegado, que antes de proceder a su desnaturalización térmica. Esta observación corroboraría la hipótesis anterior de que desplegamiento y replegamiento ocurren mediante caminos diferentes y sugeriría que la estructura nativa del H2H3 se modifica ligeramente a raíz de su replegamiento por disminución de la temperatura.

Tabla 1: Valores de porcentaje de estructura secundaria a cada temperatura obtenidos con la plataforma on-line BeStSel. Los valores indicados son aquellos que se han obtenido usando el factor de escalado con menor RMSD.

	Incremento				
	5°C	25°C	40°C	65°C	90°C
Hélice-α	59.8	56.2	44.9	16.3	21.2
Lámina-β	5.5	14.7	18.2	26.2	7.5
Giros	4.3	5.8	9.4	15.8	11.4
Otros	30.4	23.3	27.6	41.8	60
	Descenso				
	5°C	25°C	40°C	65°C	90°C
Hélice-α	62.5	55	48.7	25.5	21.9
Lámina-β	10.6	14.5	16.3	17.5	10.6
Giros	2.6	6.5	7.3	11.9	10.4
Otros	24.2	24	27.6	45.1	57.2

5.3. Estudio a nivel residual del desplegamiento y replegamiento del dominio H2H3

Los resultados obtenidos a partir de la aplicación de la fluorescencia y del CD ofrecen una idea general del proceso de desplegamiento y replegamiento de dicha proteína. Sin embargo, la aplicación de la RMN (una técnica que ofrece información a nivel residual) podría ofrecer un dibujo mucho más exhaustivo tanto del mecanismo, como de la termodinámica de dichos procesos. En base a esta suposición, se adquirieron los espectros ^{15}N -HSQC de la proteína H2H3 a diferentes temperaturas en el intervalo entre 2.5 y 90°C. Tras analizar los espectros ^{15}N -HSQC a cada temperatura, se observó que el equilibrio entre la forma plegada y la desplegada ocurre a través de un mecanismo de intercambio rápido (dentro de la escala temporal de la RMN), puesto que las señales espectroscópicas varían su desplazamiento, pero no su intensidad. Así, la posición de cada señal representa el promedio poblacional entre los diferentes estados de plegamiento existentes (Figura 13).

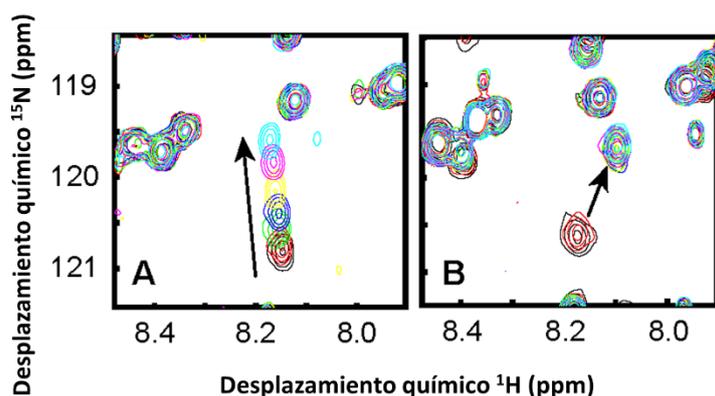


Figura 13: Espectros ^{15}N -HSQC de un pico donde la transición tiene lugar mediante un mecanismo de intercambio rápido (A) y de otro pico donde la transición ocurre a través de un mecanismo de intercambio lento (B). Figura modificada y traducida de A.N. Shemon, et al, PLoS ONE (2010)^[103]

Llegados a este punto, se determinó el valor del desplazamiento químico (CS) de las diferentes señales a cada temperatura, solapando los espectros desde 25 a 90°C y de 25 a 2.5°C (Figura 14). A su vez, y tomando como base la asignación del espectro realizada a 25°C en un trabajo previo^[53] y depositada en el *Biological Magnetic Resonance Data Bank* (BMRB) bajo el código 16706, se asignó cada señal espectroscópica a cada residuo. Una vez obtenidos los valores de CS (^{15}N y ^1H) para cada residuo a cada temperatura, se aplicaron sobre los mismos las correcciones asociadas al efecto del pH, de la temperatura y de los residuos vecinos, con el objetivo de que los valores CS contuvieran únicamente información estructural.

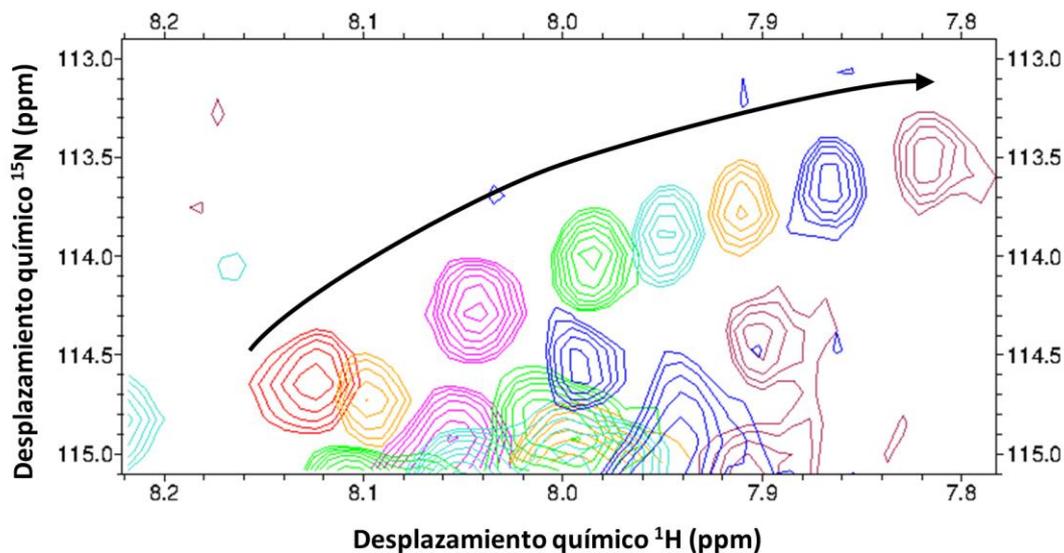


Figura 14: Espectros ^{15}N -HSQC de la T204 a diferentes temperaturas solapados. **Rojo:** 5°C, **Rosa:** 25°C, **Verde:** 40°C, **Cian:** 50°C, **Amarillo:** 60°C, **Azul:** 70°C y **Marrón:** 80°C. Tal como puede comprobarse, el equilibrio entre la forma plegada y la desplegada ocurre a través de un mecanismo de intercambio rápido, pudiéndose ver que el pico varía su desplazamiento, pero no su intensidad.

5.3.1. Perfiles de desplegamiento

La representación de los valores corregidos de CS frente a la temperatura evidenció que los residuos presentaban diferentes perfiles de desplegamiento (Figura 15 y 16). A pesar de que en muchos de los casos las curvas presentaban un perfil entre dos estados (plegado y desplegado), similar al observado para el global de la proteína mediante CD y fluorescencia, las curvas correspondientes a algunos residuos concretos indican claramente la presencia de intermedios (Figura 16).

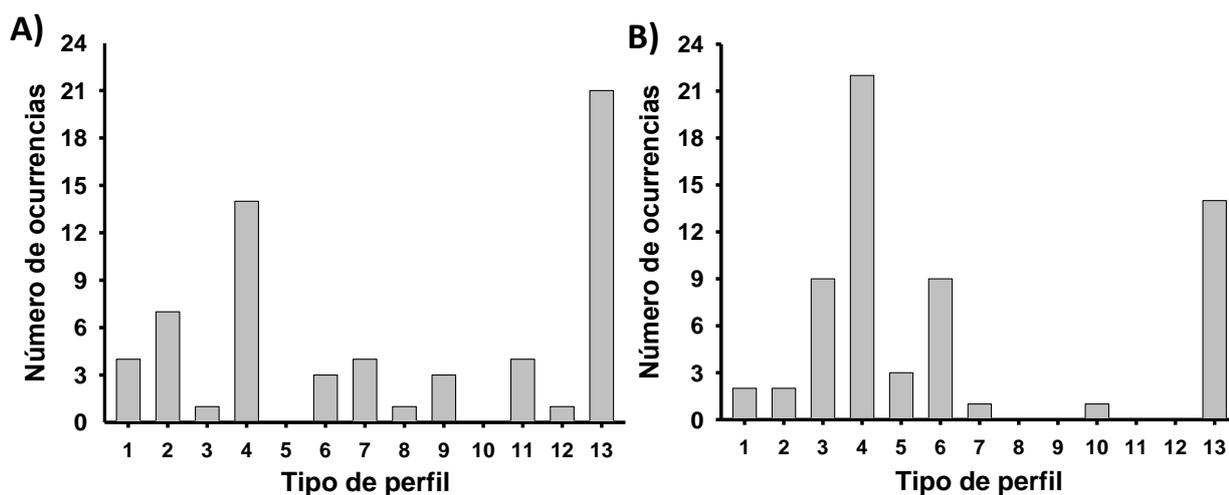


Figura 15: Histogramas de los perfiles de las curvas de desplegamiento. A) Histogramas de los perfiles de las curvas de desplegamiento utilizando los valores de CS corregidos para los núcleos de ^{15}N . B) Histogramas de los perfiles de las curvas de desplegamiento utilizando los valores de CS corregidos para los núcleos de ^1H . En los núcleos de ^{15}N los perfiles más repetidos son los tipos 4 y 13 (desplegamientos complejos). En cambio, en los núcleos de ^1H los perfiles más repetidos son 3, 4, 6 y 13.

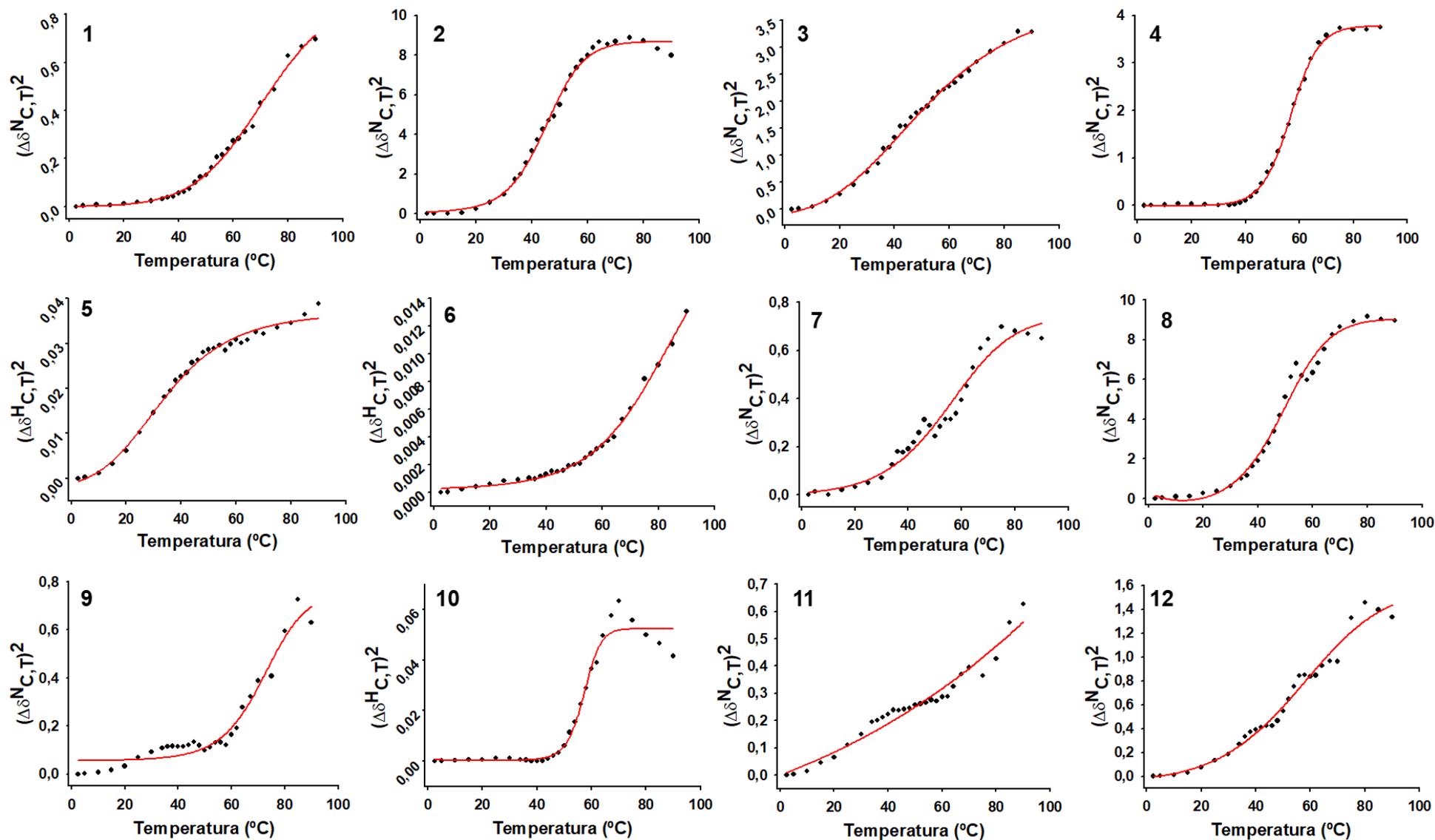


Figura 16: Ejemplos de los diferentes perfiles de despliegamiento. Cada gráfica lleva indicada si la representación se corresponde a los CS del núcleo de ^{15}N o ^1H . Las gráficas corresponden a los residuos: 1-177, 2-170, 3-169, 4-189, 5-171, 6-201, 7-178, 8-184, 9-198, 10-187, 11-196 y 12-200.

5.3.2. Temperatura de fusión de desplegamiento

Los valores de CS corregidos se trataron mediante las ecuaciones 16-18 y se ajustaron al modelo matemático de dos estados (plegado y desplegado) utilizando la ecuación (19). A partir del ajuste, se obtuvieron los valores de T_m , $\Delta H(T_m)$ y ΔC_p para cada aminoácido. Generalmente, se utilizaron los valores de CS del ^{15}N del enlace peptídico. Sin embargo, en diversos casos, el ajuste fue mejor y los resultados más realistas al utilizar los valores de CS del ^1H amídico (Figura 17). Además, el comportamiento de algunos de los aminoácidos no se pudo ajustar al modelo de dos estados ni con la curva de ^{15}N ni con la de ^1H , por lo que no se obtuvo información sobre estos aminoácidos.

El ajuste de los datos de CS vs a la temperatura a la ecuación (19) permitió obtener los valores de T_m de desplegamiento para cada residuo (Tabla 2 y Figura 18). El promedio de los valores de T_m global fue de $T_m: 54 \pm 11^\circ\text{C}$. El elevado desviamiento entre los valores, indica que el valor de T_m de los diferentes residuos no es homogéneo entre sí. Este valor no dista mucho del $51.4 \pm 1.9^\circ\text{C}$ obtenido por fluorescencia. A su vez, se obtuvieron los valores de T_m promedio de las hélices H2 y H3: $56 \pm 9^\circ\text{C}$ y $52 \pm 11^\circ\text{C}$ respectivamente. Esta diferencia en 4°C sugiere que la región que contiene la H3 presenta una menor estabilidad estructural que la región helicoidal H2.

Con los datos de T_m recogidos en la Tabla 2 se pudieron obtener los histogramas para cada intervalo de temperatura (Figura 18B) para así poder conocer sobre que valores de temperatura se lleva cado el desplegamiento de la estructura del H2H3. Se puede observar que el rango de temperaturas en las que los diferentes residuos pierden su estructura es bastante amplio, lo que indica que el proceso de desplegamiento del dominio H2H3 presenta una baja cooperatividad entre los diferentes residuos. Además, se representaron los valores de T_m sobre la estructura tridimensional del dominio H2H3 (código PDB 2KTM) (Figura 19). Esta representación permite ver con claridad un comportamiento interesante: la región con menor estabilidad térmica es con diferencia la región N-terminal de la hélice H3, seguida de las regiones C-terminal de la hélice H3 y N-terminal de la hélice H2. La región con mayor estabilidad estructural es el extremo C-terminal de la hélice H2 (Figura 19). Por tanto, este análisis permite la descripción aproximada de la secuencia de desplegamiento térmico del dominio H2H3 del PrPc.

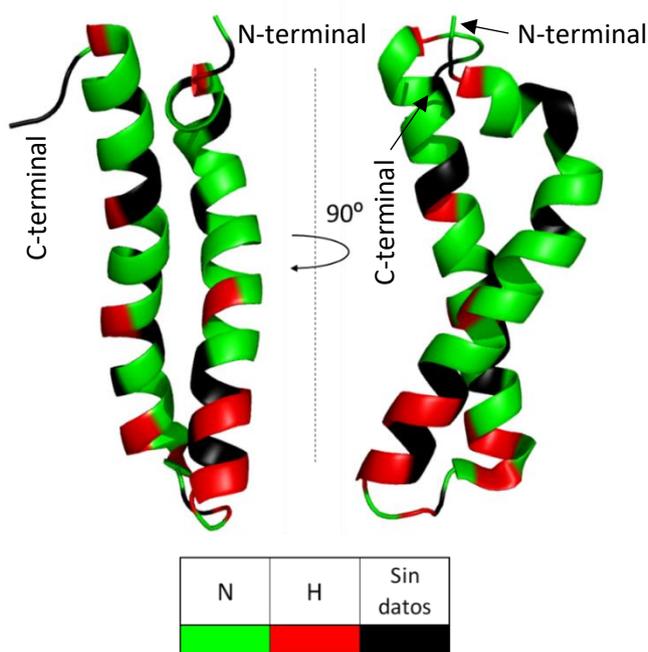


Figura 17: Representación del dominio H2H3 indicando que datos de CS fueron utilizados para ajustar el modelo de dos estados: verde: datos de ^{15}N ; rojo: datos de ^1H . En caso de que ninguna de las dos curvas de desplegamiento pudiera ser ajustada se indica en color negro. Cabe indicarse que se ajustó el mismo tipo de núcleo tanto en el desplegamiento como en el plegamiento.

Tabla 2: Valores de Tm de todos los residuos. En la columna "CS ajustado" si se ajustaron los datos de CS de ¹⁵N (N), ¹H (H) o no se pudo ajustar (-). Además, las celdas coloreadas en verde pertenecen a los residuos de la H2; por el contrario, las coloreadas en azul pertenecen a los residuos de la H3.

Residuo	CS ajustado	Tm	σ(Tm)	Residuo	CS ajustado	Tm	σ(Tm)
R167	N	74.8	1.7	F201	N	45.2	6.1
P168	-			T202	H	58.4	1.5
V169	H	48.8	4.3	E203	N	51.2	2.5
D170	N	44.8	0.2	T204	H	55.8	1.6
Q171	N	38.2	2.5	D205	H	47.4	1.8
Y172	N	48.3	0.0	I206	N	53.0	0.6
S173	-			K207	N	41.5	8.6
N174	-			I208	-		
Q175	N	54.8	0.3	M209	N	41.4	2.4
K176	N	55.9	0.3	E210	-		
N177	N	72.0	5.7	R211	H	61.8	0.9
F178	N	53.5	11.6	V212	H	60.0	0.7
V179	-			V213	N	47.0	1.1
H180	N	50.0	0.5	E214	-		
D181	N	68.8	3.5	Q215	N	57.5	0.0
C182	N	56.6	0.4	M216	N	40.8	6.7
V183	N	53.6	1.6	C217	N	74.4	12.0
N184	N	46.6	2.5	I218	N	50.3	1.3
I185	N	60.9	0.0	T219	H	27.2	4.9
T186	H	42.3	1.2	Q220	-		
V187	N	68.8	0.8	Y221	-		
K188	N	57.9	0.0	Q222	N	75.6	8.7
Q189	N	56.7	0.2	R223	N	50.3	0.5
H190	-			E224	N	53.2	0.3
T191	-			S225	-		
V192	H	61.9	12.1	Q226	N	61.2	2.1
T193	H	54.8	0.3	A227	N	48.5	0.0
T194	-			Y228	H	57.3	2.4
T195	-			Y229	N	45.8	0.4
T196	H	65.2	2.8	Q230	N	37.1	1.1
K197	H	58.6	18.5	R231	N	50.9	11.9
G198	N	72.0	5.1	G232	-		
E199	H	43.0	3.6	A233	-		
N200	-			S234	-		

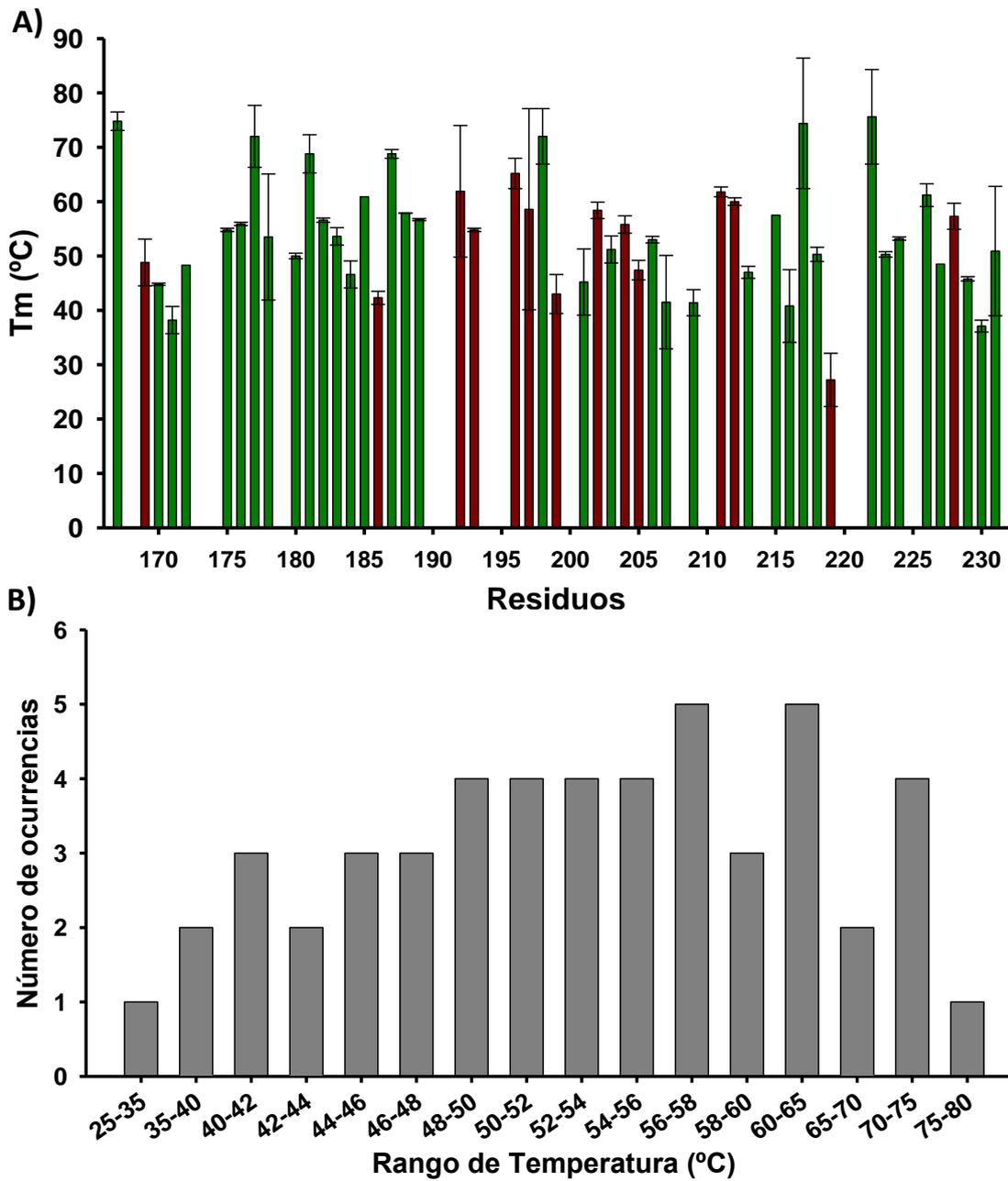


Figura 18: A) Representación de los datos de la Tabla 2. Se han representado las T_m en función de su aminoácido, indicando mediante colores, que valores han sido obtenidos ajustando los datos de CS de ^{15}N (verde) o ^1H (rojo). Los aminoácidos sin valor de T_m se debe o a que no se pudieron ajustar al modelos de dos estados (Figura 17), o a que el ajuste presentaba un elevado error y se ha descartado. Las barras de errores corresponden al error obtenido en el ajuste al modelo de dos estados. B) Histograma de las T_m de cada intervalo de temperatura a partir de los datos de la Tabla 2.

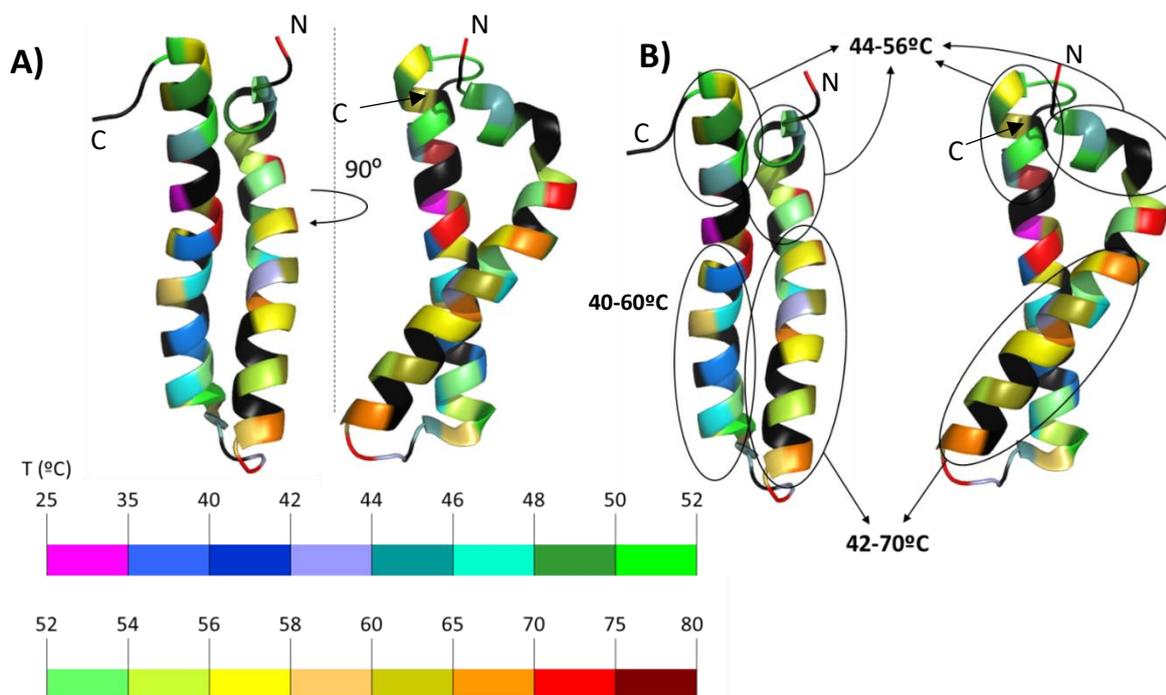


Figura 19: A) Representación del dominio H2H3 coloreado según la T_m obtenida para cada residuo. B) Representación del dominio H2H3 coloreado según la escala de A), pero indicando el intervalo de T_m de cada zona del dominio H2H3. Puede apreciarse como dos zonas presentan el mismo intervalo de T_m , como el segmento inicial de la H3 presenta un intervalo ligeramente más amplio y como el segmento final de la H2 presenta unos valores de T_m más dispares que el resto del dominio. Las letras "C" y "N" indican los extremos C-terminal y N-terminal, respectivamente.

5.3.3. Entalpia de desplegamiento

Otra de las magnitudes obtenidas en el ajuste fue la $\Delta H(T_m)$ de desplegamiento de diferentes aminoácidos. La $\Delta H(T_m)$ global para los aminoácidos ajustados utilizando los CS de ^{15}N es de 34 ± 22 kcal/mol y 15 ± 8 kcal/mol para los aminoácidos ajustados con los datos de ^1H , lo que sugiera una ligera influencia del tipo de núcleo ajustado

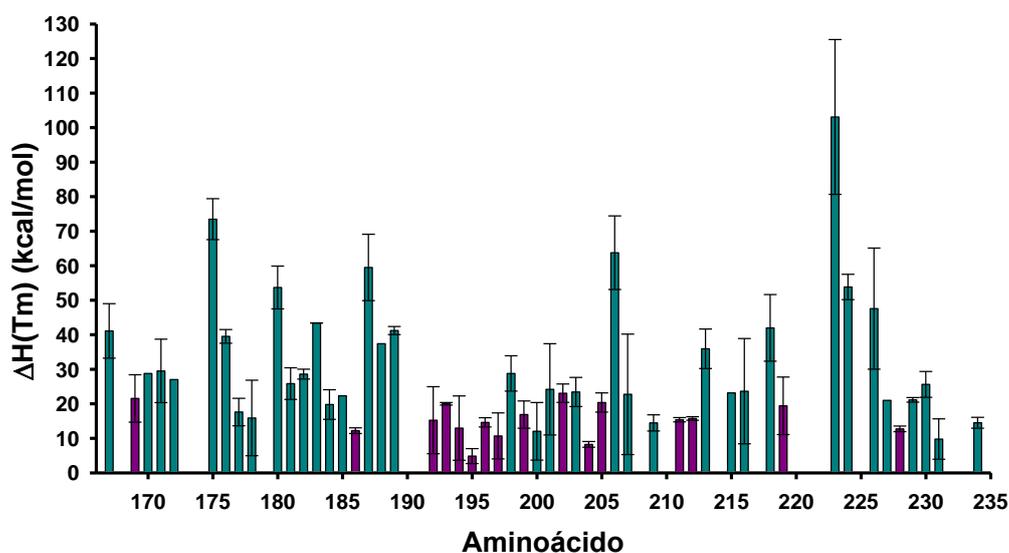


Figura 20: Representación de los valores de $\Delta H(T_m)$ obtenidos. Se han representado las entalpias en función de su aminoácido, indicando mediante colores, que valores han sido obtenidos ajustando los datos de CS de ^{15}N (cian) o ^1H (violeta). Las barras de errores corresponden al error obtenido en el ajuste al modelo de dos estados.

sobre el valor de $\Delta H(T_m)$. A partir de los valores obtenidos para cada aminoácido se pudo representar la $\Delta H(T_m)$ en función de la secuencia (Figura 20), lo que sugiere que la región que conecta las hélices H2 y H3 presenta unos valores de $\Delta H(T_m)$ ligeramente menores que el resto de la estructura, hecho que puede observarse también de manera clara al trasladar los valores de $\Delta H(T_m)$ sobre la estructura tridimensional del dominio H2H3 (Figura 21B). En cualquier caso, los valores de $\Delta H(T_m)$ de la mayoría de residuos se encuentra entre 10 y 30 kcal/mol (Figura 21A).

La $\Delta H(T_m)$ del proceso de desnaturalización indica la energía que se debe aportar al sistema para romper las interacciones débiles que cada aminoácido establece con su entorno y así, exponerlo al disolvente. Este factor termodinámico es complejo porque reúne dos conceptos: por una parte, se debe tener en cuenta las interacciones que forma en el estado nativo y su fortaleza; y, por otra, si su exposición al disolvente es favorable o no. Este último factor explica el motivo de porque esta gran diferencia entre los valores de $\Delta H(T_m)$ global en función del núcleo del cuál provienen los datos primarios. Gran parte de los parámetros obtenidos mediante los CS de 1H se encuentran en la zona del *loop* intermedio o en inmediaciones (Figura 17) y estos, así como los últimos residuos de la H3, presentan unas entalpías de desnaturalización similares y relativamente bajas. La baja estructuración de estas zonas implica que los residuos ya se encuentren expuestos al medio y justifica que estos residuos presenten unos valores de $\Delta H(T_m)$ relativamente bajos en comparación con el resto de estructura.

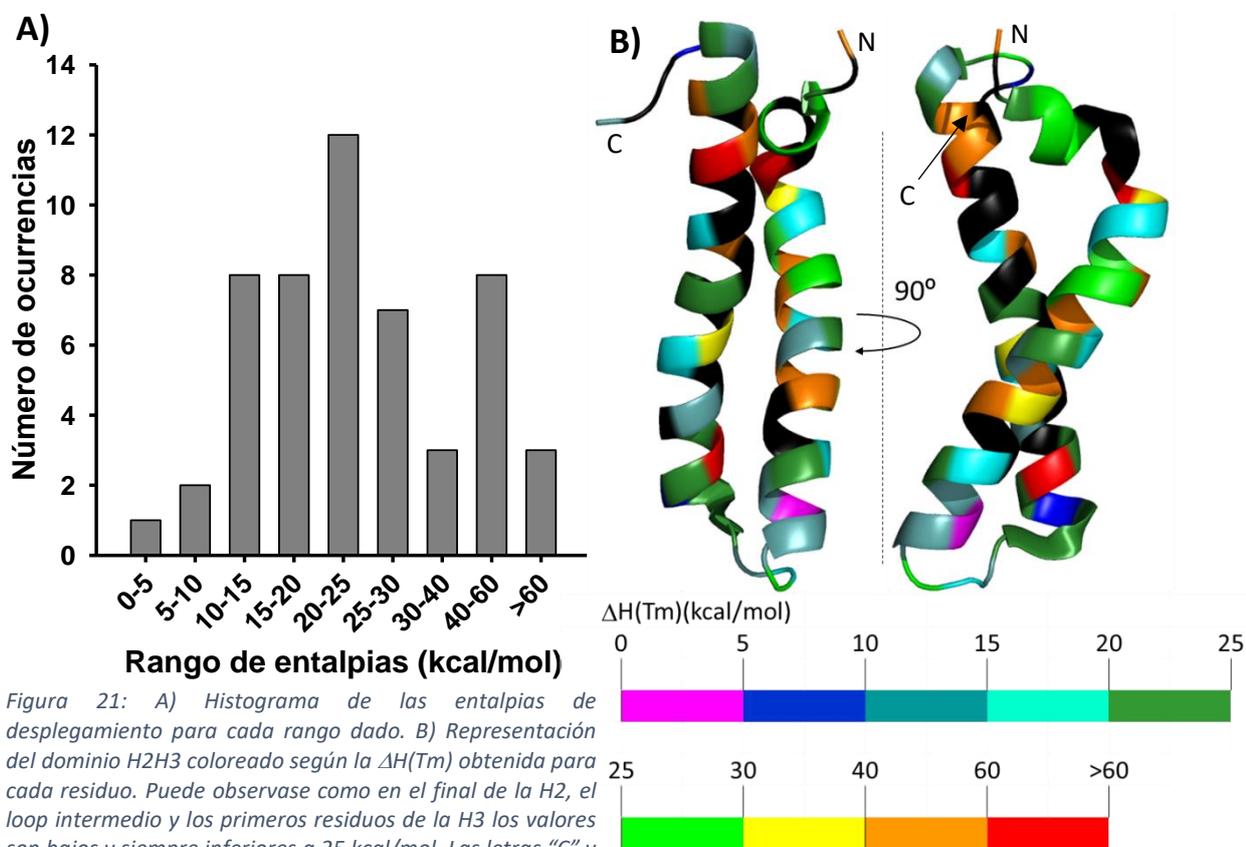


Figura 21: A) Histograma de las entalpías de desplegamiento para cada rango dado. B) Representación del dominio H2H3 coloreado según la $\Delta H(T_m)$ obtenida para cada residuo. Puede observarse como en el final de la H2, el *loop* intermedio y los primeros residuos de la H3 los valores son bajos y siempre inferiores a 25 kcal/mol. Las letras "C" y "N" indican los extremos C-terminal y N-terminal, respectivamente

El caso contrario se encuentra en V187: $\Delta H(T_m)$: 60 ± 10 kcal/mol y T_m : $68.8 \pm 0.8^\circ\text{C}$. Según el trabajo de M. Adrover *et al*^[53] este residuo establece interacciones hidrofóbicas con M209 y E210. La rotura de estas interacciones es desfavorable y pueden tener una gran importancia a la hora de mantener la estructura debido a su elevada T_m .

5.3.4. Constante calorífica a presión constante de desplegamiento

Por último, también se obtuvieron los valores del incremento de la constante calorífica a presión constante (ΔC_p) (Figura 22). Esta magnitud indica la energía absorbida (o expulsada) por un sistema debido al cambio en la temperatura. En la Figura 22 se observa una clara tendencia de valores mínimos de ΔC_p en la zona media del dominio y adquiere valores máximos en los extremos de las hélices. Debido a los elevados errores obtenidos no se ha podido llevar a cabo un estudio exhaustivo de este parámetro y únicamente se ha utilizado para obtener las curvas de estabilidad

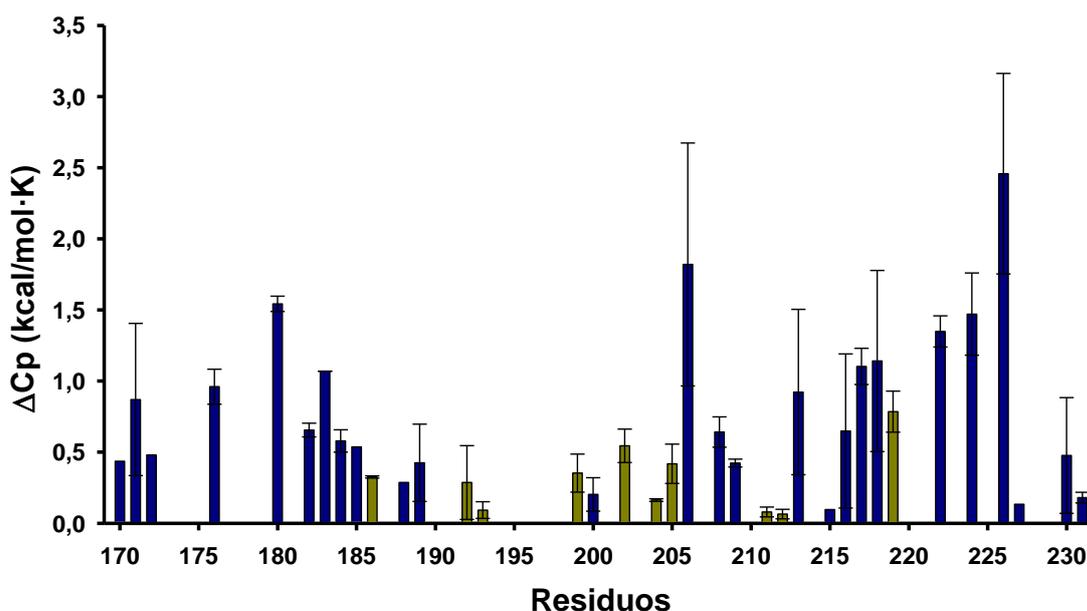


Figura 22: Gráfico con los valores de ΔC_p obtenidos para el proceso de desplegamiento. Se ha indicado mediante colores que valores han sido obtenidos ajustando los datos de CS de ^{15}N (azul) o ^1H (amarillo). Los residuos sin valor de ΔC_p es debido al elevado error que proporcionó el ajuste de los datos al modelo de dos estados. Con estos valores puede verse una clara tendencia de valores mínimos de ΔC_p en la zona media del dominio y adquiere valores máximos en los extremos de las hélices. Las barras de errores corresponden al error obtenido en el ajuste al modelo de dos estados.

5.3.5. Curvas de estabilidad para el desplegamiento

Una vez determinados los valores de T_m , $\Delta H(T_m)$ y ΔC_p para diferentes residuos, se calcularon las curvas de estabilidad de diferentes residuos mediante la ecuación de Gibbs-Helmholtz (7). La ecuación (7) permite calcular el valor de la energía libre de Gibbs de desplegamiento a cualquier temperatura, aunque solo se

calculó para aquellos residuos que presentaron errores menores al 15% en los tres parámetros anteriormente mencionados. Estos son: V170, Y172, K176, H180, C182, V183, N184, I185, T186, E199, T202, T204, D205, I206, M209, T2019 y E224 (Figura 23).

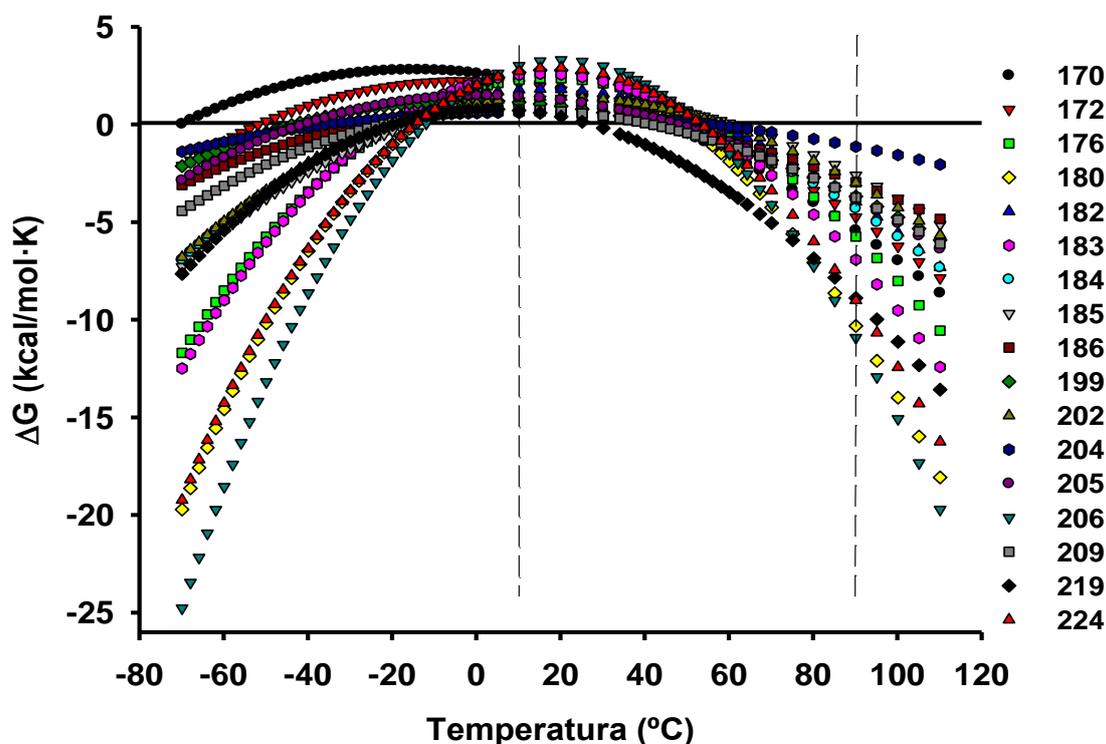


Figura 23: Curvas de estabilidad obtenidas para algunos de los residuos. Los valores de ΔG fueron obtenidos utilizando la ecuación de Gibbs-Helmholtz (7). Sólo se pudieron obtener las curvas de los residuos con bajos errores en los tres parámetros de la ecuación (7): T_m , $\Delta H(T_m)$ y ΔC_p . La relación símbolo/color con el residuo está indicado en la leyenda de la derecha. La figura se ha dividido en tres zonas mediante las líneas discontinuas verticales: la zona del centro son las temperaturas estudiadas y de las cuales se tienen datos reales, mientras que de las otras dos zonas las curvas de estabilidad son simuladas.

Los diferentes comportamientos observados en las curvas de estabilidad son otro indicio de la presencia de intermedios de desplegamiento. Mientras que la mayoría presentan el máximo de estabilidad sobre 20°C, algunos, como T219 lo presenta sobre 0°C y en 44°C ya pierde su estructura. También es interesante como varían los valores máximos de ΔG . Casos como V183 o I206 pueden explicarse debido a las interacciones intramoleculares de tipo hidrofóbico que forman en el estado nativo.

Al analizar las curvas de estabilidad a baja temperatura se puede apreciar cómo el proceso de desnaturalización que ocurriría a baja temperatura es diferente a la desnaturalización a temperatura elevada. A alta temperatura, la mayoría de los residuos presentan su T_m entre 50 y 70°C (Figura 23). Sin embargo, durante la desnaturalización a baja temperatura fría algunos residuos perderían su estructura a -20°C mientras que otros todavía no lo han hecho a -70°C. Esto sugiere que el mecanismo molecular que guía ambas desnaturalizaciones es diferente, siendo un modelo de dos estados a alta temperatura y un modelo de *downhill folding* a baja. A pesar de todo, la falta de más aminoácidos impide determinar si a alta temperatura el plegamiento tiene lugar según el modelo de dos estados o con algún intermedio, tal como indican algunas curvas de desplegamiento (Figura 16).

También es interesante ver que el único residuo de tipo hidrofóbico del que se pudo obtener la curva de estabilidad es Y172. Del resto se obtuvieron errores demasiado elevados en alguno de los tres parámetros que impidieron obtener su curva de estabilidad.

5.3.6. Comparación de los perfiles de desplegamiento y replegamiento

Al igual que ya se ha hecho para las espectroscopias de fluorescencia y CD, con la espectroscopia de RMN también se compararon los datos de desplegamiento con los de replegamiento. El procedimiento seguido fue el mismo que ya se ha descrito al inicio de esta sección, llegándose a obtener las curvas de replegamiento para la mayoría de aminoácidos.

Al comparar los histogramas de los perfiles de curvas de desplegamiento y replegamiento a nivel de todo el conjunto, parece haber pocas diferencias entre los dos procesos (Figura 24). En los núcleos de ^{15}N , en el desplegamiento hay mayores perfiles que indican la presencia de intermedios (perfiles 7, 11 y 12). En conjunto, los núcleos de ^{15}N siguen un número más variado de perfiles que los núcleos de ^1H (13 tipos diferentes por los 10 que siguen los ^1H). Los núcleos de ^1H siguen en menor medida comportamientos complejos (perfil 13) y se centran en los perfiles tipo 3, 4, 5 y 6. Al comparar de forma individual los perfiles en el desplegamiento con el replegamiento se pueden observar mayores diferencias entre los dos procesos (Figura 25).

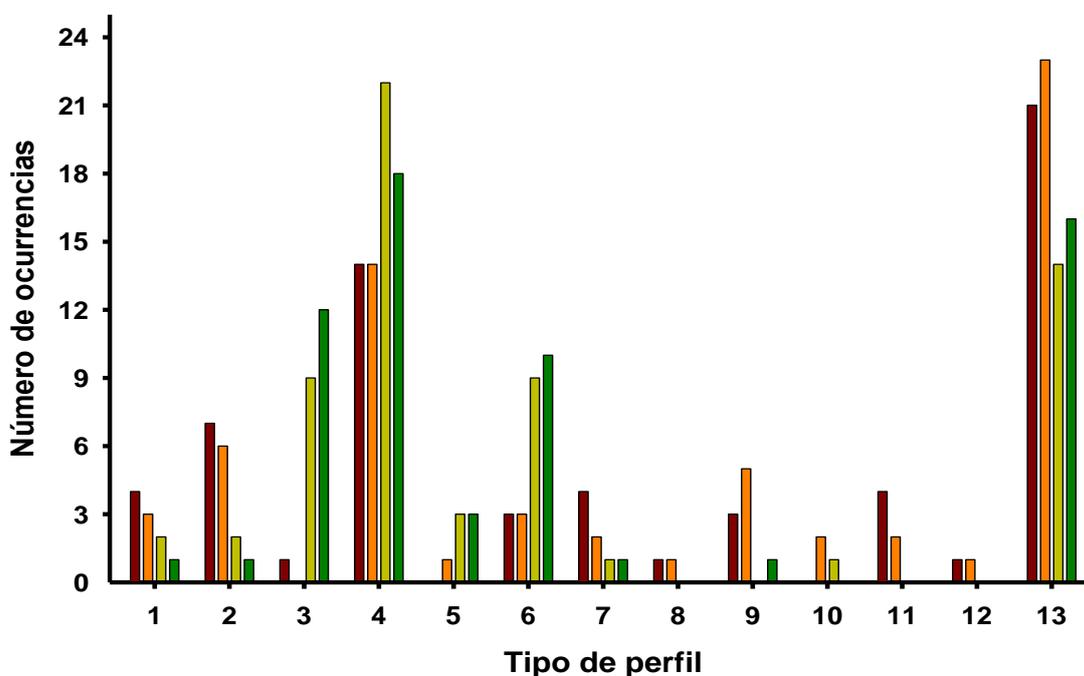


Figura 24: Histogramas de los perfiles de desplegamiento o replegamiento de los núcleos de ^{15}N o ^1H . **Rojo**: núcleos de ^{15}N en el desplegamiento. **Naranja**: núcleos de ^{15}N ajustados en el replegamiento. **Amarillo**: núcleos de ^1H ajustados en el desplegamiento. **Verde**: núcleos de ^1H ajustados en el replegamiento. En los dos núcleos no se observan grandes diferencias entre los dos procesos. Las mayores diferencias se encuentran al comparar los núcleos de ^{15}N y ^1H . Los primeros presentan mayor cantidad de perfiles tipo **13** (comportamiento complejo), mientras que los núcleos de ^1H presentan mayor cantidad de perfiles **3, 4 y 6**.

Unos ejemplos son N177, H180 y A208 (Figura 25). En el caso de N177, el final de la curva de desplegamiento sigue un comportamiento diferente al de replegamiento. Además, en la curva de replegamiento, sobre unos 45°C, hay un leve máximo que no se aprecia en el desplegamiento. En el residuo H180 se aprecia una diferencia mayor. La diferencia de CS entre los puntos a 2.5°C y 90°C en el desplegamiento es de 4 ppm y de 3 ppm para el replegamiento. Este comportamiento es un claro ejemplo de que el entorno del núcleo de ^{15}N de este residuo sufrió una modificación en el proceso de replegamiento. Otro ejemplo de esta modificación del entorno en el proceso de replegamiento respecto al desplegamiento es el residuo A208. Aunque la diferencia de CS entre los dos procesos a 90°C sea de sólo 0.1 ppm, en el perfil de replegamiento se vuelve a observar un ligero máximo que no aparece en el desplegamiento.

Estos tres ejemplos de pequeñas variaciones en los perfiles de las curvas permiten sospechar que los procesos de desplegamiento y replegamiento siguen caminos ligeramente diferentes (como la colocación de una cadena lateral con diferente orientación o la formación de una interacción débil donde antes no se formaba).

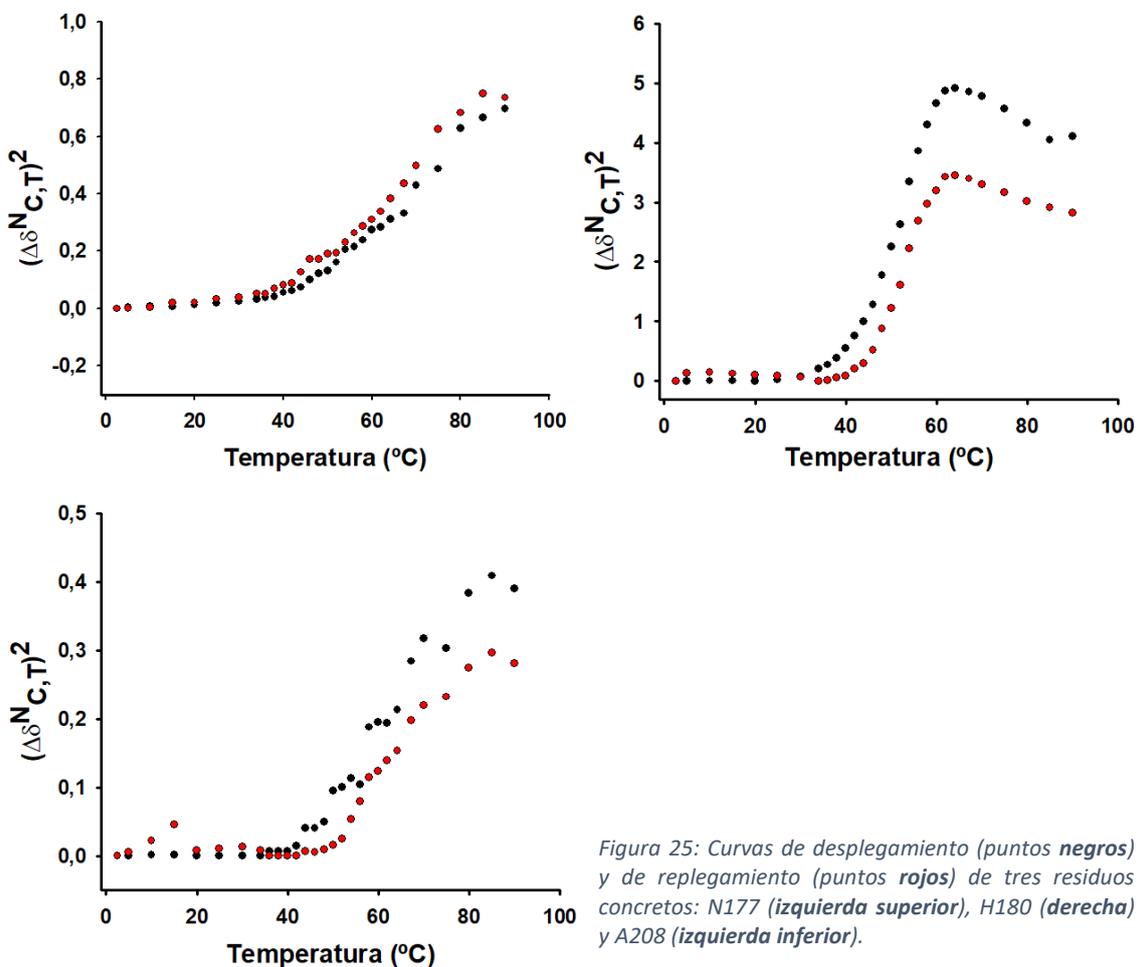
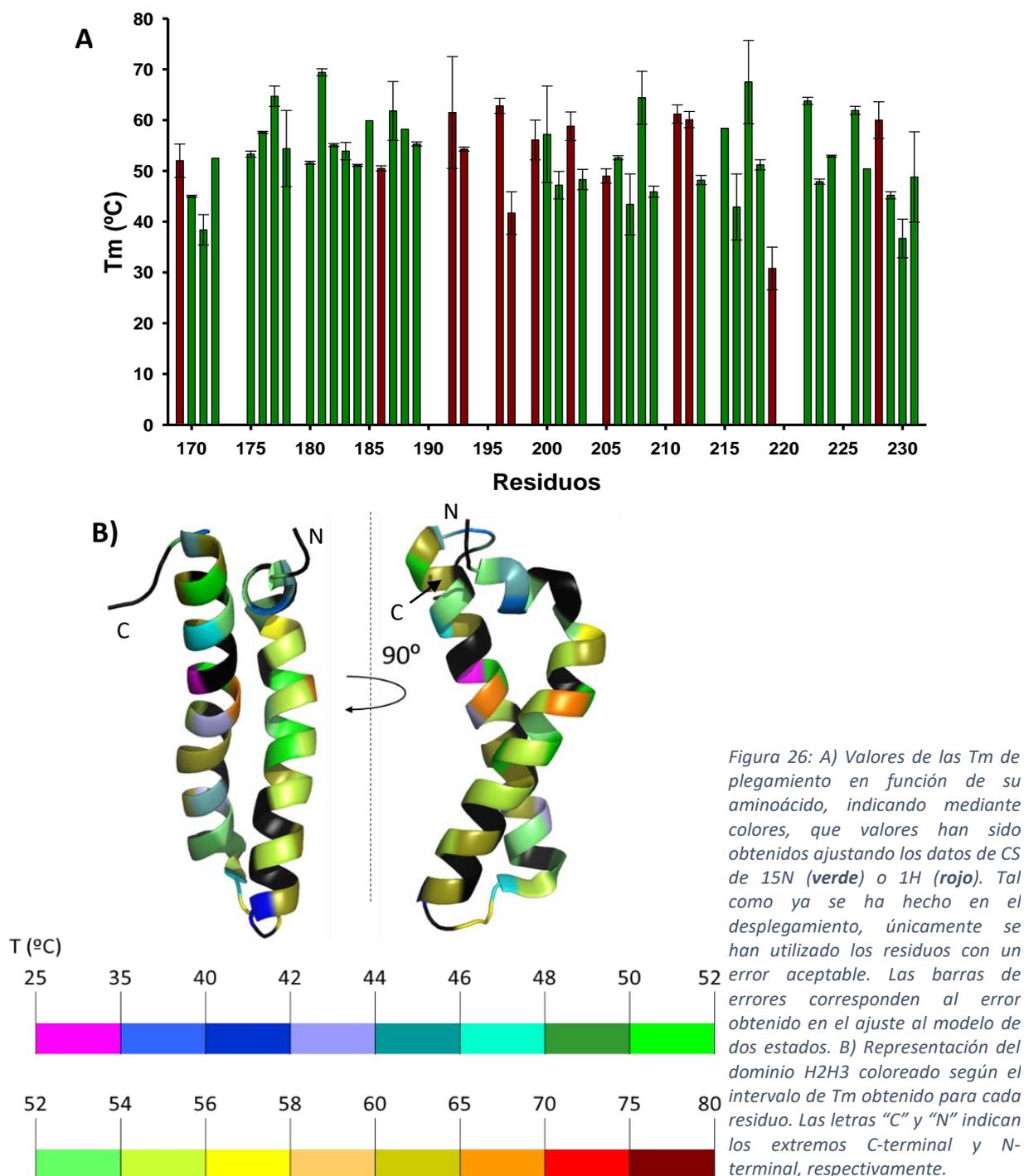


Figura 25: Curvas de desplegamiento (puntos *negros*) y de replegamiento (puntos *rojos*) de tres residuos concretos: N177 (*izquierda superior*), H180 (*derecha*) y A208 (*izquierda inferior*).

5.3.7. Comparación de la Tm de desplegamiento y replegamiento

Los valores de CS de replegamiento fueron ajustados al modelo matemático de dos estados aplicando las ecuaciones (16-19). A partir del ajuste, se obtuvieron los valores de Tm, $\Delta H(T_m)$ y ΔC_p de replegamiento, para cada aminoácido.

Los valores de Tm para el replegamiento (Figura 26) se compararon con los valores de desplegamiento (Figura 27 y 28). El valor de Tm global fue de $53 \pm 8^\circ\text{C}$. Este valor es muy parecido al obtenido para la Tm global de desplegamiento ($54 \pm 11^\circ\text{C}$).



La comparación del número de ocurrencias para cada rango de temperatura en el repliegamiento sigue un comportamiento tipo campana, siendo esta más ancha de la representada para el proceso de desplegamiento (Figura 27). Para el repliegamiento, se eleva notablemente el número de residuos con T_m en el intervalo 60-65°C y desaparecen los residuos con $T_m > 70^\circ\text{C}$. Este comportamiento indica que el repliegamiento se lleva a cabo de forma más homogénea que su anterior desplegamiento, que parece un proceso más progresivo.

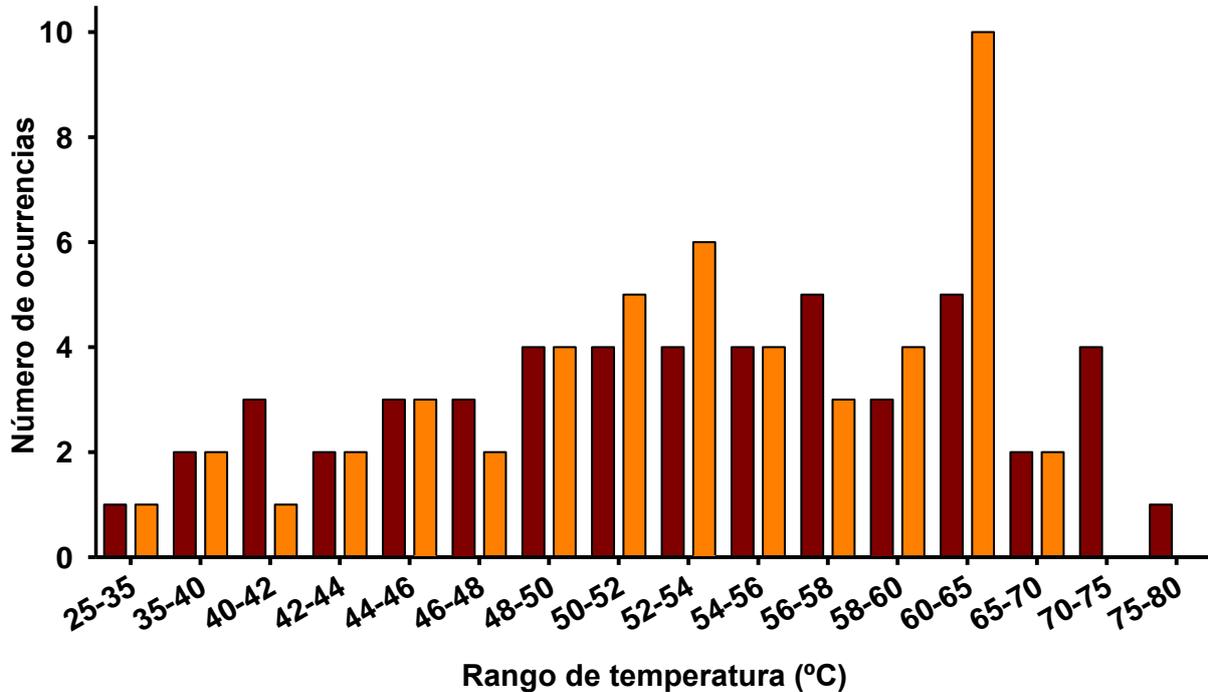


Figura 27: Histograma comparativo de los valores de T_m . Se ha representado la frecuencia en función de cada intervalo de temperaturas (datos de las Figuras 18B y 26A). Los datos del desplegamiento se han coloreado en rojo y los del repliegamiento en naranja. Puede apreciarse como el comportamiento global del desplegamiento es de tipo campana, al igual que el repliegamiento, pero más estrecha en el segundo caso.

Además, al comparar los valores de T_m de repliegamiento en las diferentes zonas del dominio, se pueden destacar diferencias en los valores de la hélice H2 y en el primer segmento de la hélice H3 (Figura 28). Durante el proceso de repliegamiento, los residuos pertenecientes a la hélice H2 presentan una menor variabilidad entre sus valores de T_m de lo que hacían durante el desplegamiento. Esta observación corrobora la idea ya planteada de que el repliegamiento sigue un camino diferente al desplegamiento, al menos en la H2. En la parte inicial de la H3 también hay diferencias notables respecto a los valores del desplegamiento. Para el primer proceso el intervalo de T_m era de 40-60°C, pero durante el repliegamiento dicho intervalo es 5°C mayor: 46-65°C. Es posible que la estructuración de este segmento sea importante para poder guiar el repliegamiento del resto del dominio. Esto explicaría porque se pliega a mayor temperatura de la que se despliega. Una vez plegado el dominio puede que su importancia disminuya, provocando que las T_m de desplegamiento sean inferiores.

Finalmente, para poder estudiar en concreto como se modifican los valores de T_m de repliegamiento con respecto a su desplegamiento anterior, se restaron ambos valores (Figura 29). La gran mayoría de residuos prácticamente no varían su valor de T_m al comparar el repliegamiento con el desplegamiento (la es $<2^\circ\text{C}$). También se ven dos casos extremos y opuestos: K197 y E199. Los valores de T_m para K197 son $58.6 \pm 18.4^\circ\text{C}$ (desplegamiento) y $41.7 \pm 4.2^\circ\text{C}$ (replegamiento), aunque dicha diferencia es difícil de justificar debido al error del ajuste en el desplegamiento. En el E199 los valores de T_m son $43.0 \pm 3.6^\circ\text{C}$ y $56.1 \pm 3.9^\circ\text{C}$, respectivamente. La mayor T_m de repliegamiento puede indicar la importancia de este aminoácido a la hora de colocar de forma correcta las dos hélices- α . Los aminoácidos que siguen este comportamiento deben de presentar mayor importancia a la hora de formar las estructuras secundaria y terciaria, que a la hora de mantenerlas para evitar la desnaturalización de la proteína.

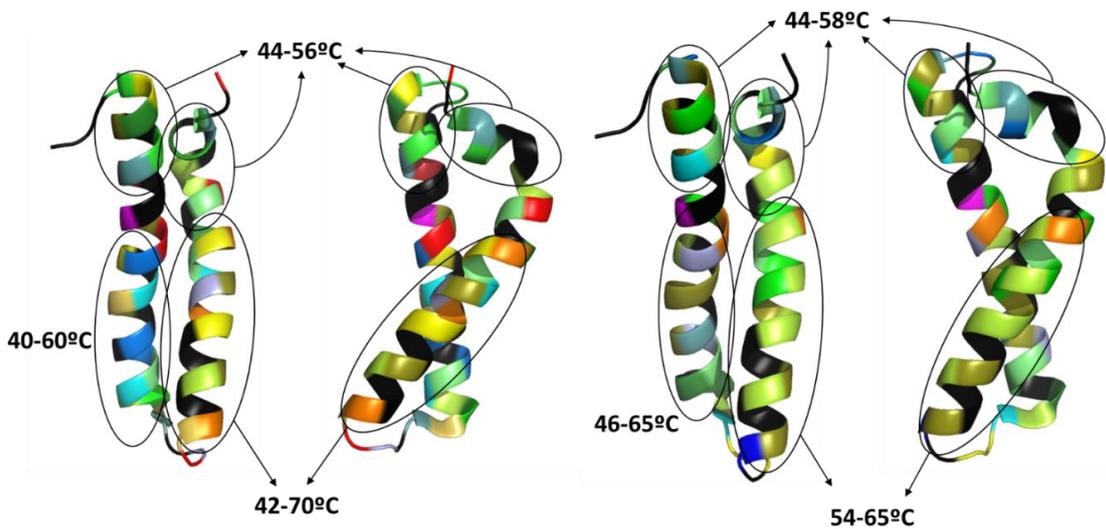


Figura 28: Representaciones del dominio H2H3 coloreado según la escala de las Figura 17A y Figura24B, pero indicando el intervalo de T_m de cada zona del dominio H2H3. En la izquierda se representa el dominio H2H3 con los datos de desplegamiento y en la derecha con los datos del plegamiento. Las mayores diferencias se encuentran en la H2 y el primer segmento de la H3.

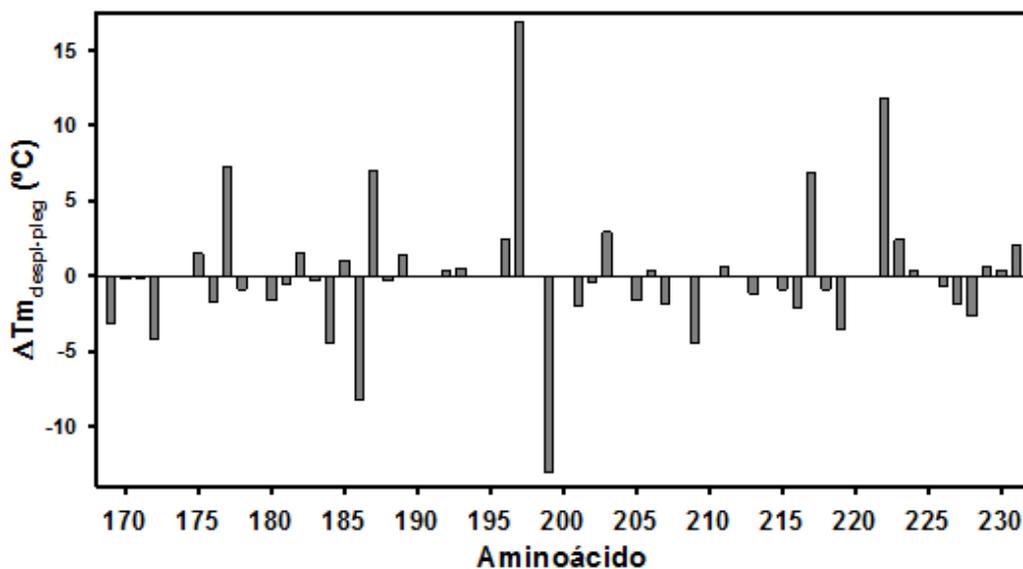


Figura 29: Representación de $\Delta T_{m_{despl-pleg}}$ en función de cada aminoácido. Para obtener este parámetro se ha restado la T_m de plegamiento a la T_m de desplegamiento. Se observa como la K197 tiene un $\Delta T_{m_{despl-pleg}}$ de 16.9°C ; mientras que la E199 tiene un valor de -13.1°C . En general se ve una tendencia hacia incrementar levemente los valores de T_m en el plegamiento.

5.3.8. Comparación de la $\Delta H(T_m)$ de desplegamiento y replegamiento

Posteriormente, se obtuvieron los valores de ΔH de replegamiento en la T_m para la mayoría de aminoácidos (Figura 30 y 31). La $\Delta H(T_m)$ global para los aminoácidos ajustados utilizando los CS de ^{15}N es de 33 ± 18 kcal/mol y 17 ± 9 kcal/mol para los aminoácidos ajustados con los datos de ^1H , hecho que de nuevo sugiere una cierta influencia del núcleo analizado sobre el valor de la $\Delta H(T_m)$. Al comparar estos valores con los de $\Delta H(T_m)$ global para el desplegamiento (34 ± 22 kcal/mol y 15 ± 8 kcal/mol, respectivamente), se observa que no existen diferencias entre ambos procesos.

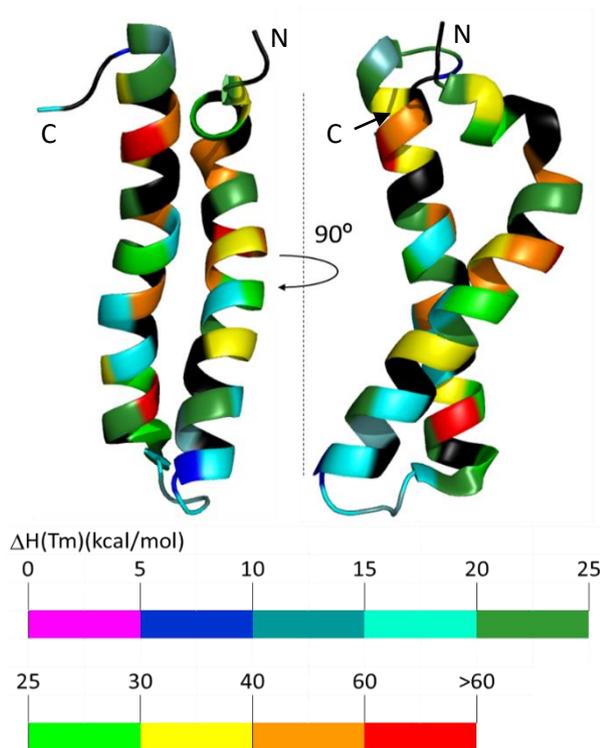


Figura 30: Representación del dominio H2H3, coloreado según indica la escala, la $\Delta H(T_m)$ del proceso de plegamiento obtenida para cada residuo. Las letras "C" y "N" indican los extremos C-terminal y N-terminal, respectivamente.

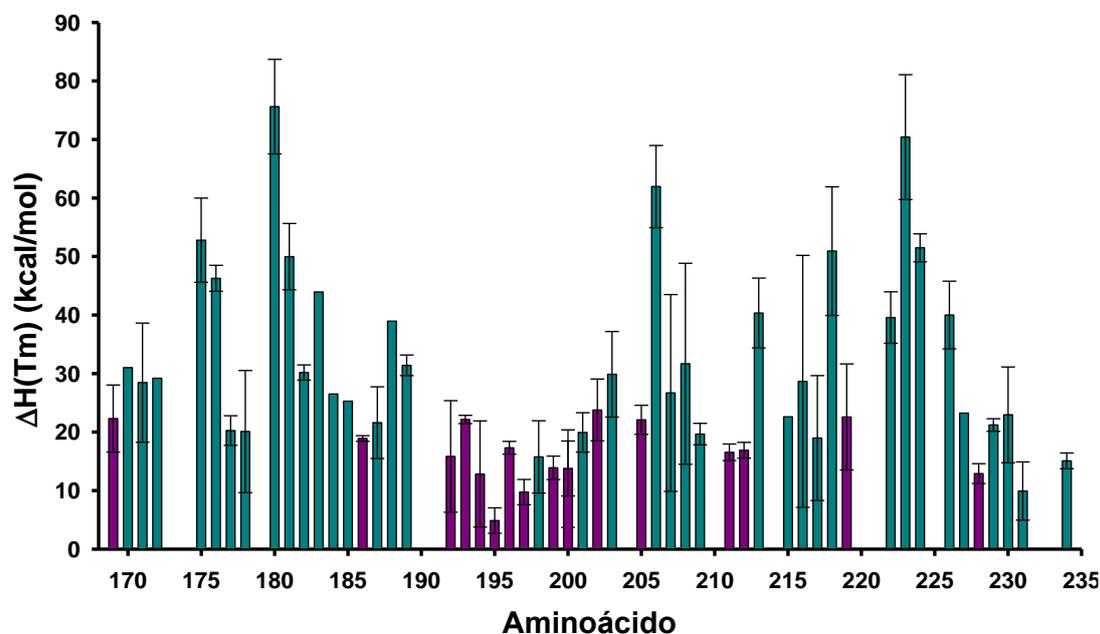


Figura 31: Representación de los valores de $\Delta H(T_m)$ de plegamiento obtenidos mediante el ajuste al modelo de dos estados. Se han representado las entalpías en función de su aminoácido, indicando que valores han sido obtenidos ajustando los datos de CS de ^{15}N (cian) o ^1H (violeta). Las barras de errores corresponden al error obtenido en el ajuste al modelo de dos estados.

A su vez, destacar que el número de aminoácidos que presentan valores similares de $\Delta H(T_m)$ de replegamiento es muy similar al número que presentaban valores similares de $\Delta H(T_m)$ de desplegamiento (Figura 32). De hecho, en dicha comparación, no se aprecian tantas diferencias como aparecían en la comparación de los valores de T_m de replegamiento y de desplegamiento. La única diferencia destacable es un menor número de residuos cuyo valor de $\Delta H(T_m)$ de replegamiento se sitúa en el intervalo 10-15 kcal/mol, compensado con un incremento de los residuos que presentan

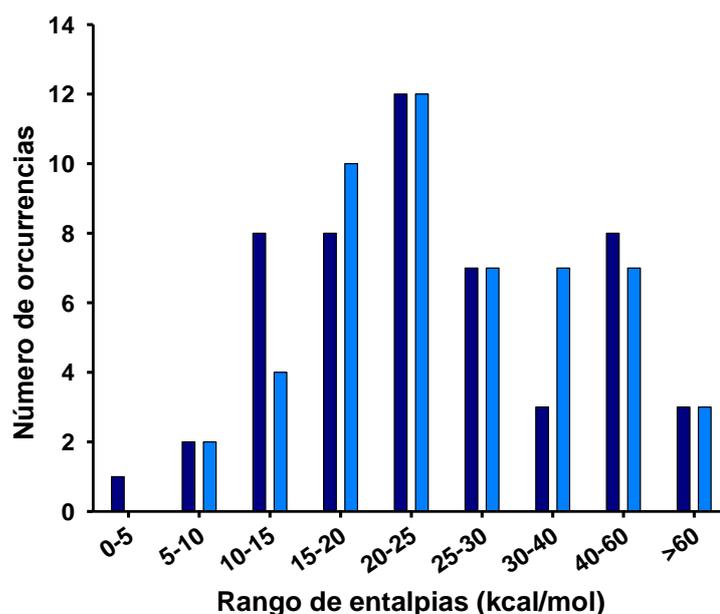


Figura 32: Histograma comparativo de los valores de $\Delta H(T_m)$. Los datos del desplegamiento se han coloreado en azul oscuro y los del replegamiento en azul claro. Puede apreciarse como hay un menor número de residuos durante el desplegamiento en el intervalo 30-40 kcal/mol. También hay una disminución de los residuos durante el plegamiento en el intervalo 10-15 kcal/mol.

una $\Delta H(T_m)$ de replegamiento en el intervalo 30-40 kcal/mol. Al comparar residuo a residuo, si se observan diferencias destacables (Figura 33). La Q175 presenta una diferencia ($\Delta\Delta H(T_m) = \Delta H_{\text{desplegamiento}} - \Delta H_{\text{replegamiento}}$) de 20.7 kcal/mol. Esta diferencia puede atribuirse a que en forma plegada esta interaccionado con la Y221 y su rotura no es favorable. Por el contrario, a la hora de plegar la estructura, al no haber dicha interacción que romper, la ΔH necesaria disminuye. Otros ejemplos de este comportamiento son V187 (se conoce que establece interacciones hidrofóbicas con M209 y E210), Q189 (establece una interacción hidrofóbica con M216) y R223.

Los residuos H180 y D181 tienen el comportamiento contrario ($(\Delta\Delta H(T_m))_{\text{desplegamiento}}$: -22.0 y -24.1 kcal/mol, respectivamente). A pH 3.5 los grupos aspartato, glutamato e histidina se encuentran protonados. Por lo tanto, la histidina presenta una carga positiva que tiende a compensar mediante enlaces de hidrogeno con el disolvente. El ácido aspártico a pesar de estar protonado puede formar cuatro enlaces de hidrógeno como aceptor y uno como dador. Además, y según la estructura tridimensional de la que se dispone, estos dos residuos no establecen ninguna interacción intramolecular, por tanto, presentan mayor estabilidad interaccionando con el disolvente que dentro de la estructura del dominio. Esto explica el $\Delta\Delta H(T_m)$ negativa.

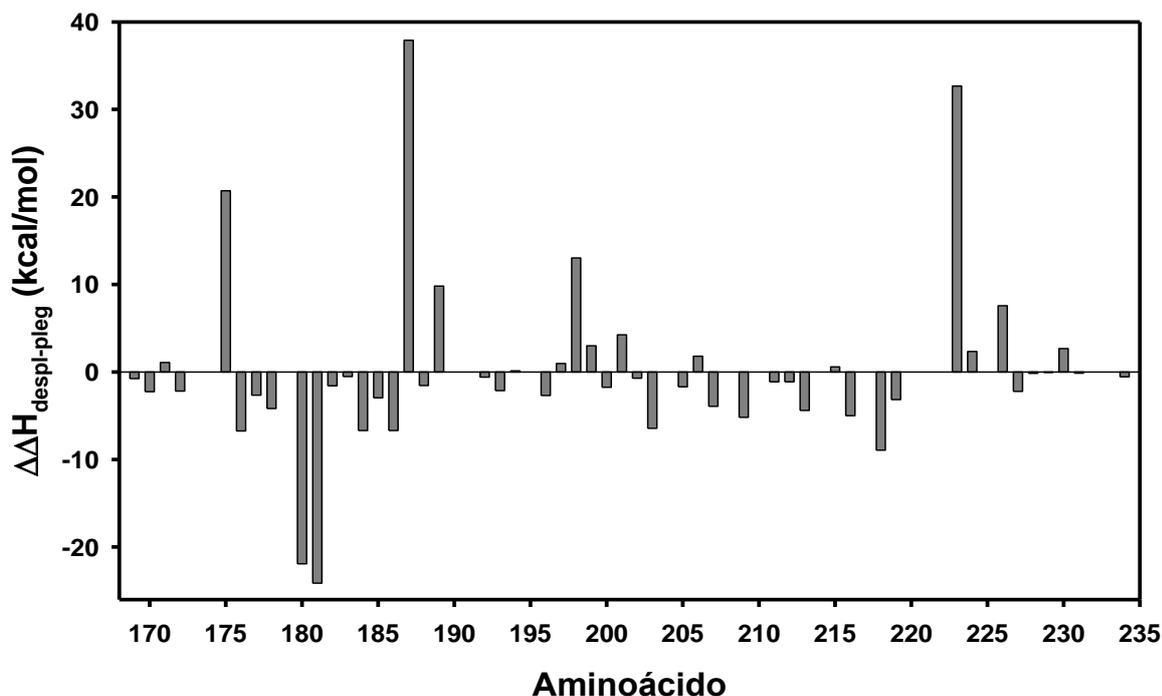


Figura 33: Representación de $\Delta\Delta H(Tm)_{despl-pleg}$ en función de cada aminoácido. Para obtener este parámetro se ha restado la $\Delta H(Tm)$ de plegamiento a la $\Delta H(Tm)$ de desplegamiento. El comportamiento general es incremento de la $\Delta H(Tm)$ para el plegamiento, siendo sus máximos exponentes H180 y D181.

5.3.9. Constante calorífica a presión constante de replegamiento

Finalmente, el último parámetro obtenido mediante el ajuste al modelo de dos estados volvió a ser la ΔC_p de replegamiento (Figura 34). En comparación con los valores obtenidos para el desplegamiento, estos valores son en general más bajos y los mayores se sitúan en las regiones helicoidales. Al igual que ya ocurrió en el desplegamiento, los elevados errores obtenidos han impedido llevar a cabo un estudio más profundo de este parámetro.

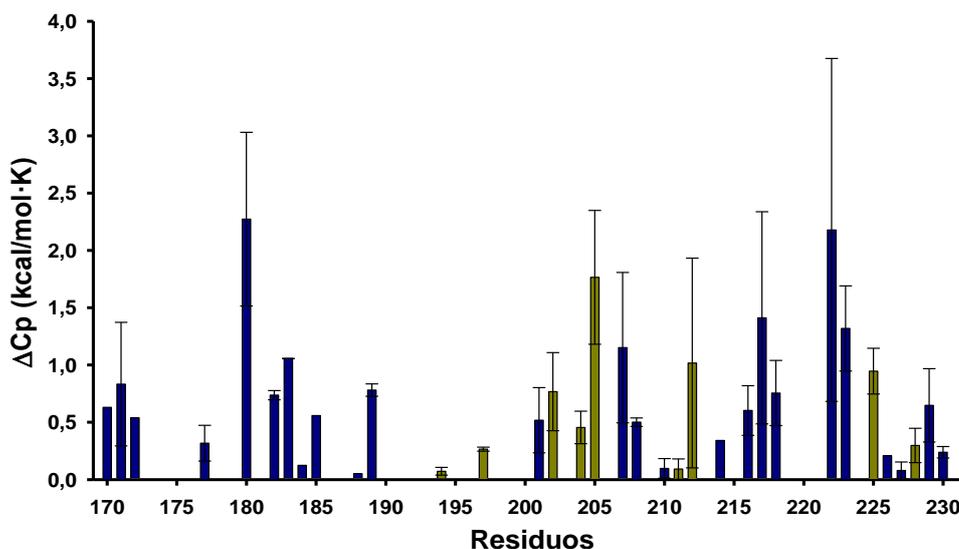


Figura 34: Gráfico con los valores de ΔC_p obtenidos para el proceso de replegamiento. Se ha indicado mediante colores que valores han sido obtenidos ajustando los datos de CS de ^{15}N (azul) o 1H (amarillo). Las barras de errores corresponden al error obtenido en el ajuste al modelo de dos estados. Los residuos sin valor de ΔC_p es debido al elevado error que proporcionó el ajuste de los datos al modelo de dos estados.

5.3.10. Comparación de las curvas de estabilidad del desplegamiento y el replegamiento

A su vez, y mediante la ecuación de Gibbs-Helmholtz (7) se pudieron obtener las curvas de estabilidad para aquellos aminoácidos que presentaban errores bajos en sus valores de T_m , $\Delta H(T_m)$ y ΔC_p de replegamiento. Para el proceso de replegamiento los aminoácidos que cumplieron esta condición fueron: V170, Y172, K176, H180, C182, V183, I185, Q189, K197, T202, E203, D205, I206, M209, Q215, T219, E224, Q226, Y229 y Q230. Gran parte de estos aminoácidos son los mismos que ya se analizaron en el desplegamiento, por lo tanto, es posible comparar sus curvas de estabilidad en los dos procesos (Figura 35).

Para algunos de ellos (V183, T202, D205, I206 y E224) las curvas de estabilidad en la zona de la desnaturalización a elevada temperatura se solapan, indicando que los dos procesos ocurren exactamente de la misma forma. Para el resto (V170, Y172, H180, C182, I185, M209, T219, Q226) los perfiles no coinciden. Esta diferencia puede ser debida por: i) un desplazamiento del punto máximo de la curva (V170 y Y172); ii) que los valores de ΔG coinciden a temperatura ambiente (de 273 a 313K) pero no a altas temperaturas (C182 y Q226); iii) o que únicamente coinciden en sus valores de T_m (H180, I185 y M209).

Los residuos V170 y Y172 presentan un desplazamiento de la temperatura donde se sitúa el máximo de la ΔG . En la Figura 29 se observa como el Y172 presenta mayor T_m de replegamiento que de desplegamiento, provocando que la temperatura de corte de la curva de estabilidad se desplace. En todo caso, el perfil de las dos curvas es casi idéntico en la zona de desplegamiento/replegamiento a elevada temperatura, indicando que las dos transiciones en dicho aminoácido ocurren de igual forma, pero a diferente temperatura.

Otro de los escenarios observados es aquel que representan los residuos cuyas curvas de estabilidad coinciden de 273 a 313K, pero no a elevada temperatura, como es el caso de la C182 y la Q226. Este comportamiento induce a pensar que la estructura nativa original y la formada después de replegarse para estos residuos es idéntica, pero el camino seguido es diferente. En concreto, la C182 establece un puente disulfuro con la C217, por tanto, su desplegamiento y replegamiento están ligados al segundo aminoácido. Este puede ser la causa final de porque se llega al mismo punto, pero siguiendo caminos diferentes.

Finalmente, se observan aminoácidos que únicamente coinciden en su valor de T_m (H180, I185 y M209), pero no en la forma de sus curvas, siendo el valor de ΔG máxima mayor en la curva del replegamiento que en la desplegamiento. Esto indica que después de desnaturalizar la proteína, al replegarse se llegan a situaciones más estables que la original. Esto solo puede suceder si estos aminoácidos terminan colocándose de forma diferente a su colocación en la estructura nativa y se da lugar a una transición de esta estructura a la nativa mediante una cinética lenta. Esta transición sólo ocurre en determinados aminoácidos, porque en el caso contrario, se observarían indicios de esta transición en el resto de curvas de estabilidad.

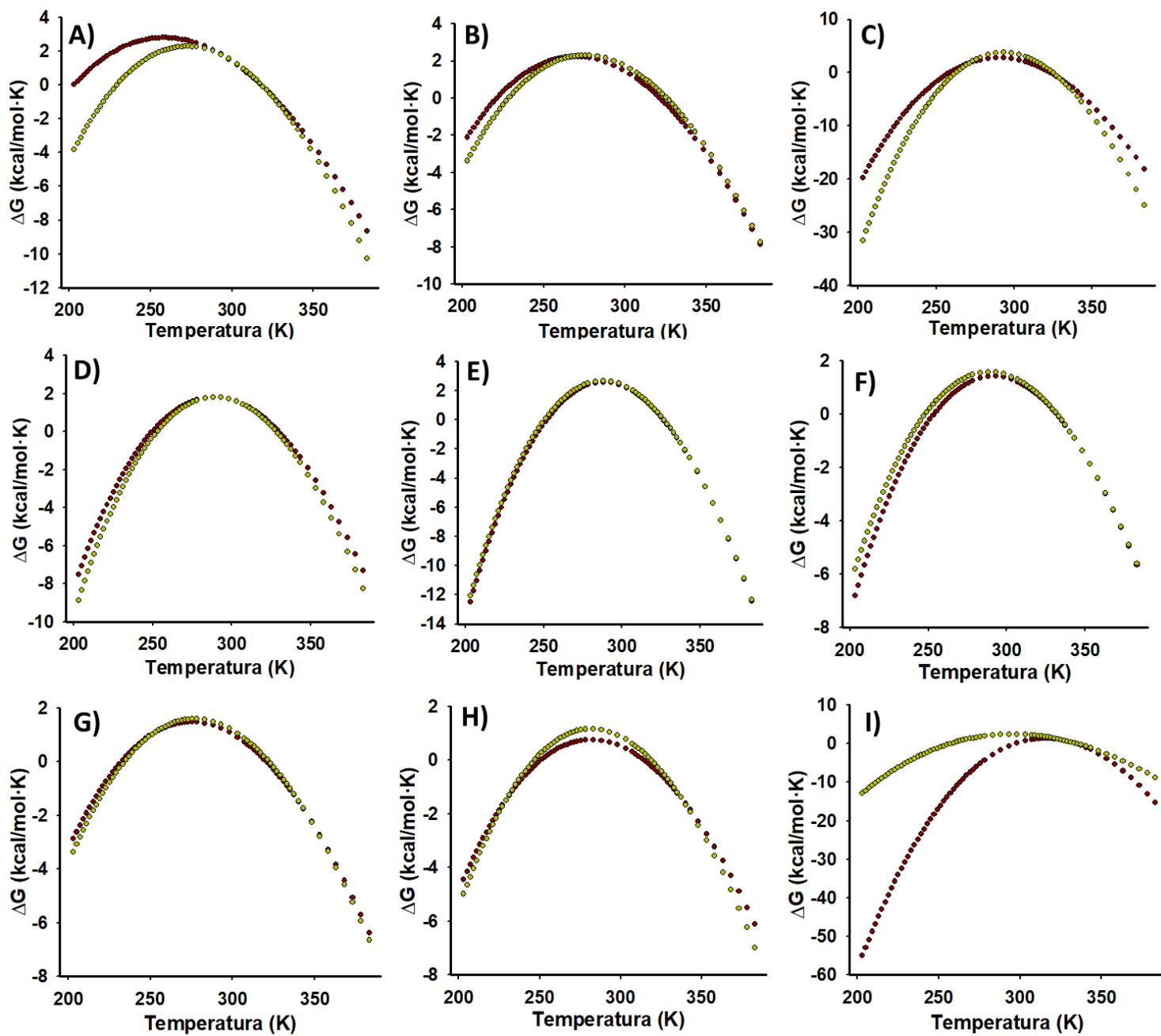


Figura 35: Algunos ejemplos de las curvas de estabilidad obtenidas. En concreto pertenecen a los residuos V170 (A), Y172 (B), H180 (C), C182 (D), V183 (E), T202 (F), D205 (G), M209 (H) y Q226 (I). En todos los casos los puntos **rojos** indican la $\Delta G(T)$ de desplegamiento y los **amarillos** indican la $\Delta G(T)$ del plegamiento.

Con el fin de estudiar las diferencias entre los procesos de desplegamiento y replegamiento para cada una de las dos hélices, se calcularon sus respectivas curvas de estabilidad, utilizando los datos individuales de los residuos que las forman (Figura 36). Al obtenerlas se pudo ver como la H2 sigue el mismo camino para desplegarse como para plegarse. Por el contrario, en la H3 se ve un intervalo de temperatura donde casi no hay diferencia (entre 300 y 350K) pero por debajo y por encima de este intervalo los valores de ΔG son diferentes, aunque debido a la desviación entre los valores de los diferentes residuos que conforman ambas hélices, es imposible hacer afirmaciones categóricas de si se sigue el mismo camino o si son diferentes.

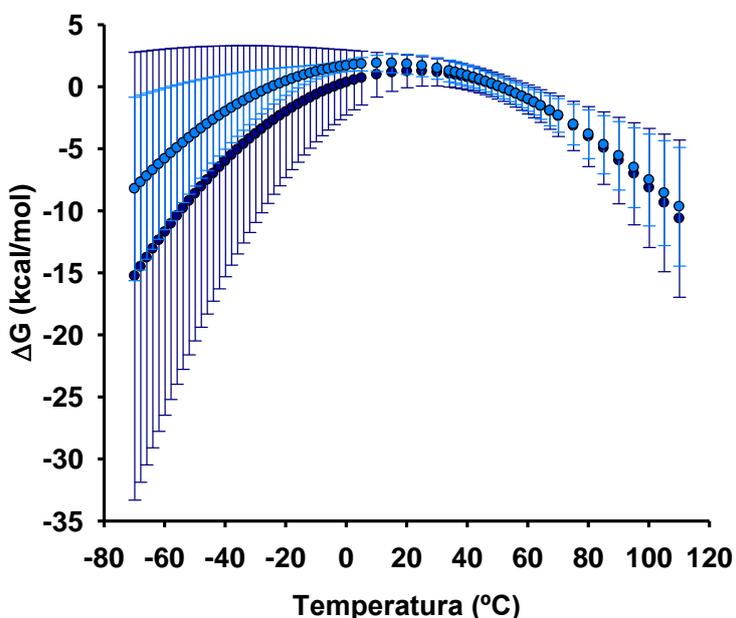
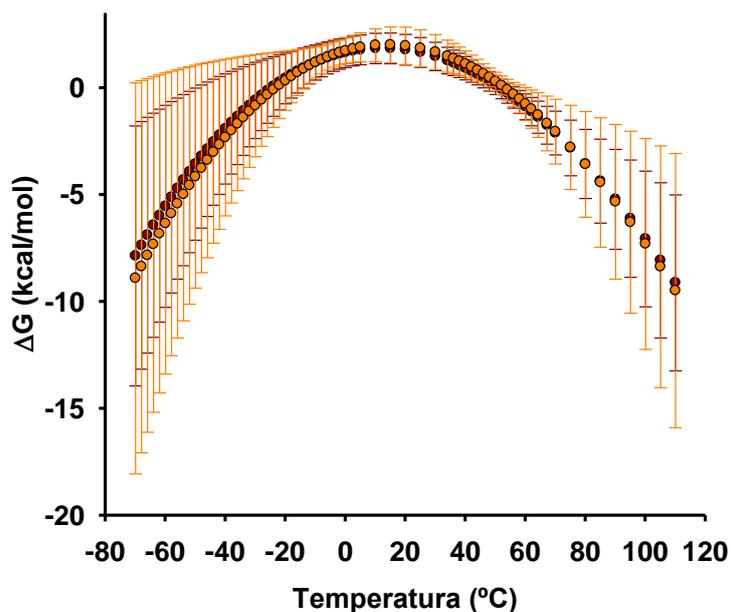


Figura 36: Curvas de estabilidad de las hélices- α 2 (arriba) y 3 (abajo). Las curvas han sido obtenidas mediante el promedio de los valores de ΔG de los aminoácidos individuales. Las barras de error muestran el error resultante de dicho proceso. En la H2 los procesos de desnaturalización caliente (marrón) y de replegamiento (naranja) siguen el mismo camino. En la desnaturalización fría las dos curvas se separan ligeramente, pero debido al gran error de esta zona es complicado interpretar estos resultados. En la H3, la zona de la transición se solapan las dos curvas, pero tanto a mayores temperaturas como a menores hay un leve distanciamiento. En los dos casos la curva del replegamiento (azul claro) está por encima de la curva de desplegamiento (azul oscuro).

Para profundizar más en el estudio del por qué los perfiles de las curvas de estabilidad no coinciden, se obtuvieron los parámetros termodinámicos de ΔG , ΔH y $T\Delta S$ a 30°C (temperatura cercana al máximo de estabilidad del dominio) (Figura 37). Al obtener estos parámetros se ve que, aunque las $\Delta G(30^\circ\text{C})$ de desplegamiento y replegamiento sean muy parecidas, los factores de $\Delta H(30^\circ\text{C})$ y $T\Delta S(30^\circ\text{C})$ en general no coinciden. Al ser tan bajos los valores de la energía libre de Gibbs la diferencia entre ΔH y $T\Delta S$ es baja, por lo tanto, si uno de los dos parámetros sufre una modificación arrastra al otro.

En los aminoácidos V170, Y172, H180, C182, I185, D205, M209 y T219 se sigue el mismo comportamiento a 30°C, es decir, una mayor ΔH en el proceso de replegamiento. Este incremento de la entalpía es compensado por el incremento de la entropía. Estos residuos, a excepción de D205, son todos aquellos que las curvas de estabilidad de los dos procesos estudiados no coincidían y que, por lo tanto, se pliegan de diferente forma a la que se despliegan. Esta diferencia, atribuida en algunos casos a que se establece un patrón de interacciones diferente, puede ser debida, en parte, a la mayor entropía que les posibilita mayores grados de libertad

Por contra, se encuentran los residuos V183, T202, I206 y E224, los cuales presentan mayor $\Delta H(30^\circ\text{C})$ en el proceso de desnaturalización. Este fenómeno implica que la $\Delta S(30^\circ\text{C})$ también sea mayor en el desplegamiento, provocando que los grados de libertad durante el replegamiento sean menores. Esta disminución en los grados de libertad puede ser la razón de porque estos residuos siguen el mismo camino energético para desplegarse que para replegarse.

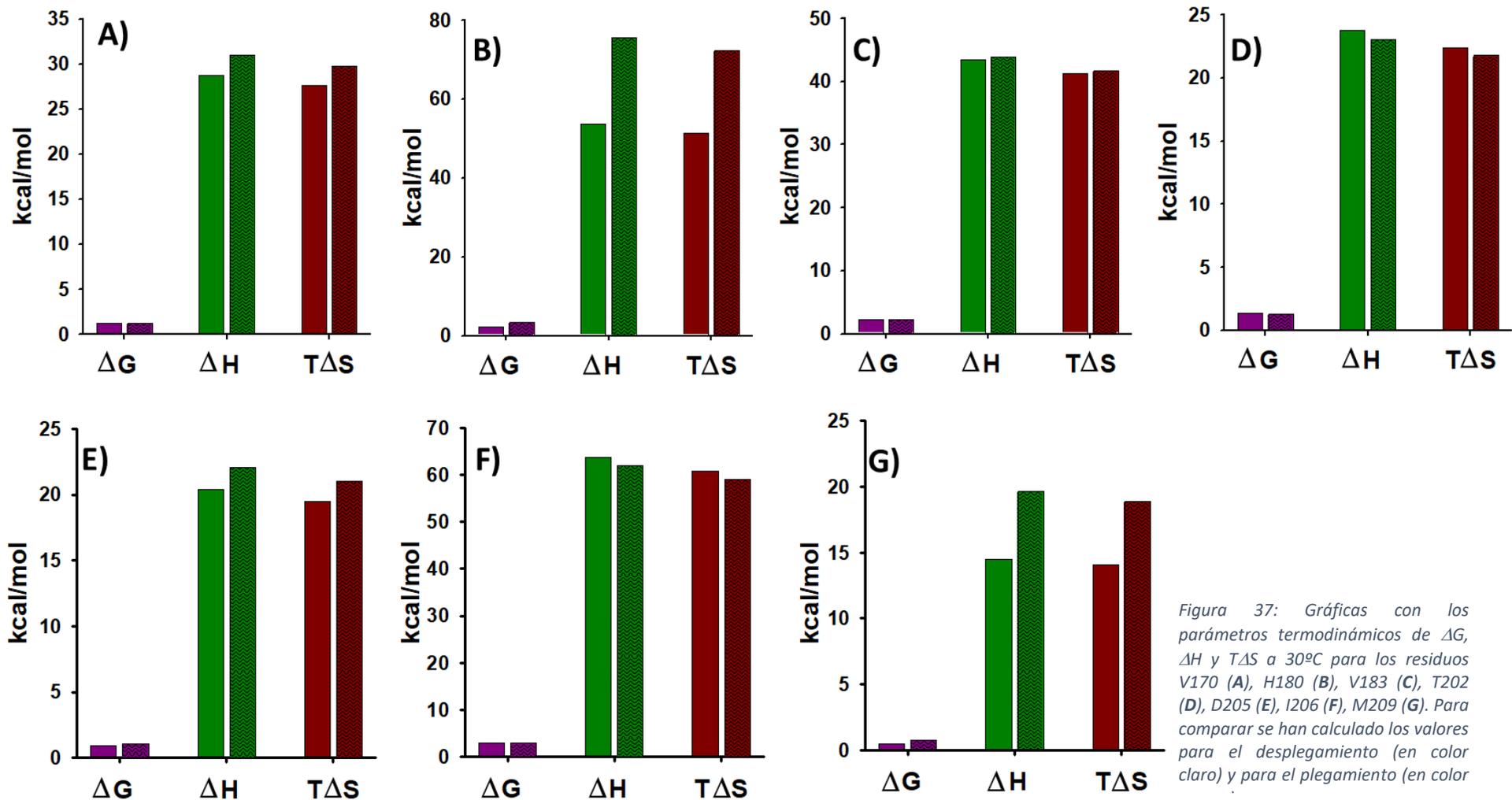


Figura 37: Gráficas con los parámetros termodinámicos de ΔG , ΔH y $T\Delta S$ a 30°C para los residuos V170 (A), H180 (B), V183 (C), T202 (D), D205 (E), I206 (F), M209 (G). Para comparar se han calculado los valores para el desplegamiento (en color claro) y para el plegamiento (en color

6. Conclusión

En el presente trabajo se ha analizado los procesos de desplegamiento y repliegamiento del dominio H2H3 de la proteína priónica de oveja, llegando a las siguientes conclusiones:

1. La estabilidad térmica global del dominio H2H3 es ligeramente inferior a pH 3.5 que a pH 7.0, hecho atribuible a la posible rotura de alguna/s interacción intramolecular.
2. Las curvas de desplegamiento y repliegamiento globales, observadas mediante fluorescencia y CD, son el promedio de las curvas particulares de cada aminoácido y dan una idea de la estabilidad global de la proteína. Dichas curvas de desplegamiento sugieren una pérdida de la estructura helicoidal del dominio H2H3 a medida que se incrementa la temperatura, la cual se recupera durante el repliegamiento. En cualquier caso, la estructura obtenida al final del repliegamiento no presenta el mismo contenido en estructura secundaria que la inicial, antes de desplegar. Esto sugiere que plegamiento y desplegamiento ocurren a través de caminos diferentes.
3. Las T_m obtenidas para los procesos de desplegamiento y repliegamiento son siempre diferentes entre ellas, independientemente de la técnica experimental utilizada en su estudio (CD, fluorescencia y RMN).
4. Los perfiles de desplegamiento y repliegamiento para los diferentes aminoácidos, generalmente difieren en mayor o menor grado, hecho que sugiere que sus mecanismos son diferentes, al igual que las propiedades termodinámicas de ambos.
5. Las curvas de estabilidad ($\Delta G_{\text{desplegamiento}}$) muestran que la zona de estabilidad estructural de cada aminoácido es característica de él mismo y únicamente se han observado coincidencias en cinco de los trece aminoácidos estudiados.

7. Bibliografía

- [1] D. L. Nelson, M. M. Cox, *Principios de Bioquímica de Lehninger*, OMEGA, Barcelona, **2014**.
- [2] C. M. Dobson, *Nature* **2003**, *426*, 884–890.
- [3] A. R. Viegas Correia, Protein Folding and Disease, Universidade Nova de Lisboa, **2010**.
- [4] B. B. Stocks, Structural Characterization of Protein Folding Intermediates by Oxidative Labeling and Mass Spectrometry, The University of Western Ontario, **2012**.
- [5] J. Collinge, *Annu. Rev. Neurosci.* **2001**, *24*, 519–550.
- [6] G. Morra, Role of Electrostatics Explored with Molecular Dynamics Simulations for Protein Stability and Folding, Freien Universität Berlin, **2005**.
- [7] C. N. Pace, H. Fu, K. L. Fryar, J. Landua, S. R. Trevino, B. A. Shirley, M. M. Hendricks, S. Iimura, K. Gajiwala, J. M. Scholtz, et al., *J. Mol. Biol.* **2011**, *408*, 514–528.
- [8] J. P. Gallivan, D. A. Dougherty, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 9459–9464.
- [9] S. J. Eyles, Studies of Protein Folding by NMR Spectroscopy, University of Oxford, **1995**.
- [10] M. Zavodszky, C.-W. Chen, J.-K. Huang, M. Zolkiewski, L. Wen, R. Krishnamoorthi, *Protein Sci.* **2001**, *10*, 149–160.
- [11] K. Soda, *Adv. Biophys.* **1993**, *29*, 1–54.
- [12] V. Daggett, A. Fersht, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 497–502.
- [13] V. Daggett, A. R. Fersht, *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 18–25.
- [14] S. Robic, M. Guzman-Casado, J. M. Sanchez-Ruiz, S. Marqusee, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 11345–11349.
- [15] C. B. Anfinsen, E. Haber, M. Sela, F. H. White Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1961**, *47*, 1309–1314.
- [16] C. B. Anfinsen, *Science (80-.)*. **1973**, *181*, 223–230.
- [17] C. Levinthal, *J. Chim. Phys.* **1968**, *65*, 44–45.
- [18] C. Levinthal, *Mossbauer Spectrosc. Biol. Syst.* **1969**, 22–24.
- [19] D. B. Wetlaufer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1973**, *70*, 697–701.
- [20] M. K. D. L. Weaver, *Nature* **1976**, *260*, 404–406.
- [21] P. S. Kim, R. L. Baldwin, *Annu. Rev. Biochem.* **1982**, *51*, 459–489.
- [22] A. R. Fersht, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 3–9.
- [23] J. N. Onuchic, Z. Luthey-Shulten, P. G. Wolynes, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1997**, *48*, 545–600.
- [24] J. M. Sanchez-ruiz, V. Mun, *Science (80-.)*. **2002**, *298*, 2191–2195.
- [25] P. Malhotra, J. B. Udgaonkar, *Protein Sci.* **2016**, *25*, 1924–1941.
- [26] S. B. Zimmerman, S. O. Trach, *J. Mol. Biol.* **1991**, *222*, 599–620.
- [27] D. N. Wilson, R. Beckmann, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2011**, *21*, 274–282.
- [28] L. I. Malkin, A. Rich, *J. Mol. Biol.* **1967**, *26*, 329–346.
- [29] J. Lu, C. Deutsch, *Nat Struct Mol Biol* **2005**, *12*, 1123–1129.
- [30] A. De Simone, G. G. Dodson, C. S. Verma, A. Zagari, F. Fraternali, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102*, 7535–7540.
- [31] L. Kupfer, W. Hinrichs, M. H. Groschup, *Curr. Mol. Med.* **2009**, *9*, 826–35.
- [32] P. Malhotra, J. B. Udgaonkar, *Biochemistry* **2015**, *54*, 3431–3441.

- [33] M. Zeeb, *Methods* **2004**, *34*, 65–74.
- [34] K. Wüthrich, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2003**, *42*, 3340–3363.
- [35] M. Sadqi, D. Fushman, V. Muñoz, *Nature* **2006**, *442*, 317–321.
- [36] L. Sborgi, A. Verma, S. Piana, K. Lindorff-Larsen, M. Cerminara, C. M. Santiveri, D. E. Shaw, E. De Alba, V. Muñoz, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 6506–6516.
- [37] M. Matejková, J. Žídková, L. Žídek, M. Wimmerová, J. Chmelík, V. Sklenář, *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 8444–8452.
- [38] P. M. K. Mohan, S. Chakraborty, R. V. Hosur, *J. Biomol. NMR* **2009**, *44*, 1–11.
- [39] O. Julien, S. Chatterjee, A. Thiessen, S. P. Graether, B. D. Sykes, *Protein Sci.* **2009**, *18*, 2172–2182.
- [40] A. Bundi, K. Wüthrich, *Biopolymers* **1979**, *18*, 299–311.
- [41] A. Bundi, K. Wüthrich, *Biopolymers* **1979**, *18*, 285–297.
- [42] D. S. Wishart, C. G. Bigam, A. Holm, R. S. Hodges, B. D. Sykes, *J. Biomol. NMR* **1995**, *5*, 67–81.
- [43] D. S. Wishart, B. D. Sykes, F. M. Richards, *J. Mol. Biol.* **1991**, *222*, 311–333.
- [44] K. Tamiola, B. Acar, F. A. A. Mulder, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 18000–18003.
- [45] F. Avbelj, D. Kocjan, R. L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 17394–17397.
- [46] G. Platzner, M. Okon, L. P. Mcintosh, *J. Biomol. NMR* **2014**, *60*, 109–129.
- [47] G. Merutka, H. Jane Dyson, P. E. Wright, *J. Biomol. NMR* **1995**, *5*, 14–24.
- [48] N. J. Baxter, M. P. Williamson, *J. Biomol. NMR* **1997**, *9*, 359–369.
- [49] M. Kjaergaard, S. Brander, F. M. Poulsen, *J. Biomol. NMR* **2011**, *49*, 139–149.
- [50] A. Cavalli, X. Salvatella, C. M. Dobson, M. Vendruscolo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 9615–20.
- [51] D. M. Korzhnev, X. Salvatella, M. Vendruscolo, A. A. Di Nardo, A. R. Davidson, C. M. Dobson, L. E. Kay, *Nature* **2004**, *430*, 586–590.
- [52] S. R. Martin, V. Esposito, P. De Los Rios, A. Pastore, P. A. Temussi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9963–9970.
- [53] M. Adrover, K. Pauwels, S. Prigent, C. De Chiara, Z. Xu, C. Chapuis, A. Pastore, H. Rezaei, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 21004–21012.
- [54] C. Weissmann, *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 861–871.
- [55] S. B. Prusiner, *N. Engl. J. Med.* **2001**, *344*, 1516–1526.
- [56] T. van Rheede, M. M. W. Smolenaars, O. Madsen, W. W. de Jong, *Mol. Biol. Evol.* **2003**, *20*, 111–121.
- [57] S. Yusa, J. B. Oliveira-Martins, Y. Sugita-Konishi, Y. Kikuchi, *Viruses* **2012**, *4*, 3109–31.
- [58] D. Ciric, H. Rezaei, *Front. cell Dev. Biol.* **2015**, *3*, 5.
- [59] R. Riek, S. Hornemann, G. Wider, M. Billeter, R. Glockshuber, K. Wüthrich, *Nature* **1996**, *382*, 180–182.
- [60] R. Riek, S. Hornemann, G. Wider, M. Billeter, R. Glockshuber, K. Wüthrich, *Nature* **1996**, *382*, 180–2.
- [61] R. Riek, S. Hornemann, G. Wider, R. Glockshuber, K. Wüthrich, *FEBS Lett.* **1997**, *413*, 282–288.
- [62] R. Zahn, A. Liu, T. Lührs, R. Riek, C. von Schroetter, F. López García, M. Billeter, L. Calzolari, G. Wider, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 145–50.
- [63] F. López Garcia, R. Zahn, R. Riek, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 8334–9.

- [64] D. A. Lysek, C. Schorn, L. G. Nivon, V. Esteve-Moya, B. Christen, L. Calzolari, C. von Schroetter, F. Fiorito, T. Herrmann, P. Guntert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 640–645.
- [65] L. Calzolari, D. A. Lysek, D. R. Pérez, P. Güntert, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 651–655.
- [66] D. R. Pérez, F. F. Damberger, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **2010**, *400*, 121–128.
- [67] N. Kachel, W. Kremer, R. Zahn, H. R. Kalbitzer, *BMC Struct. Biol.* **2006**, *6*.
- [68] A. C. Apetri, W. K. Surewicz, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 44589–44592.
- [69] K.-C. Chen, M. Xu, W. J. Wedemeyer, H. Roder, *Biophys. J.* **2011**, *101*, 1221–1230.
- [70] H. Büeler, A. Aguzzi, A. Sailer, R. A. Greiner, P. Autenried, M. Aguet, C. Weissmann, *Cell* **1993**, *73*, 1339–1347.
- [71] M. W. Van Der Kamp, V. Daggett, *Protein Eng. Des. Sel.* **2009**, *22*, 461–468.
- [72] G. Forloni, N. Angeretti, P. Malesani, E. Peressini, T. Rodriguez Martin, P. Della Torre, M. Salmona, *Ann. Neurol.* **1999**, *45*, 489–494.
- [73] S. L. Kazmirski, D. O. V Alonsoi, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, V. Daggett, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 305–315.
- [74] E. Schiff, V. Campana, S. Tivodar, S. Lebreton, K. Gousset, C. Zurzolo, *Traffic* **2008**, *9*, 1101–1115.
- [75] W. Swietnicki, R. B. Petersen, P. Gambetti, W. K. Surewicz, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 31048–31052.
- [76] S. Liemann, R. Glockshuber, *Biochemistry* **1999**, *38*, 3258–3267.
- [77] Y. Watanabe, W. Hiraoka, Y. Shimoyama, M. Horiuchi, M. Kuwabara, O. Inanami, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *366*, 244–249.
- [78] Y. Levy, O. M. Becker, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2002**, *47*, 458–468.
- [79] S. Simoneau, H. Rezaei, N. Salès, G. Kaiser-Schulz, M. Lefebvre-Roque, C. Vidal, J. G. Fournier, J. Comte, F. Wopfner, J. Grosclaude, et al., *PLoS Pathog.* **2007**, *3*, 1175–1186.
- [80] C. Govaerts, H. Wille, S. B. Prusiner, F. E. Cohen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 8342–8347.
- [81] M. L. DeMarco, V. Daggett, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 2293–2298.
- [82] J. R. Steinert, *Commun. Integr. Biol.* **2015**, *8*, 1–5.
- [83] L. Conforti, R. Adalbert, M. P. Coleman, *Trends Neurosci.* **2007**, *30*, 159–166.
- [84] P. Carulla, A. Bribián, A. Rangel, R. Gavín, I. Ferrer, C. Caelles, J. A. Del Río, F. Llorens, *Mol. Biol. Cell* **2011**, *22*, 3041–54.
- [85] G. Wu, K. Nakajima, N. Takeyama, M. Yukawa, Y. Taniuchi, A. Sakudo, T. Onodera, *Neurosci. Lett.* **2008**, *446*, 11–15.
- [86] C. Spielhaupter, H. M. Schätzl, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 44604–44612.
- [87] J. Xue, V. Rai, S. Frolov, D. Singer, S. Chabierski, J. Xie, S. Reverdatto, D. S. Burz, A. M. Schmidt, R. Hoffman, *Structure* **2011**, *19*, 722–732.
- [88] J. Xue, R. Ray, D. Singer, D. Bo, D. S. Burz, V. Rai, R. Ho, A. Shekhtman, *Biochemistry* **2014**, 3327–3335.
- [89] M. Koch, S. Chitayat, B. M. Dattilo, A. Schiefner, J. Diez, W. J. Chazin, G. Fritz, *Structure* **2010**, *18*, 1342–1352.
- [90] L. Yatime, C. Betzer, R. K. Jensen, S. Mortensen, P. H. Jensen, G. R. Andersen, *Structure* **2016**, *24*, 2043–2052.
- [91] F. Bolivar, R. L. Rodriguez, P. J. Greene, M. C. Betlach, H. L. Heyneker, H. W. Boyer, J. H. Crosa, S. Falkow, *Gene* **1977**, *2*, 95–113.

- [92] E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel, A. Bairoch, in *Proteomics Protoc. Handb.* (Ed.: J.M. Walker), Humana Press, **2005**, pp. 571–607.
- [93] B. M. Dattilo, G. Fritz, E. Leclerc, C. W. Vander Kooi, C. W. Heizmann, W. J. Chazin, *Biochemistry*. **2007**, *46*, 6957–70.
- [94] H. Zong, A. Madden, M. Ward, M. H. Mooney, C. T. Elliott, A. W. Stitt, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 23137–23146.
- [95] F. Delaglio, S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **1995**, *6*, 277–293.
- [96] A. Kumar, A. Rani, P. Venkatesu, A. Kumar, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 15806–15810.
- [97] A. Micsonai, F. Wien, L. Kernya, Y. H. Lee, Y. Goto, M. Refregiers, J. Kardos, *PNAS* **2015**, *112*, E3095–E3103.
- [98] N. J. Greenfield, *Nat. Protoc.* **2007**, *1*, 2527–2535.
- [99] R. Shi, A. Proteau, M. Villarroya, I. Moukadiri, L. Zhang, J.-F. Trempe, A. Matte, M. E. Armengod, M. Cygler, *PLoS Biol.* **2010**, *8*, e1000354.
- [100] S. S. Cho, P. Weinkam, P. G. Wolynes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 118–23.
- [101] A. N. Shemon, G. L. Heil, A. E. Granovsky, M. M. Clark, D. McElheny, A. Chimon, M. R. Rosner, S. Koide, *PLoS One* **2010**, *5*, e10479.