

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA
INSTITUTO DE QUÍMICA Y FISICOQUÍMICA BIOLÓGICAS
"PROF. ALEJANDRO C. PALADINI"

**IMPACTO DE LA
CONFORMACIÓN Y LA
ESTABILIDAD EN LA TENDENCIA
A LA AGREGACIÓN:
EL CASO DE UNA FAMILIA DE
PROTEÍNAS TODO- β**

Autor: BIOQUÍMICA CARLA ROMINA ANGELANI

Director: DR. JOSÉ MARÍA DELFINO

Directora adjunta: DRA. LUCRECIA MARÍA CURTO

2017

“La verdadera ciencia enseña, sobre todo, a dudar y ser ignorante.”

Miguel de Unamuno

*A mis abuelos **Manuela, Miguel, Nelly** y **Tomás**, que me guían y cuidan “desde arriba”*

*A mi abuela **Urbi** que junto a todos mis abuelos me cuidaron, aconsejaron y se alegraron de*
cada paso que di

*A mis papás **Raquel** y **Guillermo**, por TODO, a ellos les debo lo que soy y voy a estar siempre*
agradecida por guiarme y no dejar que nunca me falte nada

*A mi hermano **Pablo**, por ser incondicional y compartir cada etapa de mi vida*

*A mi marido **Nicolás**, por elegirme, acompañarme y hacerme feliz*

*A mis **tíos** y **primos**, por estar siempre*

*A mi **familia** y **amigos** por quererme tanto*

*A **José** y **Lucrecia**, por dejarme ser parte de este gran grupo de trabajo, enseñarme y por*
sobre todas las cosas hacerme sentir tan querida

*A **Gaby** y **Eva** por las charlas, consejos y hacer tan fácil el “día a día”*

*A la **gente del IQIFIB***

Los resultados expuestos en el presente trabajo fueron parcialmente publicados en:

- Angelani, C. R., Caramelo, J. J., Curto, L. M., & Delfino, J. M. (2017). Structural coalescence underlies the aggregation propensity of a β -barrel protein motif. *PLoS one*, 12(2), e0170607.
- Curto, L. M., Angelani, C. R., y Delfino, J. M. (2015). Intervening in the β -barrel structure of lipid binding proteins: Consequences on folding, ligand-binding and aggregation propensity. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 93, 37-43.
- Angelani, C. R., Curto, L. M., Cabanas, I. S., Caramelo, J. J., Uversky, V. N., y Delfino, J. M. (2014). Toward a common aggregation mechanism for a β -barrel protein family: insights derived from a stable dimeric species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1844(9), 1599-1607.
- Curto, L. M., Angelani, C. R., Caramelo, J. J., y Delfino, J. M. (2012). Truncation of a β -barrel scaffold dissociates intrinsic stability from its propensity to aggregation. *Biophysical journal*, 103(9), 1929-1939.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	11
<i>LOS AMINOÁCIDOS</i>	12
INTRODUCCIÓN	15
<i>AGREGACIÓN PROTEICA</i>	20
<i>AGREGACIÓN PROTEICA AMILOIDE</i>	22
<i>MECANISMO DE AGREGACIÓN</i>	29
<i>EL MODELO DE PAISAJES DE ENERGÍA PARA EL PLEGADO Y LA AGREGACIÓN</i>	32
<i>EL MODELO ESTRUCTURAL</i>	35
<i>EL COSOLVENTE TRIFLUOROETANOL</i>	44
<i>PROTEÍNAS INTRÍNECAMENTE DESORDENADAS</i>	48
BIBLIOGRAFÍA	51
OBJETIVOS	61
<i>OBJETIVOS GENERALES</i>	61
<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO</i>	62
BIBLIOGRAFÍA	65
MATERIALES Y MÉTODOS	69
<i>EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS</i>	69
Expresión proteica.....	69
Purificación de IFABP.....	70
Purificación de $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$	71
<i>ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE LUZ ULTRAVIOLETA</i>	73
Cuantificación de proteínas.....	73
<i>ENSAYO DE UNIÓN A COLORANTES</i>	74
Ensayo de unión a Tioflavina-T.....	74
Ensayo de unión a Rojo Congo	74
Birrefringencia a la luz polarizada con Rojo Congo	74
<i>MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN</i>	75
<i>ANÁLISIS DE LAS CINÉTICAS DE AGREGACIÓN</i>	76
<i>ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR</i>	78
<i>ESPECTROS DE FLUORESCENCIA</i>	79
Fluorescencia intrínseca.....	79
Unión y desplazamiento de ácido 8-anilino 1-naftalen sulfónico (ANS).....	79
Apagamiento de la fluorescencia (<i>quenching</i>) con acrilamida	80

<i>CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR</i>	81
<i>PROTEÓLISIS LIMITADA</i>	82
Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)	82
Espectrometría de masa de ionización por electrospray (ESI MS)	82
<i>ENSAYOS DE UNIÓN A LIGANDOS</i>	83
<i>DESNATURALIZACIÓN EN EL EQUILIBRIO</i>	84
Por temperatura.....	84
Por agentes químicos	85
<i>NMR</i>	87
<i>HERRAMIENTAS COMPUTACIONALES DE PREDICCIÓN</i>	88
Tendencia a la agregación	88
Propensión al desorden	88
Propensión a formar α -hélices	89
BIBLIOGRAFÍA	91
RESULTADOS	95
SECCIÓN 1: AGREGACIÓN, EFECTOS DEL TFE	95
<i>CARACTERIZACIÓN DE LOS AGREGADOS PROTEICOS</i>	95
<i>CONFORMACIÓN PROTEICA</i>	101
<i>CINÉTICA DE AGREGACIÓN</i>	108
<i>HERRAMIENTAS DE PREDICCIÓN PARA LOS SEGMENTOS AMILOIDOGÉNICOS</i>	117
<i>EXPERIMENTOS CON EL PÉPTIDO 1-28</i>	119
SECCIÓN 2: PREAGREGACIÓN, EFECTO DE BAJAS CONCENTRACIONES DE TFE	121
<i>CONFORMACIÓN PROTEICA</i>	121
<i>EVALUACIÓN DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL POR ¹H NMR</i>	125
<i>PROTEÓLISIS LÍMITADA</i>	127
<i>ANÁLISIS DE LA PROPENSIÓN INTRÍNSECA AL DESORDEN</i>	132
<i>ANÁLISIS DE LA PROPENSIÓN A FORMAR HÉLICES-α</i>	134
<i>ESTADO DE AGREGACIÓN Y COMPACTACIÓN</i>	135
<i>APAGAMIENTO DE LA FLUORESCENCIA</i>	137
<i>UNIÓN DE ANS</i>	139
<i>UNIÓN DE ÁCIDOS GRASOS</i>	141
<i>UNIÓN DE ÁCIDO OLEICO</i>	141
<i>UNIÓN DE ÁCIDO TRANS-PARINÁRICO</i>	143
<i>ESTABILIDAD CONFORMACIONAL</i>	145
<i>DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA</i>	145
<i>DESNATURALIZACIÓN QUÍMICA</i>	147
SECCIÓN 3: EVALUACIÓN DE LOS EVENTOS TEMPRANOS DEL PROCESO DE AGREGACIÓN	151
BIBLIOGRAFÍA	155

DISCUSIÓN DE RESULTADOS	159
SECCIÓN 1: AGREGACIÓN, EFECTOS DEL TFE	159
SECCIÓN 2: PREAGREGACIÓN, EFECTO DE TFE A BAJAS CONCENTRACIONES	169
SECCIÓN 3: EVALUACIÓN DE LOS PRIMEROS EVENTOS DEL PROCESO DE AGREGACIÓN	179
BIBLIOGRAFÍA	181
CONCLUSIONES.....	185
PERSPECTIVAS	191
BIBLIOGRAFÍA	193
RESUMEN	197
APÉNDICE SOBRE EL TRATAMIENTO CINÉTICO DE LA AGREGACIÓN	203
<i>DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA.....</i>	<i>203</i>
<i>CINÉTICA INICIAL DE AGREGACIÓN.....</i>	<i>205</i>
<i>ESCALADO DOBLE</i>	<i>209</i>
BIBLIOGRAFÍA	213

ABREVIATURAS

Δ98Δ	variante truncada de IFABP correspondiente al segmento 29-126 de la proteína madre. Siempre que se nombren los aminoácidos se los indicará respecto a su numeración correspondiente en IFABP
Δ78Δ	variante truncada de IFABP correspondiente al segmento 29-106 de la proteína madre. Siempre que se nombren los aminoácidos se los indicará respecto a su numeración correspondiente en IFABP
ANS	ácido 1,8 anilinaftalén sulfónico
apo-	prefijo que denota la ausencia del ligando ácido graso
Buffer PN8	Buffer Fosfatos 5 mM, 150 mM NaCl, pH 7.2
RC	Rojo Congo
CD	Dicroísmo circular, por sus siglas en inglés " <i>Circular Dichroism</i> "
GdmCl	Cloruro de Guanidinio
holo-	prefijo que denota la presencia del ligando ácido graso
IFABP	Proteína ligadora de ácidos grasos de intestino de rata
K_{sv}	Constante de Stern-Volmer
AFM	Microscopía de Fuerza Atómica, por sus siglas en inglés " <i>Atomic Force Microscopy</i> "
NATA	N-acetil-L-triptofanamida
NMR	Resonancia Magnética Nuclear, por sus siglas en inglés " <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> ".
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
TFE	3,3,3 Trifluoroetanol
Th-T	Tioflavina T, por sus siglas en inglés " <i>Thioflavin T</i> "
t-PA	Ácido <i>trans</i> -parinámico

LOS AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Código de 3 letras	Código de 1 letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Ocupando el segundo lugar después del agua, las proteínas son las moléculas más abundantes en la biología. Existen alrededor de 100000 tipos diferentes de proteínas que controlan o estimulan prácticamente todos los procesos químicos de los cuales dependen nuestras vidas [Branden y col., 1999]. Las proteínas naturales son, por lo tanto, un grupo muy especial de moléculas. Sus propiedades han sido seleccionadas a través de la evolución para cumplir con determinadas características. Entre ellas, una de las más importantes es la capacidad de plegarse en estructuras únicas generando una enorme selectividad y diversidad de funciones [Dobson, 2006].

Hoy en día se sabe que en las células hay un gran número de factores auxiliares que ayudan en el proceso de plegado, incluyendo a las chaperonas y foldasas. Si bien estos factores permiten que el plegado de la cadena polipeptídica se lleva a cabo efectivamente, evitando interacciones indeseables en un entorno complejo y “hacinado” -tal como es el de la célula- estos factores no determinan su estructura nativa. Esta última está totalmente codificada por la secuencia de aminoácidos. Es aún vigente la incógnita de cómo las proteínas encuentran sus estados nativos exclusivamente contando con la información contenida en la estructura primaria [Dobson, 2004]. Hay considerable cantidad de evidencia que apunta a que el estado nativo corresponda a aquel cuya estructura resultare la más estable en condiciones fisiológicas.

En 1968 Levinthal propuso que el número total de posibles conformaciones que podría adoptar una cadena polipeptídica sería tan grande que, en una búsqueda al azar, encontrar la estructura más estable dentro del vasto espacio conformacional disponible tomaría un tiempo de magnitud astronómica. Estudios experimentales y teóricos ponen en evidencia que el proceso de plegado no implicaría necesariamente la progresión a través de una serie de pasos obligatorios por cada uno de los estados parcialmente plegados, sino que sería una búsqueda estocástica entre las muchas conformaciones

accesibles de una cadena polipeptídica. Durante este proceso, residuos de aminoácidos ubicados en posiciones distantes en la secuencia entrarían en contacto “específico” unos con otros. Debido a que las interacciones “correctas” –es decir aquellas que conducen al estado nativo- son en promedio más estables que las incorrectas (no nativas), tal mecanismo de búsqueda sería, en principio, capaz de hallar la conformación de menor energía. Es evidente que este proceso resulta extremadamente eficiente para aquellas secuencias que han sido seleccionadas durante la evolución para plegarse en estructuras globulares. De hecho, solamente un número muy pequeño de todas las posibles conformaciones necesita “probarse” durante el proceso de búsqueda conformacional [Dobson, 2004].

Si bien la mayoría de las proteínas globulares son capaces de adquirir su estado nativo de manera autónoma, *in vivo*, el plegado asistido es a menudo necesario. Las células poseen complejos sistemas de control de calidad y vigilancia sobre el plegado de proteínas conocido en conjunto como proteostasis celular. Son parte del mismo: (i) el sistema de chaperonas, que asiste en el plegado proteico, y (ii) el sistema ubiquitina-proteasoma, que elimina las proteínas mal plegadas. En conjunto, estos sistemas contribuyen a prevenir la acumulación de proteínas mal plegadas y/o agregadas, hecho que, en última instancia, provocaría daños celulares [Chen y col, 2011].

Pequeñas fluctuaciones en el pH y/o la composición del medio intracelular (presencia de iones metálicos o glucosaminoglicanos, entre otros), combinados con la naturaleza metaestable del estado nativo pueden desplazar el equilibrio hacia el desplegado o la agregación. Asimismo, el plegado incorrecto puede resultar la consecuencia de mutaciones en el gen que codifica para la proteína, factor que podría disminuir la estabilidad del estado nativo. Además, también pueden acumularse moléculas con plegado incorrecto bajo condiciones de estrés celular que cursan con el incremento sostenido de la síntesis de proteínas y/o provocan la disminución de la capacidad funcional de los sistemas de control del plegado. En condiciones fisiológicas, las proteínas mal plegadas y agregados son rápidamente removidos por el sistema de degradación para pasar nuevamente al “*pool*” intracelular de aminoácidos [Nelson y col., 2008]. No obstante los rigurosos mecanismos de regulación y asistencia al plegado de

proteínas, hay numerosas patologías en las cuales encontramos acumulación de proteínas mal plegadas. Entre algunas de las enfermedades que implican la agregación proteica, se encuentran las amiloidosis, las enfermedades causadas por priones y otros trastornos provocados por el depósito de proteínas. Aunque existe una relación fisiológica directa entre la edad y la acumulación de agregados proteicos, encontramos ejemplos en los cuales -si bien se supone que la edad no sería la causa- aún se desconocen los mecanismos que desencadenarían su acumulación. Más información al respecto puede encontrarse en "AGREGACIÓN PROTEICA AMILOIDE".

Existen varias formas de intervención que han demostrado la capacidad de prevenir o disminuir el plegado incorrecto y la agregación *in vitro*. Entre ellos podemos nombrar a modo de ejemplo a los ligandos que estabilizan el estado nativo y a la presencia de péptidos competidores. Sin embargo, hasta ahora no se han encontrado métodos generales que puedan aplicarse universalmente para prevenir la agregación. No obstante, encontramos una serie de estrategias que con frecuencia han sido aplicadas con éxito. Actualmente los enfoques más prometedores implican el uso de chaperonas, la inmovilización sobre matrices, mantener baja la concentración de proteína, la adición de agentes tales como arginina o el polietilén glicol (PEG) y el uso de proteínas de fusión, entre otros [Fink, 1998]. Algunos de estos métodos se encuentran en etapa de desarrollo para su aplicación *in vivo*. Estas aproximaciones intentan evitar la acumulación de proteínas mal plegadas cuando fallan los sistemas celulares naturales de prevención y limpieza. A continuación se detallan en la Tabla 1.1 (adaptada de Eiselle y col., 2015) las principales estrategias descritas hasta el momento.

ESTRATEGIA O AGENTE TERAPÉUTICO	TRASTORNO	ESTADIO DE DESARROLLO
REDUCCIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNA		
Drogas antiinflamatorias	Amiloidosis secundaria AA	Aprobado
Reducción del mRNA	Amiloidosis secundaria AA	Fase preclínica
Inhibidores o moduladores de la β -secretasa	Alzheimer	Fase clínica
Moduladores de la γ -secretasa	Alzheimer	Fase clínica
Inhibidores del proteasoma	Amiloidosis primaria AL	Aprobado
ARNi	Amiloidosis primaria AL	Fase clínica
ESTABILIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS		
Estabilizadores cinéticos	Amiloidosis TTR	Aprobado
CONTROL DE CALIDAD DE PROTEÍNAS		
Pequeñas moléculas activadoras de la respuesta “ <i>heat shock</i> ” y otras respuestas activadas ante la aparición de proteínas mal plegadas.	Enfermedad de Huntington, Amiloidosis TTR	Fase preclínica
Inhibidores de la Hsp90	Alzheimer, Parkinson, Enfermedad de Huntington	Fase preclínica
Inhibidores de la Hsp70	Alzheimer	Fase preclínica
Inhibidores de la enzima que cataliza lamdesubiquitinación	Alzheimer, Enfermedad de Huntington	Fase preclínica
REMODELACIÓN DE FIBRAS AMILOIDES		
EGCG	Parkinson, Cardiomiopatía relacionada con TTR	Fase preclínica
REMOCIÓN DE FIBRAS AMILOIDES		
Variantes de la Hsp104 desagregasa	Parkinson, Esclerosis lateral amiotrófica, Demencia Fronto-temporal	Fase preclínica
Anticuerpos catalíticos	Amiloidosis TTR	Fase preclínica
REMOCIÓN DE PROTEÍNAS Y AMILOIDES		
Inmunización pasiva con amiloide β y tau	Alzheimer	Fase clínica
Inmunización activa	Alzheimer	Fase clínica
Inmunización pasiva	Parkinson	Fase preclínica

Tabla 1.1. Estrategias terapéuticas emergentes para el tratamiento de enfermedades degenerativas. Adaptada de Eisela y col., 2015.

Abreviaturas: AA, proteína amiloide A; Amiloidosis AL, amiloidosis causada por el amiloide de cadena liviana de la inmunoglobulina; EGCG, Epigallocatequina-3-Galato; Hsp, proteína de *shock* térmico (por sus siglas en inglés “heat shock protein”); ARNi, ARN de interferencia; TTR, transtiretina.

Resulta interesante destacar la estrategia descrita por Saelices y col. (2015), que proponen una vía para la inhibición de la agregación de la transtiretina (TTR) basada en péptidos. La agregación amiloide de TTR se produce por disociación de la TTR tetramérica en monómeros, éstos se despliegan parcialmente en intermedios amiloidogénicos y se auto-asocian en oligómeros solubles y agregados amiloides. Los autores diseñaron inhibidores peptídicos que tras la disociación del tetrámero se unen a sus segmentos idénticos e impide el auto-reconocimiento y la agregación. El complejo TTR unido al inhibidor es más estable que el monómero pero menos estable que el tetrámero, lo que favorece el reensamblado del tetrámero. Además, aunque los inhibidores fueron diseñados para interactuar después de la disociación del tetrámero, pueden actuar a nivel de la fibra amiloide tapando las fibras emergentes e impidiendo un crecimiento adicional. En cualquier caso, la interacción estérica de tipo cremallera de los inhibidores peptídicos bloquearía la auto-asociación y la agregación de proteínas. Su mecanismo de acción permite un tratamiento combinatorio con compuestos estabilizadores de tetrámeros, que podría ser un enfoque terapéutico eficaz [Saelices y col., 2015].

AGREGACIÓN PROTEICA

En los últimos años se ha dedicado mucho esfuerzo a la comprensión del complejo proceso de agregación proteica. La agregación de proteínas es un fenómeno por el cual las mismas, bajo ciertas condiciones, adoptan una conformación que desencadena su polimerización. Dicho mecanismo puede resultar en la formación de agregados amorfos, cuerpos de inclusión o fibras amiloides. En el caso del estudio *in vitro* de proteínas, la aparición de agregados habitualmente es una dificultad que entorpece o impide su análisis. Las consecuencias de la presencia de agregados proteicos en la industria biofarmacéutica puede resultar devastadora desde el punto de vista económico. Peor aún, el efecto inmunogénico *in vivo* de los mismos puede llegar a ser letal en pacientes a quienes se les administra un biofármaco contaminado con dichas impurezas.

La prevalencia de la agregación de proteínas es, probablemente, mucho mayor de lo que generalmente se estima, llegando incluso a pasar inadvertida en experimentos que evalúen el plegado de proteínas *in vitro*. [Fink y col., 1998]. Es conveniente clasificar la agregación de proteínas de acuerdo con las siguientes categorías: i) *in vivo* o *in vitro* y ii) ordenada o desordenada. Las fibras amiloides (tanto *in vivo* como *in vitro*) son ejemplos de agregados ordenados, mientras que generalmente los cuerpos de inclusión y agregados amorfos son ejemplos de agregados desordenados.

La agregación de proteínas involucra tanto a proteínas en estado desplegado como nativas. Se supone que la formación de cuerpos de inclusión y de otros agregados durante la etapa de plegado surge de la interacción hidrofóbica entre estados incorrectamente plegados o desnaturalizados. En el caso de las fibras amiloides y otros agregados extracelulares, éstos surgen a partir de proteínas plegadas en conformación nativa (en un proceso análogo al de la polimerización de la hemoglobina S [Ferrone y col., 1985]). Sin embargo, se sugiere que el proceso de agregación sería muy factible de ser iniciado a partir de la existencia de intermediarios parcialmente plegados. Una importante implicancia de esta afirmación es que la agregación podrá ser promovida por factores y/o condiciones que favorezcan el enriquecimiento en la población de

estos intermediarios de plegado. Vale aclarar que las características estructurales y propiedades fisicoquímicas de estas especies intermediarias podrían ser significativamente diferentes de las de la proteína en sus estados nativo o desplegado [Fink, 1998].

AGREGACIÓN PROTEICA AMILOIDE

El auto-ensamblado de proteínas en estructuras supramoleculares ordenadas insolubles y enriquecidas en hoja- β , conocidas como fibras amiloides, está relacionado con un número reconocidamente creciente de trastornos humanos severos y en muchos casos finalmente letales, agrupados bajo la denominación de amiloidosis. Tal como se detalla en la Tabla 1.2., estos trastornos incluyen a las enfermedades de Alzheimer y Parkinson -dentro del grupo de las patologías más conocidas-, así como también a las encefalopatías espongiiformes e, inclusive, a la diabetes mellitus tipo II.

TRASTORNO	COMPONENTE PROTEICO ASOCIADO
Alzheimer	péptido A β (placas); péptido Tau (ovillos)
Encefalopatía espongiiforme	Prion (completo o fragmentos)
Parkinson	α -sinucleína (silvestre o mutante)
Amiloidosis primaria sistémica	Cadenas livianas Ig (completa o fragmentos)
Amiloidosis secundaria sistémica	Amiloide sérico A (completa o fragmento de 76 residuos)
Demencia fronto-temporal	Tau (completa o fragmentos)
Amiloidosis senil sistémica	Transtiretina (completa o fragmentos)
Polineuropatía familiar amiloide I	Transtiretina (más de 45 mutantes)
Amiloidosis relacionada a la hemodiálisis	β_2 microglobulina
Polineuropatía familiar amiloide III	Apolipoproteína AI (fragmentos)
Amiloidosis finlandesa sistémica hereditaria	Gelsolina (fragmentos de 71 residuos)
Angiopatía cerebral amiloide hereditaria	Cistatina C (fragmentos de menos de 10 residuos)
Diabetes mellitus tipo II	Polipéptido amiloide de los islotes (fragmentos)
Carcinoma medular de tiroides	Calcitonina (fragmentos)
Amiloidosis atrial	Factor natriurético atrial
Amiloidosis no neuropática sistémica hereditaria	Lisozima (completa o fragmentos)
Amiloidosis localizada relacionada a la inyección con insulina	Insulina
Amiloidosis renal hereditaria	Cadena A del Fibrinógeno α , transtiretina, apolipoproteína AI, apolipoproteína AII, lisozima, gelsolina, cistatina-C.
Esclerosis lateral amiotrófica	Superóxido dismutasa I (silvestre o mutante)
Enfermedad de Huntington	Huntington (completo o fragmentos poli(Q))
Atrofia muscular espinal y bulbar	Receptor de andrógeno (completo o fragmentos poli(Q))
Ataxia espinocerebelar	Ataxina (completa o fragmentos poli(Q))
Ataxia espinocerebelar 17	Proteína de unión a la caja TATA (completa o fragmentos poli(Q))

Tabla 1.2. Resumen de las enfermedades amiloides más comunes y las proteínas y péptidos asociados a ellas. Adaptada de Sgarbossa, 2012 y Stefani, 2003.

Una característica común a todas estas enfermedades es la aparición de agregados proteicos insolubles que se depositan en ciertos tejidos [Chiti y col., 2006; Dobson, 2001; Rochet y Lansbury, 2000]. A pesar de la relevancia médica de estas devastadoras enfermedades, se sabe relativamente poco sobre las bases del propio proceso de agregación proteica. Es muy grave el hecho de que se cuente con tan escasa información acerca de la forma de inhibir de forma segura la formación de las especies tóxicas. En este sentido, la evidencia experimental indica que los agregados tempranos, tales como oligómeros solubles y protofibras, cumplirían un papel fundamental en la promoción de los efectos patológicos de las amiloidosis [Haass y col., 2007; Caughey y Lansbury, 2003].

La falta de comprensión a nivel molecular del proceso mismo de agregación proteica es, por sobre todo, un obstáculo importante en la elaboración de estrategias de intervención en patologías relacionadas con dicho fenómeno. En particular, se sabe poco sobre el papel que cumplirían los productos intermedios. Asimismo, tampoco resultan claros los factores que determinan la tendencia intrínseca de una cadena polipeptídica a auto-ensamblarse por formación de hojas β [Dobson 2003; Lansbury y col., 2006].

A pesar de la falta de rasgos comunes identificables tanto en la secuencia como en la estructura tridimensional de proteínas implicadas en diferentes enfermedades amiloides, los agregados fibrilares asociados a todas ellas se caracterizan por un alto grado de orden estructural y un contenido mayoritario de hoja β intermolecular [Calamai y col., 2005].

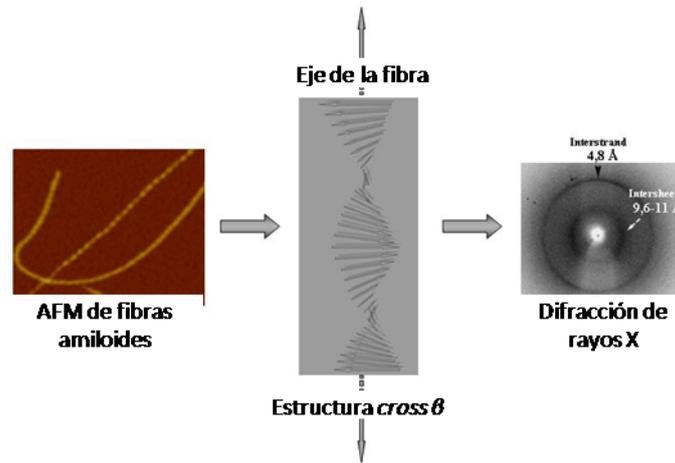


Figura 1.1. Esquema del esqueleto de una fibra amiloide (centro) y su imagen por microscopía de fuerza atómica (AFM, izquierda). A la derecha se observa la difracción de rayos X de dicha estructura que muestra con reflexiones características en 4,8 Å y 9,6-11 Å correspondientes al espaciado regular entre las cadenas β apiladas y las hojas, respectivamente. Adaptada de Stefani, 2008.

Las fibras amiloides están típicamente formadas por dos o más protofilamentos elementales retorcidos el uno contra el otro, que forman una estructura similar a una cuerda (Figura 1.1, panel izquierdo). Tal como se muestra en el panel central, cada protofilamento está constituido, a su vez, por una estructura de núcleo ordenado donde cada monómero proteico proporciona hebras β que se apilan sucesivamente formando una hoja β paralela [Kajava y col., 2004] o antiparalela [Qiang y col., 2012]. Ésta se propaga a lo largo del eje de la fibra y las hebras β que la componen se disponen perpendicularmente a dicho eje, en una estructura conocida como “cross β ”. El patrón de difracción de rayos X de dicha estructura (Figura 1.1, panel derecho) muestra reflexiones que corresponden a distancias de 4,8 Å y 9,6-11 Å, lo que da cuenta de la regularidad en la separación entre las hebras β apiladas y las hojas, respectivamente [Stefani, 2008]. Tal como se mencionó anteriormente, esta estructura es común a todas las fibras amiloides conocidas, a pesar de la falta de similitud de secuencia y de la ausencia de semejanzas estructurales entre las distintas proteínas amiloidogénicas originales [Chiti y col., 1999].

Se ha postulado que existiría un mecanismo común capaz de describir la formación de los diversos agregados fibrilares. Por otra parte, un creciente cuerpo de evidencia apoya la hipótesis “genérica” que afirma que la capacidad de formar las hojas β constitutivas de las estructuras amiloides sería una

propiedad inherente al esqueleto polipeptídico. Al ser sus grupos funcionales - carbonilo e imino- aquellos que establecen la red de puentes de hidrógeno que estabilizarían dicha estructura, todas las proteínas, al menos en principio, poseerían la potencialidad de formar tales estructuras [Calamai y col., 2005]. Es por esta razón que se ha descrito que la toxicidad celular producida por los agregados amiloides relacionados específicamente a enfermedades neurodegenerativas se reproduce, en un grado similar, por otras proteínas no relacionadas a la patología [Stefani, 2003, Stefani y Dobson, 2003]. En la última década, se ha encontrado que proteínas aparentemente no relacionadas con enfermedades conocidas, se convierten *in vitro* en fibras amiloides que conservan todas las características fisicoquímicas de aquellas probadamente vinculadas a enfermedades ya descritas [Guijarro y col., 1998; Konno y col., 1999; Villegas y col., 2000; Fandrich y col., 2001; De la Paz y col., 2004].

La potencial capacidad de una cadena polipeptídica de agregar dando origen a fibras de tipo amiloide morfológicamente similares -independientemente de la composición en aminoácidos y de la secuencia de las proteínas precursoras- puede racionalizarse en términos fisicoquímicos relativamente simples. Tal propiedad surge de la tendencia intrínseca de las proteínas o péptidos a autoensamblarse en conjuntos poliméricos estabilizados por enlaces puente de hidrógeno intermoleculares que se establecen entre segmentos de estructura β paralelos o antiparalelos. En este sentido, las proteínas naturales pueden ser consideradas como polímeros de aminoácidos seleccionados evolutivamente de manera tal que sus secuencias aminoacídicas estén optimizadas para “desfavorecer” la agregación promoviendo el correcto plegado en estructuras compactas, aunque no rígidas. Esto se debe principalmente a que las interacciones terciarias entre cadenas laterales ocultarían del solvente acuoso tanto al esqueleto poliamídico como a los residuos que conforman el núcleo hidrofóbico de la proteína [Stefani, 2012]. Por el contrario, la agregación -estabilizada principalmente por interacciones secundarias- puede considerarse el resultado de la expresión, en condiciones no naturales, de la tendencia intrínseca del polipéptido a dar interacciones intermoleculares secundarias [Ianuzzi y col., 2013 y las referencias citadas en la misma].

Entre los precursores solubles de los agregados amiloides se encuentran las proteínas globulares, sus fragmentos y los polipéptidos nativamente desplegados [Uversky y Fink, 2004]. Se ha demostrado que incluso aquellas proteínas que en condiciones nativas adoptan conformaciones todo- α , son capaces de formar estructuras amiloides *in vitro* [Ianuzzi y col., 2013 y las referencias citadas en la misma].

El mecanismo molecular que explica el crecimiento de las fibras amiloides puede variar entre diferentes péptidos y proteínas, así como también por cambios en las condiciones de agregación. Sin embargo, por lo general, el proceso de agregación se desencadena por factores que aumentan la concentración de estados conformacionales con mayor propensión a la agregación [Stefani, 2006]. Estas condiciones pueden favorecer termodinámicamente la agregación, dada la reducción en la estabilidad conformacional proteica [Stefani, 2006].

En líneas generales, las proteínas globulares experimentan desestabilización estructural a raíz de factores tales como: mutaciones [Hurle y col., 1994; McCutchen y col., 1995; Booth y col., 1997; Chiti y col., 2000; Niraula y col., 2002], aumento de temperatura [Krebs y col., 2000; Moraitakis y Goodfellow, 2003], alta presión [De Felice y col., 2004; Ferrao-Gonzales y col., 2000], acidificación del medio [Khurana y col., 2001; Zurdo y col., 2001], o exposición a agentes orgánicos desestabilizantes [Chiti y col., 1999; Krebs y col., 2000], como consecuencia de los cuales pueden agregar rápidamente. Cabe aclarar que la magnitud de la perturbación necesaria para desencadenar la agregación puede ser diversa, generándose estados globalmente o parcialmente desplegados [Dobson, 2003; Uversky y Fink, 2004]. Incluso, en algunos casos, se consolidan estados del tipo nativo que poseen sectores parcialmente desplegados confinados a regiones locales de la estructura [Bousset y col., 2002; Lee y col., 2003; Plakoutsi y col., 2004; Eakin y col., 2004]. Un caso diferente está representado por las proteínas nativamente desplegadas. Éstas exponen porciones extensas de la cadena polipeptídica al solvente acuoso de manera tal que la agregación podría ocurrir sin el requisito previo de que ocurra un cambio conformacional de gran magnitud [Uversky y Fink, 2004].

Las condiciones en las que se forman los estados parcialmente plegados antes descritos son, por lo tanto, aquellas que potencian la formación de agregados fibrilares. Por el contrario, condiciones que generen estados completamente desplegados (como por ejemplo altas concentraciones de agentes desnaturalizantes tales como la urea o el cloruro de guanidinio) evitarían la agregación ya que desestabilizan tanto las interacciones no covalentes intracatenarias como las intercatenarias [Tanford, 1970].

Es importante señalar una vez más que serían los primeros agregados formados -y no las fibras amiloides maduras- los potenciales responsables del daño celular y posterior deterioro del sistema nervioso central en las enfermedades neurodegenerativas [Walsh y col., 2002; Bucciantini y col., 2002; Caughey y Lansbury, 2003]. En los últimos años se ha alcanzado un consenso mayor en la identificación de las especies de más alto poder citotóxico en el proceso de amiloidosis. En este sentido, se ha descrito que la población heterogénea de fibras inestables conocidas como protofibrillas, o bien los agregados prefibrilares, son las especies que se consideran más citotóxicas. En contraposición a éstos, la fibra amiloide madura se reconoce como estable, relativamente inerte, benigna e incluso “beneficiosa” por ser capaz de reclutar a los oligómeros más tóxicos [Stefani, 2008].

De esta manera, el estado nativo de una proteína puede ser considerado como metaestable con respecto a la fibra amiloide debido a las altas barreras cinéticas asociadas con el auto-ensamblado *in vivo* de las cadenas polipeptídicas [Baldwin y col., 2011]. Más información respecto de esto último se puede encontrar en la sección “EL MODELO DE PAISAJES DE ENERGÍA PARA EL PLEGADO Y LA AGREGACIÓN”.

La toxicidad de los precursores fibrilares fue confirmada por la aparición en tejidos de pequeños oligómeros que preceden la expresión clínica de la enfermedad. Esto podría explicar la frecuente observación de falta de correlación entre la carga de depósitos amiloides y la gravedad de los síntomas clínicos. Estas consideraciones han planteado un interés notable en determinar las características estructurales de estos intermediarios tóxicos aunque su inestabilidad hace muy difícil su caracterización estructural [Stefani, 2008].

De manera relevante, la agregación proteica se constituye también como un importante cuello de botella en el área biotecnológica. Esto resulta particularmente crítico para la producción y purificación de proteínas terapéuticas, hecho que potencialmente dificulta la administración de muchos fármacos a base de polipéptidos [Ventura y Villaverde, 2006]. Además, la presencia de agregados proteicos en formulaciones terapéuticas reduce la eficacia del fármaco y puede causar respuestas inmunes graves en los pacientes [Rosenberg, 2006].

En un campo diferente, el auto-ensamblado controlado de proteínas y péptidos en estructuras de tipo amiloide podría constituir una alternativa atractiva para desarrollar nuevos nanomateriales [Mitraki, 2010].

MECANISMO DE AGREGACIÓN

Vale la pena recordar que las fibras amiloides son sorprendentemente similares entre sí en su morfología y propiedades estructurales a pesar de originarse a partir de proteínas con diferentes secuencias aminoacídicas.

De un modo general se ha demostrado que la formación de fibras involucra casi universalmente, un proceso de polimerización que puede ser descrito por una curva sigmoidea. La cinética de formación de los amiloides se divide en tres fases (Figura 1.2, curva verde): (i) una fase de nucleación en la que los monómeros experimentan cambios conformacionales y tienden a asociarse para formar núcleos oligoméricos, (ii) una fase de elongación, en la que los núcleos crecen rápidamente por adición masiva de monómeros para formar fibrillas hasta alcanzar el estado de fibras maduras (iii).

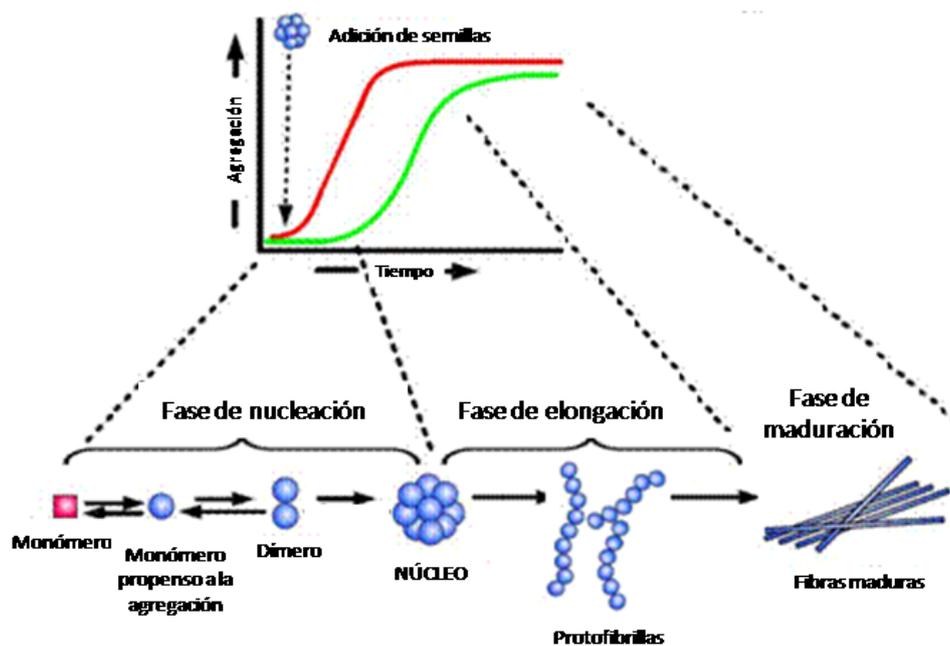


Figura 1.2. Cinética de formación de fibras amiloides (curva verde) representada por una curva sigmoidea con una fase de nucleación, seguida de una fase de elongación rápida para culminar en la fase de maduración. La adición de semillas reduce el tiempo de latencia e induce la formación de agregados más rápidamente (curva roja). Adaptado de Kumar y Walter, 2011.

La primera fase también se denomina "fase de retardo" (fase *lag*) y es la etapa durante la cual las especies solubles se asocian para formar los núcleos. Aquí ocurre una transición desde la estructura nativa hacia especies oligoméricas de

conformación en hoja β [Sgarbossa, 2012]. Perturbaciones en la conformación proteica pueden desplazar el equilibrio inicial del proceso hacia una situación caracterizada por el enriquecimiento en especies con mayor propensión a la agregación tales como son las especies parcialmente plegadas [Stefani, 2003].

La nucleación es un paso termodinámicamente desfavorable, y por ende es el "paso limitante" del proceso de agregación. Esta etapa depende tanto de la proteína en cuestión como del medio [Ianuzzi y col., 2013, Stefani, 2008]. La nucleación requiere, en primera instancia, de la auto-asociación de monómeros solubles, un proceso termodinámicamente desfavorable y, por ello, que transcurre lentamente. En la fase de nucleación los monómeros sufren cambios conformacionales se auto-asocian para constituir núcleos oligoméricos ricos en estructura β [Kumar y Walter, 2011]. Además, se han identificado mecanismos de nucleación secundaria dependientes o independientes de monómero. Los primeros operan por ruptura de las fibras existentes mientras que los segundos por catálisis de nucleación sobre la fibra, procesos que conducen a la formación de núcleos adicionales [Knowles y col., 2009; Cohen y col., 2011].

La segunda fase es denominada "fase exponencial" o "fase de crecimiento" y constituye un proceso termodinámicamente favorable. Se puede subdividir en varios pasos a través de los cuales las especies monoméricas solubles se adicionan progresiva e irreversiblemente a los extremos de las estructuras preformadas ricas en hoja β . En este fenómeno juegan un papel fundamental las interacciones hidrofóbicas, los enlaces puente de hidrógeno y las interacciones de apilamiento (*Pi-stacking*). Las protofibrillas se forman durante la fase de crecimiento y representan los elementos estables iniciales en la vía de formación de fibras. Hay dos posibles mecanismos de crecimiento de fibras (Figura 1.3): (i) de alargamiento de hoja β , en el que la fibra crece mediante la adición de monómeros o péptidos individuales al final de cada hoja β , y (ii) la adición lateral o "ramificación", en la que la fibra crece mediante la adición de monómeros de forma lateral. Ambos mecanismos parecen contribuir de manera similar desarrollo de fibras.

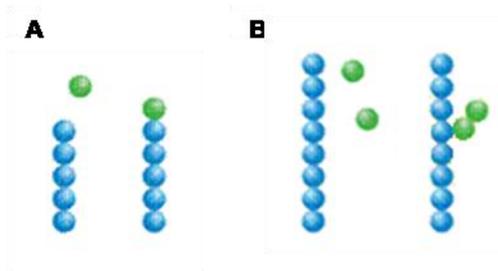


Figura 1.3. Esquema que representa los modos de crecimiento de fibras amiloides: alargamiento (A) y ramificación (B).

En la tercera fase o "fase de saturación", las fibras están completamente formadas y se asocian entre sí para formar fibras maduras estables [Sgarbossa, 2012].

Finalmente, la formación de fibras amiloides puede también proceder a través de un proceso de "polimerización sembrada". En este, la adición de semillas (agregados preformados o núcleos) reduce drásticamente el tiempo *lag* y adelanta la fase exponencial, induciendo la formación de agregados más rápidamente (Figura 1.2, curva roja) [Sgarbossa, 2012].

EL MODELO DE PAISAJES DE ENERGÍA PARA EL PLEGADO Y LA AGREGACIÓN

Poco después de los experimentos clásicos de Anfinsen sobre la renaturalización de proteínas desplegadas [Anfinsen, 1973], Levinthal reconoció la dificultad conceptual de suponer que una molécula busque al azar, a través de la exploración de un número astronómico de configuraciones desplegadas, aquella estructura nativa en un tiempo biológicamente relevante [Levinthal, 1969]. Para resolver esta paradoja postuló el concepto de vía de plegado de proteínas. La búsqueda de esta(s) vía(s) motivó numerosos estudios experimentales. Entre los muchos modelos planteados para el plegado proteico encontramos el difusional-colisional [Karplus y Weaver, 1994], la nucleación-condensación [Itzhaki y col., 1995], el rompecabezas [Harrison y Durbin, 1985] y el colapso hidrofóbico [Agashe y col., 1995].

Más recientemente, el concepto de "embudo de plegado" [Leopold y col., 1992] generaliza la noción de vías, dado que está basado en la caracterización estadística del paisaje de energía para el plegado [Bryngelson y col., 1995; Wales, 2003], y ha sido hasta ahora el más ampliamente aceptado. En este marco, el plegado de proteínas puede ser considerado como una rampa con múltiples vías de evolución a través del paisaje de energía libre. Este paisaje se representa como un embudo en cuyo fondo encontraríamos la especie de menor energía [Noe y col., 2009; Yon, 2002]. La teoría del paisaje energético surge entonces como una descripción estadística del proceso de plegado de una proteína. Se supone que el estado nativo se alcanzaría a través de un conjunto de vías alternativas de plegado en lugar de -tal como describen otros modelos- a través de una serie de pasos secuenciales. Se sugiere que el modelo más realista de un paisaje energético es el de un embudo de superficie rugosa y sesgada hacia la estructura nativa. Esta descripción ha sido desarrollada utilizando herramientas de la mecánica estadística de sistemas desordenados -siendo el vidrio el modelo más ampliamente conocido-, polímeros simples y transiciones de fase de sistemas [Onuchic y col., 1997]. En la representación del embudo de plegado, la profundidad del pozo representa la diferencia de energía libre entre el estado nativo y el estado desplegado. Asimismo, el ancho del mismo representa la entropía conformacional del

sistema. La idea principal que se desprende de esta teoría es que, globalmente, el paisaje energético se asemeja a un embudo que presenta “trampas” (anfractuosidades) en las que la proteína puede residir transitoriamente [Onuchic y col., 1997]. Finalmente, el paisaje de energía resuelve el hecho de que sólo un pequeño número de todas las conformaciones posibles deba ser muestreado por la proteína a lo largo de su transición hacia la estructura nativa. De alguna manera, la eficiencia y la rapidez del proceso de plegado han sido optimizadas por la selección natural a través de la evolución [Chiti y Dobson, 2006].

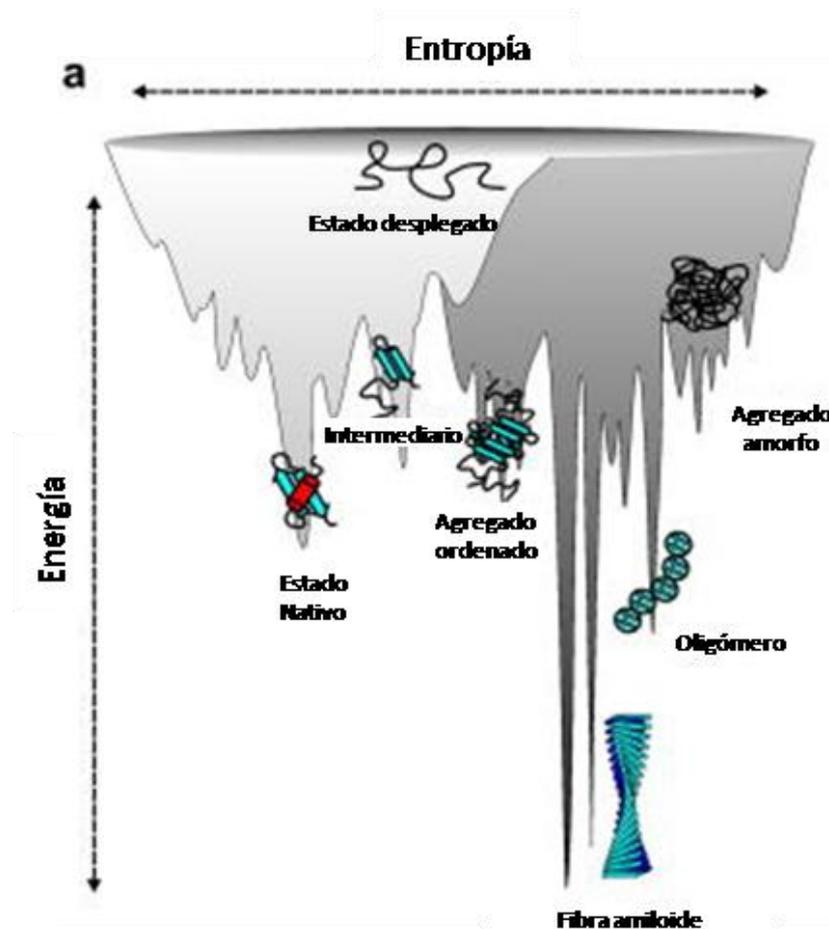


Figura 1.4. Ilustración de un paisaje de energía combinado para el plegado de proteínas y su agregación. Se muestra un embudo de plegado para describir la búsqueda conformacional de una sola cadena de polipéptido (gris claro). A la derecha, la asociación intermolecular de proteínas aumenta dramáticamente la rugosidad (gris oscuro). Extraído de Jahn y col., 2008.

En la Figura 1.4 se puede ver un modelo combinado de paisaje energético para el plegado de proteínas (gris claro) y la agregación (gris oscuro). Ambas regiones muestran una considerable rugosidad, sin embargo, el mínimo de energía de las fibras amiloides maduras podría ser más profundo y más agudo que el de las proteínas monoméricas nativas. Esto puede entenderse dada la rigidez estructural de las fibras amiloides, así como también por el propio mecanismo de polimerización dependiente de la nucleación [Jahn y col., 2008]. La imagen destaca la diversidad de estados conformacionales potencialmente muestreables para una proteína cuando es estabilizada por contactos intramoleculares (proteína monomérica) o intermoleculares (intermediarios de agregación y fibras maduras). El establecimiento de contactos intermoleculares se refleja como un aumento en la rugosidad del paisaje para la agregación de proteínas con respecto a lo que se muestra en el lado del paisaje correspondiente al plegado hacía el estado nativo. Se observa claramente que la barrera de energía que debe superar una cadena polipeptídica -ya sea desplegada o plegada- para tener acceso al paisaje de agregación y generar los núcleos de agregación, suele resultar el paso limitante de la velocidad del proceso de agregación [Hartl y Hayer-Hartl, 2009].

EL MODELO ESTRUCTURAL

Las proteínas ligadoras de ácidos grasos (LBP) se asocian de forma reversible y no covalente con lípidos, mejorando en gran medida su solubilidad acuosa y facilitando así su transporte entre tejidos y dentro de la célula. La relevancia de su existencia radica en ofrecer a la célula la combinación adecuada de lípidos, optimizando su biodisponibilidad de modo tal de adecuarla a cada situación fisiológica particular y, por lo tanto, influir sobre los procesos que dependen de lípidos, tales como aquellos involucrados en pasos clave de vías de señalización o provisión de energía. Vale destacar que existen muy pocas LBPs con actividad enzimática reportada [Glatz, 2015 y las referencias citadas en la misma].

La presencia de estas proteínas ha sido descrita en diversos tipos de células eucariotas especializadas tales como el tejido epitelial y el neural. Las LBPs se pueden clasificar en dos grupos de acuerdo con su ubicación: intracelulares (iLBP) y extracelulares (eLBP) [Banaszak y col., 1994]. A su vez encontramos: proteínas solubles y otras unidas a la membrana.

Estas proteínas pueden unir, entre otros ligandos, ácidos grasos, acil-CoA, esteroides o retinoides. Aunque comparten una funcionalidad común, presentan diversos motivos estructurales. Un caso particular lo revisten las LBPs de nematodos ya que, contrariamente al predominio de estructura β de la familia, en estos organismos encontramos proteínas enriquecidas en estructura de hélice α tales como las proteínas de unión a ácidos grasos y proteínas de unión a retinol (FAR) y la poliproteína de nematodo alergeno/antígeno (PAN). Las FAR están presentes como diversas isoformas en cada especie y las PAN se organizan como grandes precursores compuestos por varias repeticiones en tándem que pueden mostrar diferentes funciones. Dado que estas proteínas no tienen homólogos en plantas o animales, representan blancos potenciales terapéuticos para nuevos medicamentos antiparasitarios [Kennedy, 2000; Solovyova y col., 2003]. Dentro del grupo de proteínas α también podemos encontrar a la proteína de unión a acil-CoA (ACBP), cuya estructura es de un manojo de cuatro hélices α con conectividad *up-down* que -adoptando una orientación en forma de V-, da lugar a la cavidad de unión a ligando [Kragelund

y col., 1999]. Por otro lado, la proteína transportadora de esteroles 2 (SCP2) y la proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP) pertenecen a la clase $\alpha\beta$. La primera cuenta con una hoja β de 5 hebras unida en la cara interna a una capa de 5 hélices α [De Berti y col., 2013; Stolowich y col., 2002]. La PLTP presenta una estructura más compleja formada por una lámina de 5 hebras β en una cara y 9 hélices α en la otra cara [Kuzin y col., resultados no publicados].

A pesar de la variabilidad descrita, el barril β prevalece como el motivo de plegado y unión más comúnmente encontrado entre los diferentes miembros de la familia de LBPs. La mayoría de ellas se caracterizan por un patrón de plegado estrechamente relacionado, aunque pueden llegar a compartir tan sólo un 20 % de similitud en la secuencia aminoacídica. De hecho, la característica distintiva de la mayoría de las LBPs es su arquitectura simple de barril β , el cual da lugar a una gran cavidad que permite acomodar el ligando hidrófobo. Las hebras que forman el barril se ordenan en forma antiparalela de tal manera que la red de enlaces puente de hidrógeno se establece entre la hebra i y las hebras $(i+1)$ y/o $(i-1)$. En las tres dimensiones, todas las hebras -incluso la primera y última hebra- están situadas de modo tal que forman una escalera de enlaces puente de hidrógeno [Banaszak y col., 1994]. En otras palabras, esta topología corresponde a un barril *up and down* [Branden y Tooze, 1999]. Las formas extracelulares (eLBPs) -a menudo se hace referencia a ellas como "lipocalinas"- son barriles cuasi-esféricos de 8 hebras y cuentan con, aproximadamente, 175 aminoácidos de longitud. Por el contrario, los miembros intracelulares (iLBPs) son algo más cortos (130 residuos de aminoácidos). Debido a su aspecto más achatado, estos barriles de 10 hebras se denominan en ocasiones " *β clams*".

Las proteínas de unión a ácidos grasos (FABP) pertenecen a la familia multigénica y conservada de las iLBPs. La función común a todas las FABPs es la de unir ácidos grasos y/o ligandos hidrófobos. Si bien se ha introducido una nomenclatura numérica para los diversos [Hertzel y Bernlohr, 2000], las FABPs aún conservan el nombre de los tejidos en los que fueron descritas por primera vez, o bien el de aquél en donde se expresan predominantemente. Hay que reconocer, sin embargo, que tal nomenclatura es un tanto confusa, ya que la mayoría de los tejidos expresan diferentes FABPs en forma simultánea

[Haunerland y Spener, 2004]. Cada FABP presenta un perfil de unión a ligando que resulta único y coincide con las diferentes demandas en la biodisponibilidad de las especies de lípidos de cada tejido [Storch y Thumser, 2010].

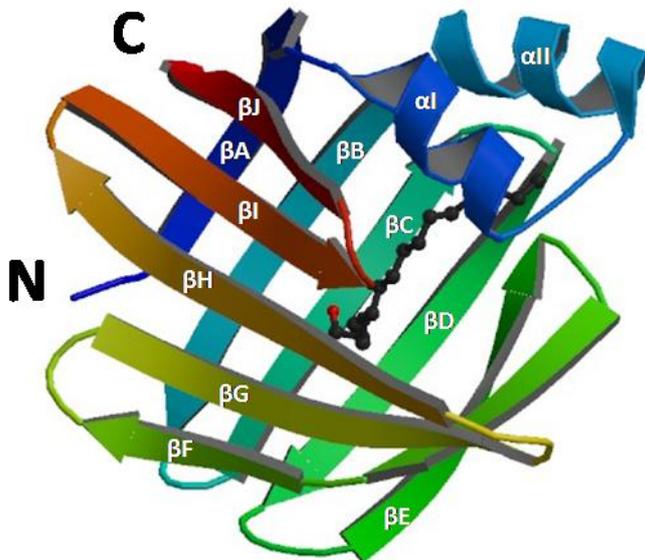


Figura 1.5. Estructura cristalográfica refinada de la proteína ligadora de ácidos grasos de intestino de rata con ácido palmítico unido (2IFB). Se indican el nombre de las hebras sobre la figura.

Las FABPs son proteínas monoméricas con estructura de tipo barril β antiparalelo constituido por dos hojas β de cinco hebras cada una, denominadas β A- β E y β F- β J (Figura 1.5) Estas hojas están dispuestas en una orientación casi ortogonal y delimitan la cavidad de unión del ligando. El barril FABP resulta aplanado y presenta discontinuidad en la red de puentes de hidrógeno entre las hebras β D y β E. Todas las hebras β están conectadas por giros β a excepción de β A y β B, donde aparece un motivo hélice-vuelta-hélice. Este último está formado por dos hélices α cortas pero bien definidas, que se ensamblan y cierran en la parte superior de la cavidad de unión del ácido graso. En contraposición con la mayoría de las proteínas globulares y compactas, el interior de las FABPs es mayormente hueco y está ocupado por una gran cantidad de moléculas de solvente. De este modo, el núcleo hidrofóbico resulta pequeño y está desplazado del centro de la proteína.

Desde un punto de vista estructural, uno de los miembros más estudiados de esta familia es la proteína de unión a ácidos grasos de intestino de rata (IFABP, Figuras 1.5 y 1.6A). Esta proteína de 131 aminoácidos no contiene residuos Pro ni Cys, simplificando así el mecanismo de plegado, y por lo tanto

minimizando la probabilidad de formación de cuerpos de inclusión [Sacchettini y col., 1990]. Su estructura es la típica de un barril β de esta clase, formado por diez hebras antiparalelas que se ordenan en dos hojas ortogonales de cinco hebras cada una, y se ha resuelto por cristalografía de rayos X tanto en la forma apo (libre de ligando) como en las formas holo (con oleato o palmitato unido) [Sacchettini y col., 1989; Scapin y col., 1992 y 1993]. Además, la estructura en solución de estas formas ha sido resuelta por resonancia magnética nuclear [Hodsdon y Cistola, 1997 y 1997b y Hodsdon y col., 1996]. Se ha visto que el extremo metilo del ácido graso interactúa con cadenas laterales de la región α -helicoidal y que el carboxilato se encuentra enterrado profundamente en el interior de la cavidad interactuando mediante un puente iónico con el grupo guanido del residuo Arg106.

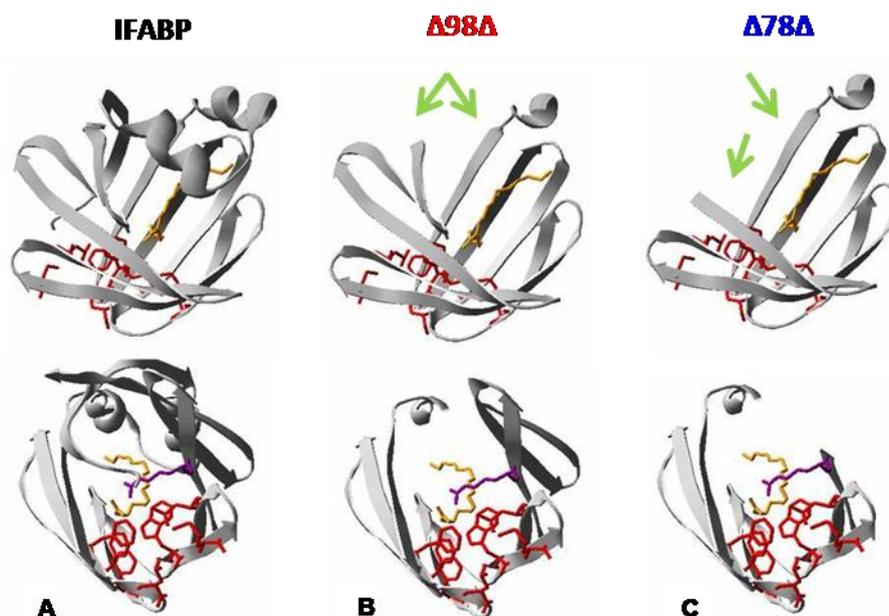


Figura 1.6. Sobre el diagrama de cintas de IFABP (A) se eliminaron los segmentos 1-28 y 127-131 para representar $\Delta 98\Delta$ (B) y los segmentos 1- 28 y 107-131 para el caso de $\Delta 78\Delta$ (C). Cada proteína se muestra en dos orientaciones: vista lateral (panel superior) y vista inferior (panel inferior). El ácido graso se representa en color naranja, los residuos del núcleo hidrofóbico en rojo y la Arg106 en violeta. Con flechas color verde se indica la posible exposición de bordes libre en las variantes abreviadas.

En cuanto al mecanismo de plegado de IFABP, se ha propuesto un modelo jerárquico [Yeh y col., 2001]. Según este esquema, el polipéptido desplegado colapsaría primeramente en una estructura semi-compacta que rodea a un núcleo hidrofóbico que involucra los residuos en Phe47, Phe62, Leu64, Phe68,

Trp82, Met84 y Leu89. A continuación, las hebras β B a β G se propagarían hacia fuera desde el núcleo hidrofóbico de una manera análoga a un engranaje o una cremallera. Aunque estos segmentos no estarían estrechamente ligados, las interacciones son suficientes como para establecer la topología nativa. Por último, esta estructura sirve como base para plegar las tres hebras β restantes (β H- β J), completando así la red de enlaces puente de hidrógeno nativa. Como tal, la constitución de la estructura nativa se fundamenta en la interacción coordinada entre las dos mitades de la proteína. Se ha argumentado que péptidos de IFABP de cualquier mitad de las valvas no formarían por sí mismos una estructura de hoja β [Ropson, resultados no publicados, como se cita en Yeh y col., 2001]. En este escenario, el cierre del barril β sería un paso fundamental para la consolidación de la estructura. Más específicamente, esta región comprende una red de puentes de hidrógeno que involucra residuos de la parte distal de las hebras β A y β J, cada uno de ellos pertenecientes a diferentes hojas β . El giro de la hebra β A es un requisito para alcanzar este objetivo. Esto le permite ponerse en contacto con sus vecinos: el extremo N-terminal hace contacto con β B, mientras que el extremo C-terminal interactúa con β J. Aunque no es la única, ésta representa una estrategia muy utilizada, por proteínas β para evitar la agregación por los bordes [Richardson y Richardson, 2002].

La agregación y consecuente insolubilidad han sido clásicamente fenómenos comunes que se han encontrado habitualmente en el diseño de proteínas β . Sin embargo, éstas se producen y se pliegan exitosamente en la célula. Por el contrario, intentos de diseñar o abreviar motivos β han fracasado al encontrarse con los problemas mencionados de insolubilidad. Por otra parte, se sabe que la acumulación de estructuras β dicta el proceso de génesis amiloide, lo que conduce incluso a especular que la fibra β sería en realidad la estructura más estable para muchos polipéptidos, aún más estable que el propio estado nativo [Dobson, 2004]. En este contexto, el diseño *de novo* de proteínas β ha resultado extremadamente difícil [Pessi y col., 1993; Quinn y col., 1994 y West y col., 1999]. En general, las proteínas β diseñadas *de novo* son rara vez solubles y monoméricas, y con frecuencia han requerido de muchas rondas de rediseño para lograr una construcción exitosa. Colateralmente, varios diseños

originalmente destinados a ser proteínas β han resultado, en cambio, valiosos como modelos para el estudio sobre la formación de fibras amiloides. Un análisis retrospectivo permite evidenciar que la característica amiloidogénica de las hojas β regulares o de los "sandwiches β ", sería la exposición de bordes libres al solvente, situación en la cual tanto los grupos donantes como los aceptores ya están dispuestos para interactuar. Como consecuencia de estas dificultades, no hay muchos ejemplos de intervención en barriles β . En este contexto, el conocimiento disponible acumulado sobre IFABP la hace atractiva como objetivo para realizar sobre ella intervenciones estructurales. La elección apropiada de la estrategia de trabajo podría servir para evaluar el impacto de las modificaciones estructurales sobre la topología, la capacidad de unión a ligandos y la tendencia a la agregación.

Desde hace varios años, en nuestro laboratorio, realizamos estudios biofísicos tendientes a comprender el plegado de éstas proteínas β usando como modelo IFABP. El enfoque utilizado para avanzar en el conocimiento sobre los determinantes estructurales y funcionales claves fue el de abreviar sistemáticamente la proteína madre en la medida en que se obtuvieran construcciones estables y bien plegadas. En lugar de aplicar un procedimiento de diseño "racional" para lograr nuevas formas, hicimos uso de la "selección" natural impuesta por la proteólisis controlada. Ésta herramienta ha sido utilizada para fines tales como el de definir los límites de un dominio por remoción de sus sectores flexibles y desestructurados [Dalzoppo y col., 1985; Darby y col., 1996]. Es sabido que las regiones poco compactas pueden ser removidas aplicando esta técnica, lo que permite el aislamiento del segmento más resistente a la proteólisis que, por ende, sería una entidad proteica estable [Vindigni y col., 1994]. Este enfoque se basa en la descripción de sub-estados conformacionales nativos de IFABP (*apo* y *holo* proteína) con propiedades definidas que resultaron tener diferente susceptibilidad al ataque enzimático [Arighi y col., 2003]. Con esta herramienta en mano, fue posible disecar el barril β constitutivo de esta proteína modelo [Curto y col., 2005; Curto y col., 2009; Franchini y col., 2009].

Para IFABP existe un equilibrio entre al menos dos conformaciones nativas con diferente flexibilidad en el subdominio helicoidal. Estas se corresponden con un

estado abierto y localmente flexible y con otro estado cerrado más rígido. Este último corresponde a *holo*-IFABP, la forma proteica unida al ligando ácido graso. Esta forma es la que mostró la más alta resistencia a la proteólisis y dio origen a $\Delta 98\Delta$, el fragmento límite obtenido tras la digestión de *holo*-IFABP con clostripaína (ArgC) (Figura 1.7).

$\Delta 98\Delta$ fue posteriormente clonada, expresada en *Escherichia coli* y caracterizada estructural y funcionalmente [Curto y col., 2005 y 2009]. Dicha variante resultó ser una forma truncada estable, monomérica y funcional de IFABP. Esta proteína, incluye los 98 aminoácidos correspondientes a la secuencia 29-126 de IFABP (y la adición de una metionina N-terminal) y su peso molecular es de 11 kDa. Por comparación con la proteína de longitud completa, $\Delta 98\Delta$ está desprovista de la hebra βA , la mayor parte del subdominio helicoidal y los últimos cinco aminoácidos pertenecientes a la hebra βJ (Figura 1.6B y 1.7). Este truncamiento lleva a la pérdida de ambos segmentos implicados en el cierre del barril β . A pesar de esto, esta variante retiene un contenido sustancial de hoja β y conserva interacciones terciarias nativas. Las razones de este notable comportamiento podrían estar relacionadas con el papel auxiliar desempeñado por los segmentos eliminados y con la conservación de todos los residuos críticos del núcleo hidrofóbico, es decir, aquellos que participan en el evento de nucleación que conduce al estado plegado. $\Delta 98\Delta$ podría plegarse a través de un esquema jerárquico similar al de IFABP. Este proceso podría conducir a una topología nativa similar a la de la proteína madre con un núcleo compacto análogo, pero dotada de una periferia expandida. Por su propia naturaleza, $\Delta 98\Delta$ podría constituirse en un modelo minimalista, potencialmente capaz de poblar estados intermediarios discretos escasamente representados en el “ensamble” conformacional de la proteína de longitud completa. Por otra parte, a pesar del extenso truncamiento, $\Delta 98\Delta$ retiene la capacidad de unir ácidos grasos aunque con afinidad menor que la que presenta IFABP. Es digno de destacar que $\Delta 98\Delta$ carece de cualquier tendencia a agregar en las condiciones ensayadas. Esto sucede a pesar de la probabilidad de que surjan bordes libres en la construcción (ver flechas verdes en Figura 1.6B).

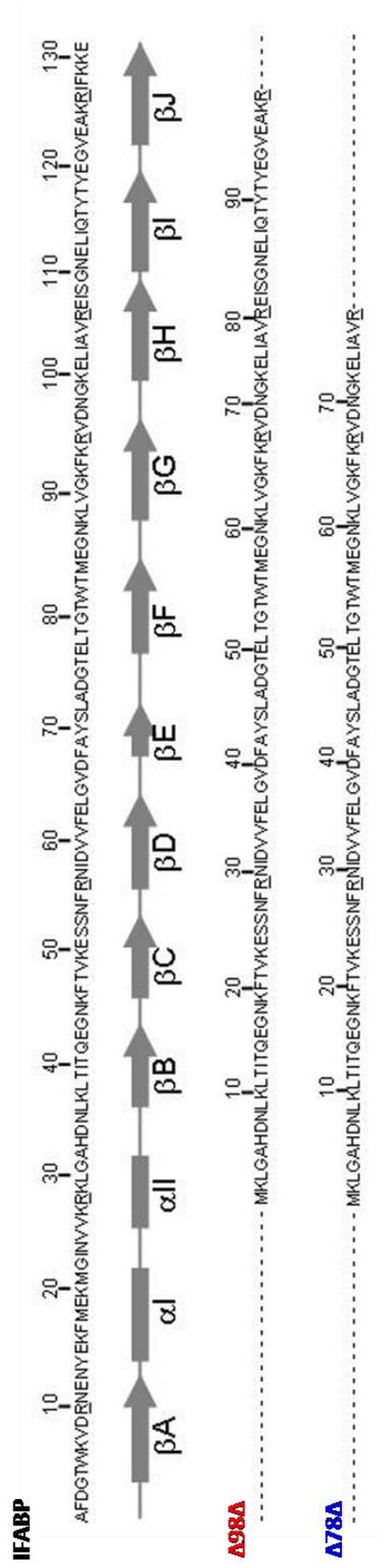


Figura 1.7. Secuencias aminoacídicas de **IFABP**, **Δ 98A** y **Δ 78A**. La representación esquemática de los elementos de estructura secundaria de IFABP se muestra debajo de la secuencia de la proteína de origen. Las letras subrayadas indican los sitios de corte de la enzima Clostripaina.

Del mismo modo, en una segunda ronda de proteólisis, *holo-Δ98Δ* dio origen a un nuevo fragmento límite que fue denominado $\Delta78\Delta$ (Figura 1.6C). Esta nueva construcción de 9 kDa de peso molecular carece de los segmentos 1-28 (al igual que $\Delta98\Delta$) y 107-131 (siendo 20 aminoácidos más corta que $\Delta98\Delta$). Aquí nuevamente, a pesar del truncamiento se conservan todos los residuos pertenecientes al núcleo hidrofóbico de IFABP.

Seguidamente, $\Delta78\Delta$ fue clonada, expresada en *E. coli* y caracterizada estructural y funcionalmente [Franchini y col., 2009]. Diversas técnicas espectroscópicas apoyan el hecho de que $\Delta78\Delta$ adopte una conformación estable y bien plegada aunque algo expandida. La característica más distintiva de $\Delta78\Delta$ es que se obtiene en forma de dímero que preserva la capacidad de unir ácidos grasos. De hecho, la interacción con el ligando provoca una leve pero significativa ganancia en estructura. Se podría especular que los extensos segmentos eliminados en $\Delta78\Delta$ pudieron determinar la aparición de bordes libres en los protómeros que promovieron la dimerización, evitando así la formación de agregados de orden superior (ver flechas verdes en Figura 1.6C).

Contando en nuestro laboratorio con esta familia de proteínas β y sabiendo que todo polipéptido sería plausible de generar fibras, y que estas últimas presentan una organización en hoja β , podríamos suponer que dichas proteínas tendrían una mayor propensión a agregar en forma de fibras por estar formadas mayoritariamente por estructura β . Además, las variantes abreviadas podrían presentar bordes libres y es justamente la evasión de la exposición de dichos bordes la principal estrategia descrita para evitar la agregación. De alguna manera, esta exposición podría estar minimizada en $\Delta78\Delta$, al tratarse de un dímero intrínseco.

Sin embargo, veremos en el transcurso de este trabajo de tesis que sorpresivamente, el comportamiento de estas proteínas -en cuanto se refiere a su tendencia a la agregación- no se corresponde linealmente con las predicciones de la literatura.

EL COSOLVENTE TRIFLUOROETANOL



Figura 1.8. Modelo de espacio lleno (izquierda) y estructura química (derecha) del compuesto 2,2,2 trifluoroetanol.

Sobre la base de lo mencionado previamente, IFABP y sus formas abreviadas emergen como modelos útiles para evaluar comparativamente el papel de distintos determinantes estructurales frente al desafío impuesto por agentes perturbadores de la conformación proteica. De estos estudios surgen lecciones acerca del impacto sobre la topología y la tendencia a la agregación de proteínas todo- β . En este sentido, decidimos desafiar nuestros modelos con 2,2,2 trifluoroetanol (TFE, Figura 1.8). A lo largo de los años, se han descrito propiedades y se les han dado múltiples usos a este alcohol fluorado. A continuación se muestra, a modo de resumen en la Tabla 1.3 (extraída de Buck y col. 1998), las principales aplicaciones como cosolventes del TFE y otros alcoholes.

APLICACIÓN	SISTEMA	PROPÓSITO
Estabilidad conformacional de péptidos	Péptidos de ~5-20 aminoácidos y fragmentos proteicos	Determinar de propensión a formar α -hélices. Determinar estructura por RMN
Mimético de membranas o ambientes de proteínas	Péptidos, fragmentos proteicos y proteínas intactas	Correlacionar con funciones biológicas, comparar con intermediarios de plegado de proteínas, favorecer inserción en membranas.
Solubilización de péptidos y proteínas	Péptidos anfipáticos o hidrofóbicos. y proteínas recombinantes Proteínas con espectros de RMN "pobres" (poca dispersión de desplazamiento químico)	Purificar péptidos, provocar el plegado de proteínas a partir de agregados insolubles, mejorar cinéticas de plegado, prevenir la degradación química, disociar complejos, mejorar propiedades dinámicas.
Modificación de la dinámica interna y la catálisis mediado por proteínas	Enzimas	Mejorar, alterar o anular actividades enzimáticas, generación de cosolventes
Ácidos nucleicos	Duplex de DNA	Provocar transiciones estructurales (de la forma B a la forma A)
Lípidos	Membranas	Modificar la estructura y fluidez de una membrana.
Otras	Péptidos, proteínas y ligandos	Diseñar modificadores de estructura.

Tabla 1.3. Aplicaciones del TFE y otros alcoholes. Adaptada de Buck y col., 1998.

Aunque se conocen desde hace mucho tiempo los efectos del TFE sobre los péptidos y las proteínas, los mecanismos físicos por los cuales éste y otros cosolventes relacionados afectan la conformación de la cadena polipeptídica aún no han sido dilucidados completamente [Buck, 1998]. Se sabe que los cambios conformacionales producidos por TFE dependen no sólo de la concentración del cosolvente sino también de otras condiciones de la solución, de la secuencia de aminoácidos y de la estructura de las proteínas [Buck, 1998].

Con el objetivo de explicar las características particulares de este cosolvente se resume en la Tabla 1.4 (extraída de Chitra y Smith, 2001) las propiedades físicas del TFE por comparación con las del agua y del etanol.

Propiedad	AGUA	ETANOL	TFE	Unidad
Masa	18.02	46.07	100.04	g/mol
Densidad	0.997	0.789	1.383	g/cm ³
Volumen molar	18.07	58.69	72.32	cm ³ /mol
Viscosidad	0.89	1.10	1.78	cp
Coefficiente difusional	2.3	1.1	0.6	10 ⁻⁹ m ² /s
Tensión superficial	72	22	22.2 *	mN/m
Compresibilidad isotérmica	4.63	9.91	10.64	10 ⁻⁵ atm ⁻¹
Coefficiente de expansión térmica	0.256	1.096	1.255	10 ³ K ⁻¹
Calor de vaporización	43.99	42.31	43.97	kJ/mol
Capacidad calorífica	75.35		177.78	J/mol/K
Segundo coeficiente del virial	~1.43	~3.5	~3.4	10 ⁻³ m ³ /mol
pKa	15.3	16.0	12.5	
Momento dipolar (gas)	1.85	1.69		D
Momento dipolar (líquido)	2.6		2.46	D
Constante dieléctrica	78	24	27	
Solvatación del CH ₄	8.4		2.4	kJ/mol

Tabla 1.4. Propiedades del agua, etanol y TFE a 300 K y 1 atm. Adaptada de Chitra y col., 2001

* Obtenido a 298K por Gente y La Mesa, 2000.

Como puede verse en la tabla, el TFE presenta una menor constante dieléctrica con respecto al agua pura, lo que podría debilitar las interacciones hidrofóbicas dentro de la molécula proteica. Al mismo tiempo, este efecto reforzará las interacciones electrostáticas locales (incluidos los puentes de hidrógeno), dentro de los segmentos de estructura secundaria ordenada de las proteínas [Tanford, 1970; Uversky y col., 1997]. La acumulación preferencial de las moléculas de alcohol fluorado alrededor de las superficies de péptidos y proteínas -sugerido por resultados experimentales y de simulación- desplazaría el agua, eliminando uniones puente de hidrógeno alternativas y proporcionando un ambiente con constante dieléctrica baja [Rezaei-Ghaleh y col., 2008].

La presencia del grupo -CF₃ demuestra un carácter hidrofóbico y esto está apoyado por la menor energía libre de solvatación del metano en TFE por comparación con el agua, aunque el proceso de solvatación siga siendo desfavorable. El efecto inductor de los sustituyentes de flúor aumenta la acidez del protón del hidroxilo por comparación con el del etanol, lo que lo hace ser mejor donante de protones o enlaces puente de hidrógeno, pero más pobre

aceptor [Buck, 1998; Llinás y Klein, 1975]. Se ha sugerido que tal interacción preferencial podría conducir a una mayor formación de puentes de hidrógeno intramoleculares [Rajan y Balaram., 1996; Guo y Karplus, 1994]. Además, el TFE interactúa sólo débilmente con residuos no polares, lo que significa que no perturbaría seriamente las interacciones hidrofóbicas del interior proteico. Como consecuencia, TFE promovería una mayor estabilidad en lugar de inducir la desnaturalización [Roccatano y col., 2002].

Resultados obtenidos por Carrotta y col. [2009] muestran que hasta una concentración de ~16 % v/v TFE, la estabilidad de la solución proteica sería controlada principalmente por la repulsión estérica interproteica con una contribución significativa de la solvatación molecular [Carrotta y col., 2009]. Bajas concentraciones de TFE aumentarían la población helicoidal en regiones de la proteína con alta propensión intrínseca a formar estructura secundaria, lo cual indicaría que su efecto no se manifiesta en forma independiente de la secuencia de aminoácidos [Lehrman y col., 1990; Hackl, 2014]. De todos modos, ha sido reportado que el TFE puede favorecer también la formación de hojas β [Carrotta y col., 2009].

Al aumentar aún más la concentración de TFE, la atracción entre las moléculas de proteína básicamente determinada por el efecto hidrofóbico se vuelve prevalente, conduciendo eventualmente a la agregación proteica [Carrotta y col., 2009]. Que el efecto sea más notable en alcoholes sustituidos con flúor se ha atribuido a la formación de conglomerados de moléculas de alcohol en las mezclas de alcohol/agua ("*micelle-like clusters*"), que expondrían a las proteínas a concentraciones locales altas de alcohol [Hong y col., 1999]. El carácter hidrofóbico del grupo $-CF_3$ puede ser el factor responsable de la formación de dichos conglomerados, los cuales se producen cuando la concentración alcanza ~30 % v/v TFE en agua [Hong y col., 1999; Chitra y Smith, 2001]. Es importante destacar que no ocurre separación macroscópica de fases. A concentraciones aún más altas de TFE (>45 % v/v TFE), los conglomerados desaparecen, dando como resultado una solución homogénea [Hong y col., 1999].

PROTEÍNAS INTRÍNSECAMENTE DESORDENADAS

Las proteínas nativamente desplegadas o intrínsecamente desordenadas (IDPs, por sus siglas en inglés “*Intrinsically disordered proteins*”) muestran poca o ninguna estructura secundaria/terciaria estable en su estado funcional [Hackl, 2015]. La segunda mitad del siglo pasado fue testigo del continuo avance de la biología estructural, exaltando la noción general que indica que una estructura definida es prerequisite para cumplir su función [Tompa, 2011]. Actualmente está bien establecido que las IDPs y las regiones intrínsecamente desordenadas dentro de las proteínas (IDRs, por sus siglas en inglés “*Intrinsically disordered regions*”) se distribuyen ampliamente en la naturaleza, e incluso son más comunes en los eucariotas que en el resto de los organismos menos complejos. Más aún, alrededor del 50 % de las proteínas de mamíferos pueden contener en su estructura largas regiones desorganizadas (> 30 residuos), y ~25-30 % pueden ser total, o casi totalmente, desordenadas. En la célula, coexisten proteínas ordenadas y desordenadas que se comportan de manera similar respecto de su estabilidad y tiempos de vida [Hackl, 2015].

La presencia o ausencia de una estructura ordenada está determinada por la secuencia aminoacídica de la proteína. Hoy en día, este concepto está ampliamente aceptado y se utiliza en algoritmos de predicción. La mayoría de las proteínas nativamente desplegadas se caracterizan por la combinación de baja hidrofobicidad (que conduce a una menor fuerza impulsora hacia la compactación) y alta carga neta a pH neutro (que conduce a una fuerte repulsión electrostática) desfavoreciendo la formación de estructura compacta [Uversky y col., 2000]. Se observa incluso una depleción en residuos de carácter hidrofóbico (triptófano, tirosina, fenilalanina y leucina) que, por lo general, están ubicados predominantemente en los motivos de interacción. Estas características de la secuencia desfavorecen la nucleación hidrofóbica y el posterior plegado de la proteína [Hackl, 2015].

Estudios recientes demostraron que la esfera de hidratación de las IDPs es significativamente mayor que la de las proteínas globulares de similar peso molecular. Esto se debe a la falta de estructura compacta en las IDPs y a la presencia de amplias superficies de interacción expuestas [Uversky, 2011].

Según diversos autores, las IDPs cumplirían diferentes funciones, entre las cuales podemos nombrar: actuar como chaperonas, como “cerdas entrópicas” “barriendo” moléculas del espacio, y como receptores basurero [Tompa y Kovacs, 2010]. Numerosas funciones identificables fueron asignadas para ellas, incluyendo el reconocimiento molecular a través de la unión a otras proteínas o a ácidos nucleicos [Uversky, 2011]. La evaluación de la asociación entre una función particular con el nivel de desorden intrínseco en el conjunto de proteínas conocidas que llevan a cabo esa función, mostraron que muchas enfermedades se correlacionan con la presencia de proteínas predichas como desordenadas [Uversky, 2011]. Éstas pueden verse conformacionalmente alteradas y aún presentar ganancia de función aberrante [Briegel y col., 2005]. La explicación se encuentra precisamente en el hecho de estar implicadas en puntos críticos de varias vías de señalización y regulación (*hubs*).

Entre las proteínas desordenadas más ampliamente estudiadas asociadas a enfermedades se encuentran α -sinucleína, p53 y las proteínas asociadas al HPV (por sus siglas en inglés *Human papillomavirus*) [Hackl, 2015]. Debido a la abundancia de las IDPs y las IDRs asociadas con las vías de señalización y las principales enfermedades (enfermedades neurodegenerativas, cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes) es que ha surgido el concepto de D²: “desorden en los trastornos” (“*disorder in disorders*”) [Uversky, 2011]. En contraposición, se ha descrito que IDRs dentro de las proteínas podrían actuar como cerdas entrópicas que barren cierta región espacial e impiden su interacción con otras proteínas inhibiendo, de este modo la agregación o interacciones indeseables.

El funcionamiento biológico de las IDPs implica a menudo una transición hacia una conformación más compacta, que puede ser promovida por la interacción con blancos de unión y/o por cambios en el entorno de la proteína. Al ser extremadamente flexibles, las proteínas desordenadas pueden seguir diferentes vías de plegado en función de un objetivo vinculante, interactuando así con múltiples ligandos fisiológicos relacionados estructuralmente. Muchas proteínas desplegadas muestran un acoplamiento energético estrecho entre unión y plegado. Recientemente se ha demostrado que la flexibilidad estructural de las IDRs puede darles una ventaja funcional adicional al acceder

a sitios de unión ocultos en los blancos de unión. Además, las IDRs podrían ayudar en el proceso de plegado de otras proteínas. Al mismo tiempo se demostró que el paradigma de “acoplamiento de unión y plegado” no es universal dado que algunas IDPs no muestran el fenómeno de unión acoplado a una determinada transición “desordenado a ordenado” [Hackl, 2015].

Un enfoque que ha sido esclarecedor en el estudio de las IDPs y las IDRs ha sido el uso de predictores de desorden. Utilizando colecciones de IDPs y IDRs, se han elaborado predictores que, a partir de una secuencia conocida de aminoácidos, reconocen “orden” o “desorden” [He y col., 2009]. Hasta la fecha, se han desarrollado más de 50 predictores de esta clase. Para nuestro trabajo hemos hecho uso de tres algoritmos de la clase PONDR (*Predictors of Natural Disordered Regions*). PONDR incluye, a su vez, varios procedimientos que predicen regiones desordenadas con diferente longitud y en cualquier lugar de una secuencia [Xue y col., 2010].

BIBLIOGRAFÍA

- Anfinsen, C. B. (1973). *Principles that govern the protein folding chains*. *Science*, 181, 233-230.
- Agashe, V. R., Shastry, M. C. R., y Udgaonkar, J. B. (1995). *Initial hydrophobic collapse in the folding of barstar*. *Nature*, 377(6551), 754-757.
- Arighi, C. N., Rossi, J. P. F., y Delfino, J. M. (2003). *Temperature-induced conformational switch in intestinal fatty acid binding protein (IFABP) revealing an alternative mode for ligand binding*. *Biochemistry*, 42(24), 7539-7551.
- Baldwin, A. J., Knowles, T. P., Tartaglia, G. G., Fitzpatrick, A. W., Devlin, G. L., Shammass, S. L., ... y Christodoulou, J. (2011). *Metastability of native proteins and the phenomenon of amyloid formation*. *Journal of the American Chemical Society*, 133(36), 14160-14163.
- Banaszak, L., Winter, N., Xu, Z., Bernlohr, D. A., Cowan, S., y Jones, T. A. (1994). *Lipid-binding proteins: a family of fatty acid and retinoid transport proteins*. *Adv Protein Chem*, 45(45), 89-151.
- Booth, D. R., M. Sunde, V. Bellotti, C. V. Robinson, W. L. Hutchinson, P. E. Fraser, P. E., Hawkins, P. N., Dobson, C. M., Radford, S. E., Blaket, C. C., y Pepys, M. B. (1997). *Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis*.
- Bousset, L., Thomson, N. H., Radford, S. E., y Melki, R. (2002). *The yeast prion Ure2p retains its native α -helical conformation upon assembly into protein fibrils in vitro*. *The EMBO journal*, 21(12), 2903-2911.
- Branden, C. I. y Tooze J. E. (1999) *Introduction to protein structure*. Garland Publishing, NY, USA.
- Briegel, K. J., Baldwin, H. S., Epstein, J. A., y Joyner, A. L. (2005). *Congenital heart disease reminiscent of partial trisomy 2p syndrome in mice transgenic for the transcription factor Lbh*. *Development*, 132(14), 3305-3316.
- Bryngelson, J. D., Onuchic, J. N., Soccj, N. D., y Wolynes, P. G. (1995). *Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: a synthesis*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 21(3), 167-195.
- Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., ... y Stefani, M. (2002). *Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases*. *Nature*, 416(6880), 507-511.
- Buck, M. (1998). *Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins*. *Quarterly reviews of biophysics*, 31(03), 297-355.
- Calamai, M., Chiti, F., y Dobson, C. M. (2005). *Amyloid fibril formation can proceed from different conformations of a partially unfolded protein*. *Biophysical journal*, 89(6), 4201-4210.
- Carrotta, R., Manno, M., Giordano, F. M., Longo, A., Portale, G., Martorana, V., y San Biagio, P. L. (2009). *Protein stability modulated by a conformational effector: effects of trifluoroethanol on bovine serum albumin*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 11(20), 4007-4018.
- Caughey, B., y Lansbury Jr, P. T. (2003). *Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: Separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders**. *Annual review of neuroscience*, 26(1), 267-298.
- Chen, B., Retzlaff, M., Roos, T., y Frydman, J. (2011). *Cellular strategies of protein quality control. Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(8), a004374.
- Chiti, F., y Dobson, C. M. (2006). *Protein misfolding, functional amyloid, and human disease*. *Annu. Rev. Biochem.*, 75, 333-366.
- Chiti, F., Taddei, N., Bucciantini, M., White, P., Ramponi, G., y Dobson, C. M. (2000). *Mutational analysis of the propensity for amyloid formation by a globular protein*. *The EMBO journal*, 19(7), 1441-1449.

- Chiti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stefani, M., Ramponi, G., y Dobson, C. M. (1999). Designing conditions for *in vitro* formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(7), 3590-3594.
- Chitra, R., y Smith, P. E. (2001). Properties of 2, 2, 2-trifluoroethanol and water mixtures. *The Journal of Chemical Physics*, 114(1), 426-435.
- Cohen, S. I., Vendruscolo, M., Welland, M. E., Dobson, C. M., Terentjev, E. M., y Knowles, T. P. (2011). Nucleated polymerization with secondary pathways. I. Time evolution of the principal moments. *The Journal of chemical physics*, 135(6), 08B615.
- Curto, L. M., Angelani, C. R., y Delfino, J. M. (2015). Intervening in the β -barrel structure of lipid binding proteins: Consequences on folding, ligand-binding and aggregation propensity. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 93, 37-43.
- Curto, L. M., Caramelo, J. J., Franchini, G. R., y Delfino, J. M. (2009). $\Delta 98\Delta$, a minimalist model of antiparallel β -sheet proteins based on intestinal fatty acid binding protein. *Protein Science*, 18(4), 735-746.
- Curto, L. M., Caramelo, J. J., y Delfino, J. M. (2005). $\Delta 98\Delta$, a functional all- β -sheet abridged form of intestinal fatty acid binding protein. *Biochemistry*, 44(42), 13847-13857.
- Dalzoppo, D., Vita, C., y Fontana, A. (1985). Folding of thermolysin fragments: Identification of the minimum size of a carboxyl-terminal fragment that can fold into a stable native-like structure. *Journal of molecular biology*, 182(2), 331-340.
- Darby, N. J., Kemmink, J., & Creighton, T. E. (1996). Identifying and characterizing a structural domain of protein disulfide isomerase. *Biochemistry*, 35(32), 10517-10528.
- De Berti, F. P., Capaldi, S., Ferreyra, R., Burgardt, N., Acierno, J. P., Klinke, S., ... y Ermácora, M. R. (2013). The crystal structure of sterol carrier protein 2 from *Yarrowia lipolytica* and the evolutionary conservation of a large, non-specific lipid-binding cavity. *Journal of structural and functional genomics*, 14(4), 145-153.
- De Felice, F. G., Vieira, M. N., Meirelles, M. N. L., Morozova-Roche, L. A., Dobson, C. M., y Ferreira, S. T. (2004). Formation of amyloid aggregates from human lysozyme and its disease-associated variants using hydrostatic pressure. *The FASEB journal*, 18(10), 1099-1101.
- De la Paz, M. L., y Serrano, L. (2004). Sequence determinants of amyloid fibril formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(1), 87-92.
- Dobson, C. M. (2006). The generic nature of protein folding and misfolding. In *Protein Misfolding, Aggregation, and Conformational Diseases* (pp. 21-41). Springer US.
- Dobson, C. M. (2004) Principles of protein folding, misfolding and aggregation. In *Seminars in cell y developmental biology* (Vol. 15, No. 1, pp. 3-16). Academic Press.
- Dobson, C. M. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature*, 426(6968), 884-890.
- Dobson, C. M. (2001). The structural basis of protein folding and its links with human disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 356(1406), 133-145.
- Eakin, C. M., Attenello, F. J., Morgan, C. J., y Miranker, A. D. (2004). Oligomeric assembly of native-like precursors precedes amyloid formation by β -2 microglobulin. *Biochemistry*, 43(24), 7808-7815.
- Ferrone, F. A., Hofrichter, J., y Eaton, W. A. (1985). Kinetics of sickle hemoglobin polymerization: II. A double nucleation mechanism. *Journal of molecular biology*, 183(4), 611-631.
- Franchini, G. R., Curto, L. M., Caramelo, J. J., y Delfino, J.M. (2009). Dissection of a β -barrel motif leads to a functional dimer: The case of the intestinal fatty acid binding protein. *Protein Science*, 18(12), 2592-2602.
- Fink, A. L. (1998) Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Folding and design*, 3(1), R9-R23.

- Glatz, J. F. (2015). *Lipids and lipid binding proteins: A perfect match. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 93, 45-49.
- Guo, H., y Karplus, M. (1994). *Solvent influence on the stability of the peptide hydrogen bond: a supramolecular cooperative effect. The Journal of Physical Chemistry*, 98(29), 7104-7105.
- Gente, G., y La Mesa, C. (2000). *Water—Trifluoroethanol Mixtures: Some Physicochemical Properties. Journal of solution chemistry*, 29(11), 1159-1172.
- Guijarro, J. I., Sunde, M., Jones, J. A., Campbell, I. D., y Dobson, C. M. (1998). *Amyloid fibril formation by an SH3 domain. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(8), 4224-4228.
- Haass, C., y Selkoe, D. J. (2007). *Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. Nature reviews Molecular cell biology*, 8(2), 101-112.
- Hackl, E. V. (2015). *Effect of Temperature on the Conformation of Natively Unfolded Protein 4E-BP1 in Aqueous and Mixed Solutions Containing Trifluoroethanol and Hexafluoroisopropanol. The protein journal*, 34(1), 18-28.
- Hackl, E. V. (2014). *Limited proteolysis of natively unfolded protein 4E-BP1 in the presence of trifluoroethanol. Biopolymers*, 101(6), 591-602.
- Hartl, F. U., y Hayer-Hartl, M. (2009). *Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. Nature structural y molecular biology*, 16(6), 574-581.
- Harrison, S. C., y Durbin, R. (1985). *Is there a single pathway for the folding of a polypeptide chain?. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(12), 4028-4030.
- Haurerland, N. H., y Spener, F. (2004). *Fatty acid-binding proteins—insights from genetic manipulations. Progress in lipid research*, 43(4), 328-349.
- He, B., Wang, K., Liu, Y., Xue, B., Uversky, V. N., y Dunker, A. K. (2009). *Predicting intrinsic disorder in proteins: an overview. Cell research*, 19(8), 929-949.
- Hertzel, A. V., y Bernlohr, D. A. (2000). *The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. Trends in Endocrinology y Metabolism*, 11(5), 175-180.
- Hurle, M. R., Helms, L. R., Li, L. I. N., Chan, W., y Wetzel, R. (1994). *A role for destabilizing amino acid replacements in light-chain amyloidosis. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(12), 5446-5450.
- Hodsdon, M. E., y Cistola, D. P. (1997a). *Ligand binding alters the backbone mobility of intestinal fatty acid-binding protein as monitored by ^{15}N NMR relaxation and ^1H exchange. Biochemistry*, 36(8), 2278-2290.
- Hodsdon, M. E., y Cistola, D. P. (1997b). *Discrete backbone disorder in the nuclear magnetic resonance structure of apo intestinal fatty acid-binding protein: implications for the mechanism of ligand entry. Biochemistry*, 36(6), 1450-1460.
- Hodsdon, M. E., Ponder, J. W., y Cistola, D. P. (1996). *The NMR solution structure of intestinal fatty acid-binding protein complexed with palmitate: application of a novel distance geometry algorithm. Journal of molecular biology*, 264(3), 585-602.
- Hong, D. P., Hoshino, M., Kuboi, R., y Goto, Y. (1999). *Clustering of fluorine-substituted alcohols as a factor responsible for their marked effects on proteins and peptides. Journal of the American Chemical Society*, 121(37), 8427-8433.
- Hurle, M. R., Helms, L. R., Li, L. I. N., Chan, W., y Wetzel, R. (1994). *A role for destabilizing amino acid replacements in light-chain amyloidosis. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(12), 5446-5450.
- Itzhaki, L. S., Otzen, D. E., y Fersht, A. R. (1995). *The structure of the transition state for folding of chymotrypsin inhibitor 2 analysed by protein engineering methods: evidence for a nucleation-condensation mechanism for protein folding. Journal of molecular biology*, 254(2), 260-288.

Jahn, T. R., y Radford, S. E. (2008). Folding versus aggregation: polypeptide conformations on competing pathways. *Archives of biochemistry and biophysics*, 469(1), 100-117.

Kajava, A. V., Baxa, U., Wickner, R. B., y Steven, A. C. (2004). A model for Ure2p prion filaments and other amyloids: the parallel superpleated β -structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(21), 7885-7890.

Karplus, M., y Weaver, D. L. (1994). Protein folding dynamics: The diffusion-collision model and experimental data. *Protein Science*, 3(4), 650-668.

Kennedy, M. (2000). The nematode polyprotein allergens/antigens. *Parasitology Today*, 16(9), 373-380.

Khurana, R., Gillespie, J. R., Talapatra, A., Minert, L. J., Ionescu-Zanetti, C., Millett, I., y Fink, A. L. (2001). Partially folded intermediates as critical precursors of light chain amyloid fibrils and amorphous aggregates. *Biochemistry*, 40(12), 3525-3535.

Knowles, T. P., Waudby, C. A., Devlin, G. L., Cohen, S. I., Aguzzi, A., Vendruscolo, M., ... y Dobson, C. M. (2009). An analytical solution to the kinetics of breakable filament assembly. *Science*, 326(5959), 1533-1537.

Konno, T., Murata, K., y Nagayama, K. (1999). Amyloid-like aggregates of a plant protein: a case of a sweet-tasting protein, monellin. *FEBS letters*, 454(1), 122-126.

Kragelund, B. B., Knudsen, J., y Poulsen, F. M. (1999). Acyl-coenzyme A binding protein (ACBP). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1441(2), 150-161.

Krebs, M. R., Wilkins, D. K., Chung, E. W., Pitkeathly, M. C., Chamberlain, A. K., Zurdo, J., ... y Dobson, C. M. (2000). Formation and seeding of amyloid fibrils from wild-type hen lysozyme and a peptide fragment from the β -domain. *Journal of molecular biology*, 300(3), 541-549.

Kumar, S., y Walter, J. (2011). Phosphorylation of amyloid beta (A β) peptides—A trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease. *Aging (Albany NY)*, 3(8), 803.

Kuzin A.P., Chen Y., Jayaraman S., Chen C. X., Fang Y., ... y Tong L., Three-dimensional structure of the phospholipid-binding protein from *Ralstonia solanacearum* Q8XV73_RALSQ in complex with a phospholipid at the resolution 1.53 Å, Resultados no publicados

Lansbury, P. T., y Lashuel, H. A. (2006). A century-old debate on protein aggregation and neurodegeneration enters the clinic. *Nature*, 443(7113), 774-779.

Lehrman, S. R., Tuls, J. L. y Lund, M. (1990). Peptide. alpha-helicity in aqueous trifluoroethanol: correlations with predicted. alpha-helicity and the secondary structure of the corresponding regions of bovine growth hormone. *Biochemistry*, 29(23), 5590-5596.

Lee, A. S., Galea, C., DiGiammarino, E. L., Jun, B., Murti, G., Ribeiro, R. C., ... y Kriwacki, R. W. (2003). Reversible amyloid formation by the p53 tetramerization domain and a cancer-associated mutant. *Journal of molecular biology*, 327(3), 699-709.

Leopold, P. E., Montal, M., y Onuchic, J. N. (1992). Protein folding funnels: a kinetic approach to the sequence-structure relationship. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(18), 8721-8725.

Levinthal, C. (1969). How to fold graciously. *Mossbauer spectroscopy in biological systems*, 67, 22-24.

McCutchen, S. L., Lai, Z., Miroy, G. J., Kelly, J. W., y Colon, W. (1995). Comparison of lethal and nonlethal transthyretin variants and their relationship to amyloid disease. *Biochemistry*, 34(41), 13527-13536.

Mitraki, A. (2010). Protein aggregation: from inclusion bodies to amyloid and biomaterials. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 79, 89-125.

Moraitakis, G., y Goodfellow, J. M. (2003). Simulations of human lysozyme: probing the conformations triggering amyloidosis. *Biophysical journal*, 84(4), 2149-2158.

Nelson, D. L., Lehninger, A. L., y Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. W. H. Freeman, NY, USA.

- Niraula, T. N., Haraoka, K., Ando, Y., Li, H., Yamada, H., y Akasaka, K. (2002). Decreased thermodynamic stability as a crucial factor for familial amyloidotic polyneuropathy. *Journal of molecular biology*, 320(2), 333-342.
- Onuchic, J. N., Luthey-Schulten, Z., y Wolynes, P. G. (1997). Theory of protein folding: the energy landscape perspective. *Annual review of physical chemistry*, 48(1), 545-600.
- Pessi, A., Bianchi, E., Cramer, A., Venturini, S., Tramontano, A., y Sollazzo, M. (1993). A designed metal-binding protein with a novel fold.
- Plakoutsi, G., Taddei, N., Stefani, M., y Chiti, F. (2004). Aggregation of the Acylphosphatase from *Sulfolobus solfataricus*: The folded and partially unfolded states can both be precursors for amyloid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 279(14), 14111-14119.
- Qiang, W., Yau, W. M., Luo, Y., Mattson, M. P., y Tycko, R. (2012). Antiparallel β -sheet architecture in lowa-mutant β -amyloid fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(12), 4443-4448.
- Quinn, T. P., Tweedy, N. B., Williams, R. W., Richardson, J. S., y Richardson, D. C. (1994). Betadoublet: de novo design, synthesis, and characterization of a beta-sandwich protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(19), 8747-8751.
- Rajan, R., y Balaram, P. (1996). A model for the interaction of trifluoroethanol with peptides and proteins. *International journal of peptide and protein research*, 48(4), 328-336.
- Rezaei-Ghaleh, N., Amininasab, M., y Nemat-Gorgani, M. (2008). Conformational changes of α -chymotrypsin in a fibrillation-promoting condition: a molecular dynamics study. *Biophysical journal*, 95(9), 4139-4147.
- Richardson, J. S., y Richardson, D. C. (2002). Natural β -sheet proteins use negative design to avoid edge-to-edge aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(5), 2754-2759.
- Roccatano, D., Colombo, G., Fioroni, M., y Mark, A. E. (2002). Mechanism by which 2, 2, 2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: a molecular dynamics study. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(19), 12179-12184.
- Rochet, J. C., y Lansbury, P. T. (2000). Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. *Current opinion in structural biology*, 10(1), 60-68.
- Rosenberg, A. S. (2006). Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. *The AAPS journal*, 8(3), E501-E507.
- Sacchettini, J. C., Banaszak, L. J., y Gordon, J. I. (1990). Expression of rat intestinal fatty acid binding protein in *E. coli* and its subsequent structural analysis: a model system for studying the molecular details of fatty acid-protein interaction. *Molecular and cellular biochemistry*, 98(1-2), 81-93.
- Sacchettini, J. C., Gordon, J. I., y Banaszak, L. J. (1989). Crystal structure of rat intestinal fatty-acid-binding protein: Refinement and analysis of the *Escherichia coli*-derived protein with bound palmitate. *Journal of molecular biology*, 208(2), 327-339.
- Saelices, L., Johnson, L. M., Liang, W. Y., Sawaya, M. R., Cascio, D., Ruchala, P., ... y Eisenberg, D. S. (2015). Uncovering the mechanism of aggregation of human transthyretin. *Journal of Biological Chemistry*, 290(48), 28932-28943.
- Scapin, G., Young, A. C., Kromminga, A., Veerkamp, J. H., Gordon, J. I., y Sacchettini, J. C. (1993). High resolution X-ray studies of mammalian intestinal and muscle fatty acid-binding proteins provide an opportunity for defining the chemical nature of fatty acid: protein interactions. In *Cellular Fatty Acid-Binding Proteins II* (pp. 3-13). Springer US.
- Scapin, G., Gordon, J. I., y Sacchettini, J. C. (1992). Refinement of the structure of recombinant rat intestinal fatty acid-binding apoprotein at 1.2-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 267(6), 4253-4269.
- Sgarbossa, A. (2012). Natural biomolecules and protein aggregation: emerging strategies against amyloidogenesis. *International journal of molecular sciences*, 13(12), 17121-17137.

Solovyova, A. S., Meenan, N., McDermott, L., Garofalo, A., Bradley, J. E., Kennedy, M. W., y Byron, O. (2003). The polyprotein and FAR lipid binding proteins of nematodes: shape and monomer/dimer states in ligand-free and bound forms. *European Biophysics Journal*, 32(5), 465-476.

Stefani, M. (2012). Structural features and cytotoxicity of amyloid oligomers: implications in Alzheimer's disease and other diseases with amyloid deposits. *Progress in neurobiology*, 99(3), 226-245.

Stefani, M. (2008). Protein folding and misfolding on surfaces. *International journal of molecular sciences*, 9(12), 2515-2542.

Stefani, M. (2003). What the use of disease-unrelated model proteins can tell us about the molecular basis of amyloid aggregation and toxicity. *The Italian journal of biochemistry*, 52(4), 162-176.

Stefani, M., y Dobson, C. M. (2003). Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *Journal of molecular medicine*, 81(11), 678-699.

Storch, J., y Thumser, A. E. (2010). Tissue-specific functions in the fatty acid-binding protein family. *Journal of Biological Chemistry*, 285(43), 32679-32683.

Tanford, C. (1970). Protein denaturation. Part C. Theoretical models for the mechanism of denaturation. *Advances in protein chemistry*. 24, 1 - 95.

Tomba, P. (2011). Unstructural biology coming of age. *Current opinion in structural biology*, 21(3), 419-425.

Tomba, P., y Kovacs, D. (2010). Intrinsically disordered chaperones in plants and animals. *Biochemistry and Cell Biology*, 88(2), 167-174.

Ventura, S. y Villaverde, A. (2006). Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends Biotechnol.* 24(4):179-85.

Villegas, V., Zurdo, J., Filimonov, V. V., Avilés, F. X., Dobson, C. M., y Serrano, L. (2000). Protein engineering as a strategy to avoid formation of amyloid fibrils. *Protein Science*, 9(09), 1700-1708.

Vindigni, A., Filippis, V., Zanotti, G., Visco, C., Orsini, G., y Fontana, A. (1994). Probing the structure of hirudin from *Hirudinaria manillensis* by limited proteolysis. *European Journal of Biochemistry*, 226(2), 323-333.

Uversky, V. N. (2011). Intrinsically disordered proteins from A to Z. *The international journal of biochemistry Y cell biology*, 43(8), 1090-1103.

Uversky, V. N., y Fink, A. L. (2004). Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1698(2), 131-153.

Uversky, V. N., Gillespie, J. R., y Fink, A. L. (2000). Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions?. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 41(3), 415-427.

Uversky, V. N., Narizhneva, N. V., Kirschstein, S. O., Winter, S., y Löber, G. (1997). Conformational transitions provoked by organic solvents in β -lactoglobulin: can a molten globule like intermediate be induced by the decrease in dielectric constant?. *Folding and design*, 2(3), 163-172.

Wales, D. (2003). *Energy landscapes: Applications to clusters, biomolecules and glasses*. Cambridge University Press.

Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., ... y Selkoe, D. J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, 416(6880), 535-539.

West, M. W., Wang, W., Patterson, J., Mancias, J. D., Beasley, J. R., y Hecht, M. H. (1999). De novo amyloid proteins from designed combinatorial libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(20), 11211-11216.

Xue, B., Dunbrack, R. L., Williams, R. W., Dunker, A. K., y Uversky, V. N. (2010). POND-R-FIT: a meta-predictor of intrinsically disordered amino acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1804(4), 996-1010.

Yeh, S. R., Ropson, I. J., y Rousseau, D. L. (2001). Hierarchical folding of intestinal fatty acid binding protein. *Biochemistry*, 40(14), 4205-4210.

Yon, J. M. (2002). Protein folding in the post-genomic era. *Journal of cellular and molecular medicine*, 6(3), 307-327.

Zurdo, J., Guijarro, J. I., Jiménez, J. L., Saibil, H. R., y Dobson, C. M. (2001). Dependence on solution conditions of aggregation and amyloid formation by an SH3 domain. *Journal of molecular biology*, 311(2), 325-340

OBJETIVOS

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

El **objetivo último** más general de nuestra investigación es aportar información básica relevante para la comprensión de los procesos involucrados en la generación y/o en la prevención de la formación de las fibras amiloides.

Para alcanzar este objetivo nos valemos de modelos estructurales de proteínas todo- β desarrollados en nuestro laboratorio. A partir de la proteína que une ácidos grasos de intestino de rata (IFABP) y con el fin de localizar los determinantes mínimos de plegado y funcionalidad del barril β , se produjeron las variantes abreviadas $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$. Vale recordar que la estrategia seguida para su obtención no fue la del diseño racional, sino que se hizo uso de una herramienta “natural”, como es la fragmentación con proteasas. Posteriormente, éstas formas abreviadas estables y bien plegadas fueron clonadas y expresadas en forma recombinante. Dichas proteínas, que comparten sectores centrales de la secuencia aminoacídica, cuentan con características estructurales diferenciadas que se resumen a continuación:

IFABP es monomérica y compacta ($\Delta G^{\circ}_{H_2O} = 5.61 \pm 0.56$ kcal. mol⁻¹, Curto y col., 2005 y 2009),

$\Delta 98\Delta$ es naturalmente monomérica y expandida ($\Delta G^{\circ}_{H_2O} = 3.27 \pm 1.29$ kcal. mol⁻¹; Curto y col., 2005 y 2009) y

$\Delta 78\Delta$ es dimérica y también expandida ($\Delta G^{\circ}_{H_2O} = 3.19 \pm 0.43$ kcal. mol⁻¹; Franchini y col., 2009).

Este sistema de estudio nos permite desafiar algunas de las hipótesis establecidas en el área de la agregación proteica, y comprobar la validez general de premisas establecidas en el contexto de proteínas todo- β . Analizaremos cómo influyen factores tales como la estabilidad conformacional y la presencia de segmentos particulares de la estructura primaria sobre la tendencia a la agregación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las variantes abreviadas de IFABP comparten sectores de una secuencia aminoacídica común (Figura 1.7). Los estudios conformacionales previos sobre estas proteínas en solución indican que las mismas conservarían intacto el núcleo hidrofóbico pequeño y desplazado de IFABP (Figura 1.6). Al haber perdido los segmentos N- y C-terminales involucrados en el cierre del barril β , la periferia presentaría mayor movilidad que la propia de la proteína madre. Es esta flexibilidad incrementada la que conduce a que ambas variantes abreviadas estén expandidas, es decir, presenten un radio mayor al predicho para una proteína globular compacta del mismo peso molecular. Adicionalmente, la variante $\Delta 78\Delta$ cambió su organización cuaternaria, obteniéndose naturalmente como un dímero. Podría especularse que esto sucedería para “ocultar” el área hidrofóbica expuesta del interior de la cavidad y/o para lograr resolver la potencial mayor exposición de bordes β libres. A pesar de la disminución de la estabilidad, ambas variantes abreviadas resultan solubles y no presentan tendencia espontánea a la agregación.

Nuestra propuesta apunta al estudio sistemático de la estabilidad y la tendencia amiloidogénica de IFABP, $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$, y a la comprensión más acabada de la estructura de estas variantes. Así, se investigará en detalle el mecanismo cinético del proceso de agregación inducido por 2,2,2 trifluoroetanol (TFE) y las características morfológicas de los agregados y, se discutirá el papel de los determinantes estructurales que previenen o inducen la agregación proteica.

Por efectividad y ventajas metodológicas, el cosolvente TFE se eligió como agente perturbador del estado nativo. Como principal parámetro experimental se evaluará el impacto de diferentes concentraciones de dicho agente sobre la conformación y sobre la propensión a la agregación de las tres proteínas β (IFABP, $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$).

- Inicialmente se ensayará un rango amplio de concentraciones a fin de:
 - determinar la presencia/ausencia de agregación manifiesta a cada concentración de TFE.
 - analizar globalmente el impacto de distintas concentraciones de TFE sobre la estructura tridimensional mediante espectroscopías (CD y fluorescencia).
 - evaluar la reversibilidad del proceso de agregación y/o de los cambios conformacionales asociados.

- Luego, se focalizarán los estudios sobre aquellas concentración(es) que conduzca(n) a la agregación:
 - se examinarán las características morfológicas de los agregados que se obtuvieren (mediante tinciones y microscopías visible y electrónicas).
 - se estudiará el proceso de agregación desde el punto de vista cinético con el objetivo de plantear un modelo que lo describa.
 - se complementará la información experimental con la obtenida por predicción computacional.

- Seguidamente se investigará el impacto del agregado de TFE a concentraciones menores que aquellas necesarias para disparar la agregación. De este modo podrá evaluarse si existieren alteraciones conformacionales precedentes al fenómeno de agregación:
 - se evaluará por técnicas espectroscópicas (CD y fluorescencia) el cambio en estructura secundaria y terciaria. Se complementará el estudio conformacional con información derivada de mediciones de NMR en ausencia y presencia de co-solvente.
 - se determinará la estabilidad de cada una de las tres proteínas a distintas concentraciones de TFE.
 - se realizarán otros ensayos bioquímicos y biofísicos que nos permitirán la evaluación comparativa de las estructuras proteicas en cada

condición. Entre otros, se probará la resistencia diferencial a la proteólisis; el cambio en el tamaño en solución mediante dispersión de la luz (LS, por sus siglas en inglés, *light-scattering*), la modificación en su capacidad de unión de ácidos grasos, etc.

- nuevamente, aquí se complementará la información experimental con la obtenida por predicción computacional.

- Por último se extenderán estos estudios a los eventos tempranos que ocurran tras el agregado de TFE por las técnicas espectroscópicas, básicamente por CD y fluorescencia.

- En todos los casos, la información obtenida para cada proteína será comparada entre sí a fin de permitir concluir acerca de los determinantes estructurales que conduzcan o eviten la agregación.

BIBLIOGRAFÍA

Curto, L. M., Caramelo, J. J., Franchini, G. R., y Delfino, J. M. (2009). $\Delta 98\Delta$, a minimalist model of antiparallel β -sheet proteins based on intestinal fatty acid binding protein. *Protein Science*, 18(4), 735-746.

Curto, L. M., Caramelo, J. J., y Delfino, J. M. (2005). $\Delta 98\Delta$, a functional all- β -sheet abridged form of intestinal fatty acid binding protein. *Biochemistry*, 44(42), 13847-13857.

Franchini, G. R., Curto, L. M., Caramelo, J. J., y Delfino, J.M. (2009). Dissection of a β -barrel motif leads to a functional dimer: The case of the intestinal fatty acid binding protein. *Protein Science*, 18(12), 2592-2602.

MATERIALES
Y
MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Expresión proteica

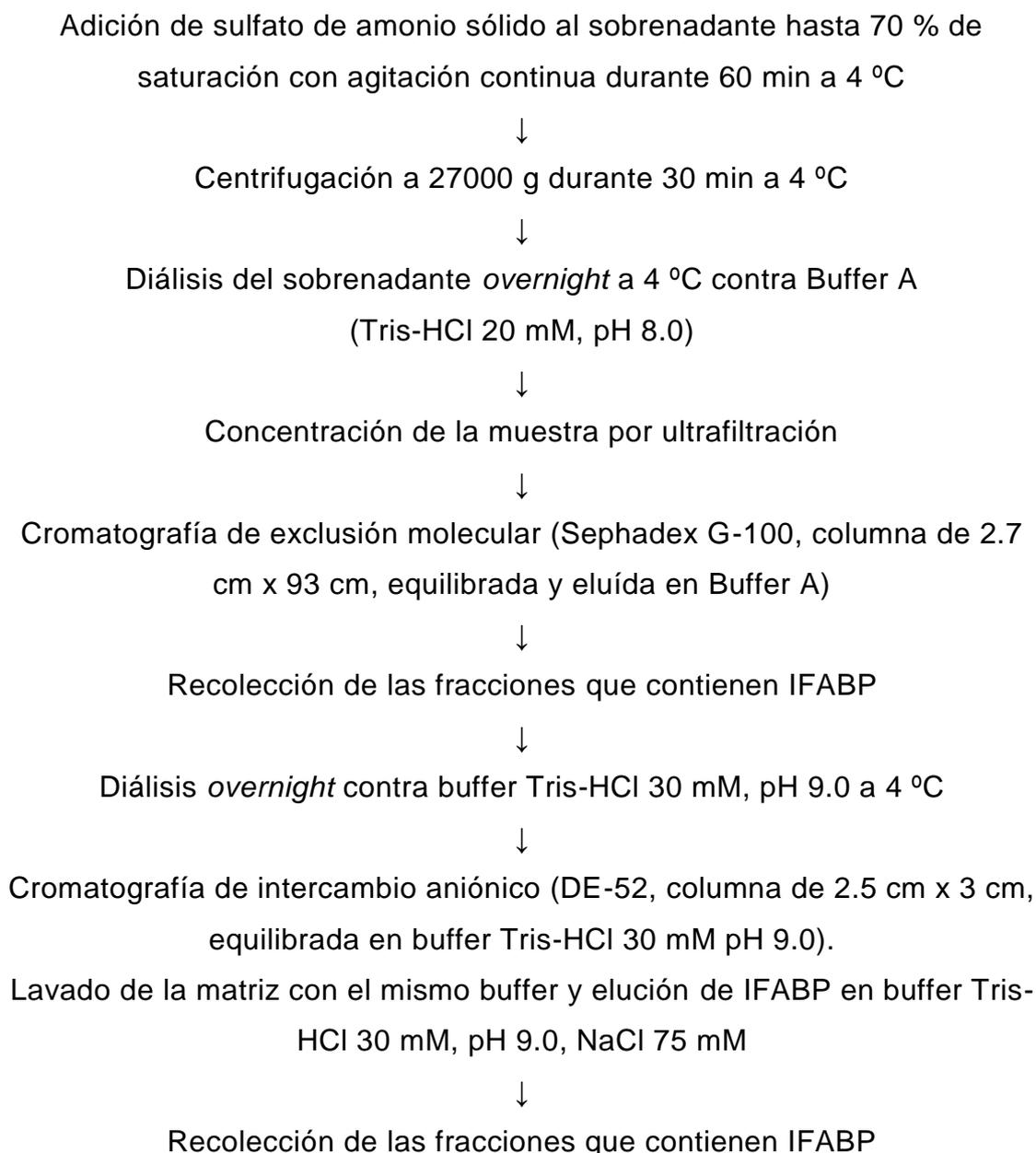
Para lograr la expresión de IFABP de rata se utilizó el plásmido pET11a (cedido por A. Kleinfeld, La Jolla, California, USA) y como huésped para este sistema de expresión, se utilizó la cepa de *Escherichia coli* BL21(DE3). El fragmento recombinante $\Delta 98\Delta$ fue clonado por PCR usando cebadores (*primers*) 5'-GGAATTCCATATGAAGCTTGGAGCTCATG-3' y 5'-CGCGGATCCTCACCGCTTGGCCTCCACTCCTTCGTACGTG-3'. Para el fragmento recombinante $\Delta 78\Delta$ se usaron los *primers* 5'-GGAATTCCATATGAAGCTTGGAGCTCATG-3' y 5'-CGCGGATCCTCATCGGACAGCAATCAGC-3'. Ambos productos de las clonaciones fueron digeridos con las enzimas NdeI y BamHI, y clonado en el vector pET-22b(+). En estos dos casos, se utilizó la cepa de *Escherichia coli* BL26.

La primera etapa de la producción es común a las tres proteínas. Se cultivan bacterias pertenecientes a una colonia transformada en medio LB-ampicilina ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) con agitación constante. Cuando la densidad óptica a 600 nm del cultivo alcanza ~ 0.8 , se induce la expresión con IPTG (0.4-1 mM) durante 150-180 min. Al cabo, se centrifugan las células a 5000 g durante 10 min a 4 °C. Las bacterias contenidas en el *pellet* se pesan y guardan a -20 °C. Al día siguiente, las células se lisan por ultrasonido. La pasta celular se descongela y se resuspende en el mínimo volumen de buffer Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 100 mM, EDTA 2 mM. Finalmente, se centrifuga a 27000 g durante 60 min a 4 °C. El sobrenadante fresco es el material de partida para la purificación de IFABP. En cambio, para $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$ se usa el *pellet* celular que contiene los cuerpos de inclusión.

Purificación de IFABP

La purificación de IFABP recombinante se basa en el protocolo de Lowe y col. (1987) con algunas modificaciones introducidas por las Dras. Cecilia Arighi y Lucrecia Curto en nuestro laboratorio (Arighi y col., 2003; Curto y col., 2005).

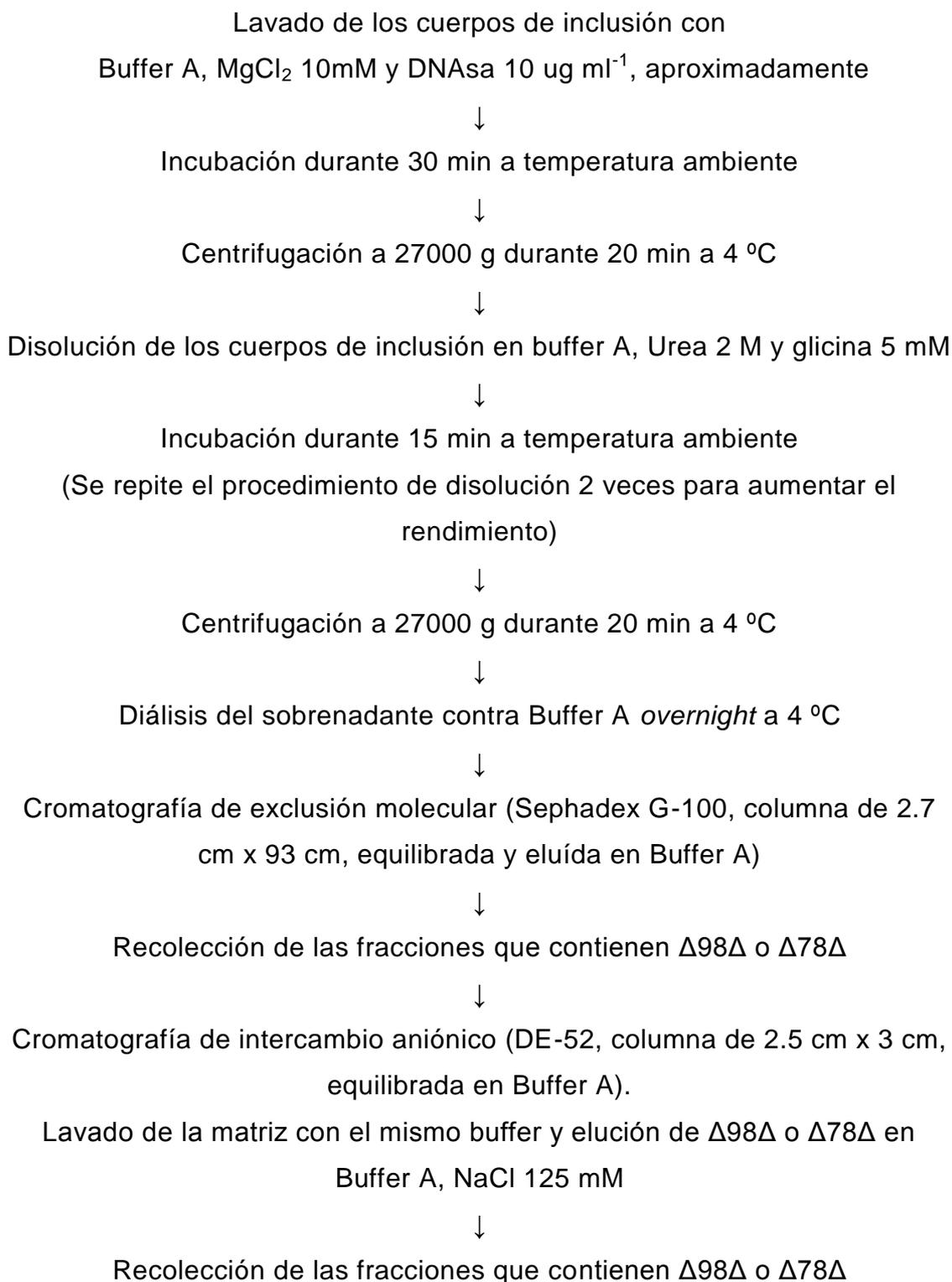
Esquemáticamente:



Purificación de $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$

La purificación de $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$ recombinantes se realiza según el protocolo diseñado por las Dras. Lucrecia Curto y Gisela Franchini en nuestro laboratorio (Curto y col., 2005; Franchini y col., 2009).

Esquemáticamente:



Como paso final común a todos los protocolos de purificación, la proteína se conserva a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ tras el agregado de 10 % glicerol como crioprotector.

ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE LUZ ULTRAVIOLETA

Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro JASCO modelo 7850, utilizando una cubeta de 1 cm de paso de luz. Las mediciones de turbidez se tomaron a una longitud de onda de 350 nm con un ancho de banda de 1 nm. Para las mediciones de cinéticas de agregación, se eligió un intervalo de toma de datos de 5 s (en el caso de $\Delta 78\Delta$) o 10 s (en el caso de IFABP y $\Delta 98\Delta$). Para aquellas mediciones en equilibrio o a punto final, es decir, cuando ya no se verifica evolución de la señal con el tiempo, las soluciones proteicas se incubaron durante 2 h a la concentración de 2,2,2 trifluoroetanol (TFE, Sigma-Aldrich) indicada en cada caso.

Cuantificación de proteínas

Previamente a los experimentos, las soluciones proteicas se dializaron *overnight* contra buffer fosfatos (Sigma-Aldrich) 5 mM, pH 7.2, NaCl (Sigma-Aldrich), 150 mM. El buffer así descrito lo denomina como "Buffer PN8". Las mediciones se llevan a cabo por absorción UV. La concentración de las soluciones proteicas se calculó a partir de la absorción a 280 nm [Fasman, 1989] considerando los coeficientes de extinción molar calculados para IFABP, $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$: $15911.9 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$, $9153.5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ y $6970 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$, respectivamente. A menos que se indique lo contrario, la concentración de las soluciones proteicas fue de 0.24 mg ml^{-1} .

ENSAYO DE UNIÓN A COLORANTES

Los ensayos de unión a Tioflavina-T (Th-T, Sigma-Aldrich) y Rojo Congo (RC, Sigma-Aldrich) se realizaron según Nilsson [Nilsson, 2004].

Ensayo de unión a Tioflavina-T

Las soluciones de proteína se incubaron durante 2 h a las concentraciones de TFE indicadas en cada caso. Posteriormente se diluyeron (20 μ l) en la solución de Th-T (2 ml, 50 μ M). Tras mezclar utilizando el agitador magnético instalado como accesorio del espectrofluorómetro, se midió la emisión de fluorescencia de las muestras a 482 nm (λ del máximo de emisión) en cubeta de 1 cm de paso. A la intensidad de fluorescencia medida para esta solución se le restó la correspondiente a una muestra de proteína sin TFE. La fluorescencia de esta última resulta igual a la de Th-T en solución).

Ensayo de unión a Rojo Congo

Soluciones proteicas incubadas durante 2 h a las concentraciones de TFE indicadas en cada caso fueron centrifugadas y sus *pellets* húmedos (5 μ l) se diluyeron en solución de RC (7 mg ml⁻¹, 1 ml). Se realizó un barrido de 400 a 700 nm de las muestras y se restó el valor correspondiente a una muestra sin proteína. Finalmente se graficó la absorbancia así corregida a 540 nm.

Birrefringencia a la luz polarizada con Rojo Congo

Se preparó una solución saturada de colorante RC en 80 % EtOH acuoso. A esta solución filtrada se le agregó NaCl hasta saturación en exceso y se filtró nuevamente.

Soluciones proteicas fueron incubadas durante 2 h a 25 % v/v TFE. Al cabo, se colocaron alícuotas (10 μ l) sobre un portaobjetos y se las dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente se cubrió con solución colorante de RC (200 μ l) cada muestra y nuevamente se dejó secar. Las manchas se examinaron bajo una lupa con magnificación 50 X usando luz blanca polarizada paralela y perpendicular.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

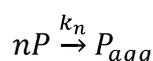
Se incubaron muestras en 25 % v/v TFE durante 16 h a temperatura ambiente y al abrigo de la luz. Al día siguiente, los *pellets* se resuspendieron en buffer PN8. Las muestras (5 μ l) se colocaron en una rejilla de cobre recubierta de carbono, y se dejaron reposar durante 2 min. A continuación se lavaron con agua destilada y se tiñeron con acetato de uranilo (2 % p/v) durante 2 min. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio electrónico de transmisión Philips EM 301 instalado en el Centro de Microscopías Avanzadas (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires).

ANÁLISIS DE LAS CINÉTICAS DE AGREGACIÓN

El grado de agregación fue monitoreado por la evolución de la turbidez a 350 nm ($A_{350\text{nm}}$) en un espectrofotómetro Jasco J-550 termostaticado a 25 °C. Las muestras contienen: IFABP: 0.05 hasta 0.87 mg ml⁻¹ (3.6 a 58.3 uM); $\Delta 98\Delta$: 0.04 hasta 0.54 mg ml⁻¹ (3.3 a 48.7 uM) o $\Delta 78\Delta$: 0.02 hasta 0.50 mg ml⁻¹ (2.3 a 56.8 uM) en 25 % v/v TFE. Se añadió una cantidad fija de TFE puro (213 ul) a cada solución proteica (637 ul) y el contenido se mezcló inmediatamente invirtiendo la cubeta tres veces antes de comenzar la colección de las lecturas de turbidez. Todo el procedimiento no insume más de 10 s, un tiempo muerto aceptable para mediciones cinéticas en una escala de tiempo de minutos.

Se comprobó que las distintas series de datos cumplen con el escalado fenomenológico descrito por Flyvbjerg y col. [1996]. La implicancia de la satisfacción de esta propiedad de escala es que todas las cinéticas comparten *el mismo mecanismo de ensamblado*. En términos matemáticos, esto puede expresarse de la siguiente manera: $A/A_{lim} = f(t/t_c)$ donde A_{lim} es el valor límite de turbidez cuando el tiempo tiende a infinito, mientras que t_c es un tiempo característico para el proceso (por ejemplo t_0 o $t_{1/2}$).

Independientemente, se ajustó un modelo empírico [Wang y Kurganov, 2003] a la turbidez medida para explicar la evolución principal de la cinética de agregación y así extraer los parámetros que la caracterizan. El proceso se reduce a considerar una reacción irreversible a partir de la asociación de n moléculas de proteína no agregada P :



donde P_{agg} es la forma agregada fibrilar y k_n es la constante de velocidad de orden n . De este modo, la velocidad de agregación puede ser descrita como la disminución temporal de la concentración de proteína no agregada ($v_{agg} = -d[P]/dt$). Dado que se supone que la turbidez de la solución proteica es directamente proporcional a la concentración de proteína agregada, la evolución de la turbidez con el tiempo sigue la expresión:

$$\frac{dA}{dt} = k (A_{lim} - A)^n \quad (1)$$

donde A es la turbidez a un tiempo dado t , A_{lim} es el valor límite de la turbidez cuando el tiempo tiende a infinito y $k = \frac{nk_n P_0^{n-1}}{A_{lim}^{n-1}}$ donde P_0 es la concentración de proteína inicial (total). Cuando $n = 1$ (proceso de agregación de primer orden con respecto a la proteína) la ecuación 1 se convierte en la siguiente:

$$\frac{dA}{dt} = k_1 (A_{lim} - A) \quad (2)$$

donde k_1 es la constante de velocidad de primer orden. La integración de la ecuación 2 da la expresión que describe la dependencia esperada de A con t :

$$A = A_{lim} \{1 - e^{-k_1(t-t_0)}\} \quad (3)$$

donde t_0 es un lapso de tiempo durante el cual $A \sim 0$ (en la práctica puede considerarse $A/A_{lim} \leq 0.1$). El modelo fue ajustado a los datos experimentales por análisis de regresión no lineal utilizando la herramienta *Solver* de *Microsoft Excel*. La correlación entre los datos experimentales y los valores calculados se estimó mediante el coeficiente de correlación R^2 [Wang y Kurganov, 2003].

ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR

Los espectros de dicroísmo circular (CD, por sus siglas en inglés *circular dichroism*) de las proteínas incubadas a diferentes concentraciones de TFE se registraron en un espectropolarímetro Jasco J-810 calibrado con la sal de amonio del ácido d-10-canforsulfónico. Los datos en las regiones UV cercana (250-320 nm), o UV lejana (200-250 nm) se colectaron a 25 °C usando cubetas de cuarzo de 10 o 1 mm de paso, respectivamente. A menos que se indique lo contrario, se utilizó una velocidad de barrido de 20 nm min⁻¹ con una constante de tiempo de 1 s. Cada espectro se midió al menos tres veces y los datos se promediaron para minimizar el ruido de la señal.

Para las mediciones de los espectros de CD en los primeros tiempos del proceso de agregación, se tomó un único espectro inmediatamente luego del mezclado con TFE hasta 25 % v/v.

La elipticidad molar se calculó como fuera descripta [Schmid, 1989]. Se calculó la elipticidad molar ($[\theta]$) cuyas unidades son [$^{\circ}$ cm² dmol⁻¹] de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$[\theta] = \frac{100 \cdot \theta}{l \cdot c}$$

donde θ es la elipticidad en grados que se obtiene a partir del registro experimental; l es la longitud del paso de luz en cm; c es igual a C/MRW siendo C la concentración de la proteína en mg ml⁻¹ (determinada a partir del espectro de absorción UV) y MRW el peso del residuo de aminoácido promedio para cada proteína (114.5, 112.0 y 111.5 para IFABP, $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$, respectivamente. Nótese que MRW resulta igual a MW/N ; donde MW es el peso molecular de la proteína y N es el número de residuos de aminoácidos por molécula de proteína.

ESPECTROS DE FLUORESCENCIA

Las mediciones de fluorescencia se realizaron a 25 °C en un espectrofluorímetro Jasco FP-6500 equipado con una celda termostalizada. Se utilizaron cubetas de 0.3 cm y 1 cm de paso de luz, ambas selladas con una tapa de Teflon. Se utilizó una velocidad de barrido de 200 nm min⁻¹ con una constante de tiempo de 1 s. En todos los casos se restaron los blancos correspondientes. Los parámetros extraídos de cada espectro fueron la intensidad integrada total $\sum I_\lambda$, la longitud de onda correspondiente al máximo de emisión de fluorescencia ($\lambda_{m\acute{a}x}$) o la longitud de onda del centro de masa (CM). El parámetro CM se calcula como la inversa de $\langle \nu \rangle$, siendo $\langle \nu \rangle = \frac{\sum I_\nu \nu}{\sum I_\nu}$, donde I_ν es la intensidad de fluorescencia a una dada ν (ν es el número de onda, $=\frac{1}{\lambda}$).

Fluorescencia intrínseca

Para espectros de emisión de fluorescencia intrínseca la longitud de onda de excitación es 295 nm y la emisión se colecta en el rango 310-410 nm. El ancho de banda de los monocromadores de excitación y emisión fue fijado en 3 nm.

Unión y desplazamiento de ácido 8-anilino 1-naftalen sulfónico (ANS)

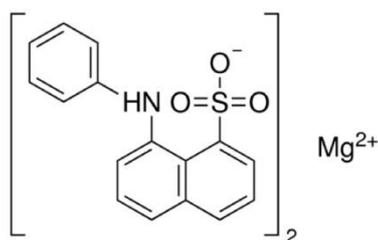


Figura 3.1. Estructura química del ANS.

Para los experimentos de unión de ANS (Figura 3.1) se preparó una solución concentrada fresca de ANS (Sigma) en etanol absoluto. A partir de ella, y por dilución en buffer PN8, en ausencia o en presencia de 10 % v/v TFE, se obtuvo una solución de trabajo cuya concentración se estimó precisamente a partir de

la absorción a 350 nm ($\epsilon_{350\text{nm}} = 4950 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$). Se utilizó un volumen de 2 ml de soluciones proteicas (2 μM) en buffer PN8 en ausencia o en presencia de 10 % v/v TFE y se añadió el ligando a una concentración final de 25 μM . Previamente a la colecta de espectros, se incubaron las muestras por 3 min para asegurar la adecuada equilibración de las mismas. Se fijó la longitud de onda del monocromador de excitación en 400 nm y se midieron los espectros en el rango 420-600 nm (ancho de banda de 4 nm para la excitación y 8 nm para la emisión) antes y después del agregado del ANS.

Para los experimentos de desplazamiento con ácido oleico, a las muestras previamente incubadas con ANS se les añadió ácido oleico en una relación molar de 5:1 con respecto a la proteína.

En ningún caso la concentración final de etanol excedió 2 % v/v.

Apagamiento de la fluorescencia (*quenching*) con acrilamida

Se agregaron secuencialmente alícuotas (30 μl) de una solución fresca y concentrada de acrilamida (4 M, Sigma-Aldrich) en buffer PN8 en ausencia o en presencia de 10 % v/v TFE, a una solución proteica (2 ml, 10 μM). El cambio en la señal de fluorescencia intrínseca fue monitoreado a 25 °C.

Los datos obtenidos fueron analizados de acuerdo al formalismo de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q]$$

donde F_0 y F son la intensidad de fluorescencia integrada en ausencia o en presencia del apagador (Q , cuya concentración se expresa en M), respectivamente, y K_{SV} es la constante de Stern-Volmer (M^{-1}).

CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

Los experimentos fueron llevados a cabo con una columna (Superdex-75) acoplada a un sistema de FPLC (Amersham Biosciences). Se obtuvieron perfiles de elución en ausencia o en presencia de TFE. La matriz fue equilibrada en buffer PN8 en ausencia de TFE o adicionado hasta 10 % v/v, respectivamente. La elución de las distintas proteínas fue monitoreada a 280 nm.

El sistema de FPLC se encuentra acoplado a un módulo de dispersión de luz estática a múltiples ángulos (*Multiple Angle Static Light Scattering*, 3 ángulos en el módulo miniDawn de Wyatt) a partir del cual se obtiene el estado de oligomerización de estas proteínas a 0 y 10 % v/v TFE. El procesamiento de los resultados se realizó con el software ASTRA (Wyatt Technology, California, USA).

PROTEÓLISIS LIMITADA

Los experimentos de proteólisis limitada se llevaron a cabo mediante la incubación de soluciones de IFABP, $\Delta 98\Delta$ o $\Delta 78\Delta$ con clostripaína, quimotripsina o proteinasa K. Las digestiones enzimáticas se realizaron en PN8 a 30 °C tanto en ausencia como en presencia de 10 % v/v TFE, usando relaciones enzima:sustrato de 1:20 y 1:200 (p/p). A diferentes intervalos de tiempo se extraen muestras de la mezcla de incubación para su análisis por SDS-PAGE y por espectrometría de masa.

Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS fue llevada a cabo de acuerdo a la técnica descrita por Schägger y von Jagow [1987]. La composición del gel concentrador es 4 % T, 3 % C y la del gel separador 16.5 % T, 3 % C. Las muestras de mezclas proteolíticas obtenidas a diferentes tiempos se calentaron durante 3 min a 96 °C en presencia de buffer muestra (0.125 M Tris-HCl pH 6.8, azul de bromofenol 0.005 % (p/v), SDS 4 % (p/v), glicerol 20 % (v/v), β -mercaptoetanol 2 % (v/v)). Los geles se prepararon utilizando el equipo Mini-Prot de Hoefer. Se aplicó un voltaje de 50 V durante el período de la muestra al gel y, seguidamente, se elevó el voltaje a 100 V durante el resto de la corrida electroforética. Los geles fueron teñidos con *Coomassie Brilliant Blue G* coloidal (CBB 0.1% (p/v), H_3PO_4 2 % (v/v), $(NH_4)_2SO_4$ 15 % (p/v)) y desteñidos con metanol.

Espectrometría de masa de ionización por electrospray (ESI MS)

Las muestras de mezclas proteolíticas obtenidas a diferentes tiempos de incubación fueron analizados por ESI-MS luego de una separación por cromatografía de RP-HPLC en línea con el espectrómetro. Se utilizó una columna de fase reversa C4 (Vydac). Estos experimentos fueron llevados a cabo en un espectrómetro ThermoFisher LCQ-Duo equipado con detector de trampa iónica instalado en el LANAIS-PROEM (FFyB, UBA-CONICET, Buenos Aires).

ENSAYOS DE UNIÓN A LIGANDOS



Figura 3.2. Estructura química del ácido oleico (18:1 cis-9, (A) y del ácido *trans*-parinámico (18:4 todo trans,(B)

La unión del ácido oleico (Figura 3.2A, Sigma-Aldrich) y ácido *trans*-parinámico (Figura 3.2B, t-PA, Sigma-Aldrich) a las proteínas fue monitoreada observando los cambios por CD tanto en la región UV lejana como cercana. Las soluciones concentradas del ácido graso fueron preparadas en etanol. En primer lugar se colectaron los espectros de las proteínas (15 μM) en buffer PN8 en ausencia o en presencia de 10 % v/v TFE y, posteriormente, tras el agregado del ácido graso en una relación molar proteína:ligando de 1:4 para el ácido oleico y 1:1 para el t-PA, incubando en oscuridad y a temperatura ambiente por 15 min para asegurar que el sistema llegue al equilibrio.

En ningún caso la concentración final de etanol excedió el 2 % v/v.

DESNATURALIZACIÓN EN EL EQUILIBRIO

Por temperatura

La desnaturalización térmica se monitoreó siguiendo la caída en el valor absoluto de la elipticidad molar a 216 nm de soluciones proteicas (12 μM) en buffer PN8 en ausencia o en presencia de 10 % v/v TFE. Un volumen de 2 ml de cada una de las soluciones proteicas fue calentado de 25 a 95 $^{\circ}\text{C}$ mediante un dispositivo Peltier a una velocidad de 0.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ en una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico sellada con un tapón de Teflon. Los valores obtenidos fueron corregidos sustrayendo el aporte del buffer a la señal dicroica.

Para las proteínas que desnaturalizan de forma reversible de acuerdo a una transición simple de dos estados –situación/condición que significa que el estado desplegado (U) esté en equilibrio con la estructura nativa (N) y no existan intermediarios en cantidad significativa- se ajustaron las siguientes ecuaciones a los datos:

$$\Delta G^0_{NU} = -RT \ln \frac{f_U}{f_N} = \Delta H^0_m + \Delta C_p(T - T_m) - T \left[\left(\frac{\Delta H^0_m}{T_m} \right) + \Delta C_p \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) \right] \quad (a)$$

$$S = f_N(S_{0,N} + b_N T) + f_U(S_{0,U} + b_U T) \quad (b)$$

La ecuación (a) expresa el cambio de energía libre *standard* el ΔG^0_{NU} en términos de la temperatura (T), la temperatura media de la transición térmica (T_m) el cambio de entalpía *standard* de la transición (ΔH^0_m) y el cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p) entre los estados U y N.

En la ecuación (b), f_N y f_U son la fracción nativa y desnaturalizada en el equilibrio, respectivamente (nótese que $f_N + f_U = 1$) y T_m es la temperatura a la cual f_N y f_U resultan iguales ($=0.5$). La señal observada en cualquier punto (S) se interpreta como la suma de las contribuciones de las señales nativa S_N y desnaturalizada S_U presentes en la mezcla en equilibrio. Suponiendo una dependencia lineal de S_N y S_U con la temperatura, $S_{0,N}$ y $S_{0,U}$ son las señales de CD en ausencia de agente desnaturalizante para los estados N y U, respectivamente y, b_N y b_U son las pendientes de la pre- y post-transición, respectivamente.

Para los experimentos en presencia de 10 % v/v TFE, la existencia de un proceso de agregación de carácter irreversible concomitante con la desnaturalización no permitió aplicar este modelo. En estos casos se calculó la temperatura de *onset* de agregación (T_{on}) como se indicará la Figura 4.35. Este valor se obtiene después de ajustar una línea recta a los valores del voltaje aplicado al fototubo para las temperaturas en la zona de pre-transición y otra recta para los valores correspondientes en la zona de la transición propiamente dicha. El valor de abscisas de la intersección entre ambas rectas corresponde a T_{on} .

Por agentes químicos

Se prepararon antes de muestras individuales de concentración fija de proteína (12 μ M) y creciente del agente desnaturalizante: cloruro de guanidinio (0 a 3 M final GdmCl) o urea (0 a 8 M final urea) según corresponda. Las soluciones proteicas y el agente desnaturalizante se prepararon en buffer PN8 en ausencia o en presencia de 10 % v/v TFE. Tras 60 min de incubación, la transición conformacional fue monitoreada midiendo la variación en la fluorescencia intrínseca de las proteínas en estudio (a 25 °C), tal cual fue descrito anteriormente.

A los datos obtenidos se ajustó la ecuación *c* que describe un modelo de dos estados [Santoro y Bolen, 1988]. Cabe destacar que para $\Delta 78\Delta$ se consideró el proceso de disociación del dímero como un proceso acoplado y simultáneo con el de desnaturalización [Franchini y col, 2009].

$$S = \frac{(\alpha_N + b_N D) + (\alpha_U + b_U D) e^{-\frac{\Delta G^0_{H_2O}}{RT}}}{1 + e^{-\frac{\Delta G^0_{H_2O}}{RT}}} \quad (c)$$

donde α_N y b_N , y α_U y b_U son los valores de ordenada al origen y pendiente en las zonas de la pre- y la post-transición, respectivamente, y D es la concentración molar de desnaturalizante en cada punto. El parámetro que se obtienen: $\Delta G^0_{H_2O}$, es la diferencia de energía libre *standard* entre el estado nativo y desnaturalizado, R la constante universal de los gases ideales y T , la temperatura absoluta en grados Kelvin. Al cabo de cada ajuste por regresión

lineal, se obtuvieron cotas de error (con *Sigma-Plot*) para cada parámetro derivadas del error residual absoluto.

NMR

Los espectros de resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés “*Nuclear Magnetic Resonance*”) de las proteínas (300 μM) en ausencia o en presencia de TFE (Sigma Aldrich) fueron colectados a 25 $^{\circ}\text{C}$ en un espectrómetro Bruker 600 MHz Avance III (Bruker Instruments, Inc., Billerica, MA, USA) equipado con una criosonda de triple resonancia. Los datos de RMN fueron procesados usando *NMRpipe* [Delaglio, y col., 1995] y analizados usando *NMRViewj* [Johnson, 2004].

HERRAMIENTAS COMPUTACIONALES DE PREDICCIÓN

Tendencia a la agregación

Con el objetivo de evaluar la existencia de fragmentos con tendencia a la agregación a lo largo de la secuencia de IFABP, se utilizó la herramienta AMYLPRED 2 [Tsolis y col., 2013].

Propensión al desorden

La propensión al desorden para la proteína de longitud completa fue evaluada por varias herramientas computacionales de la familia PONDR, como PONDR® VL-XT [Romero y col., 2001], PONDR® VSL2 [Obradovic y col., 2005; Peng y col., 2005], y PONDR-FIT [Xue y col., 2010].

A continuación se detallan los predictores utilizados:

- PONDR® VL-XT: Aplica tres redes neuronales diferentes: una para la región interna de la secuencia (> 30 residuos; “*Variously characterized Long*”) y una para cada región terminal (“*X-ray-characterized Terminal*”). Esta división se basa en la hipótesis de que las características estructurales de la secuencia desordenada pueden depender de la localización de la región en el contexto de la secuencia. Cada red neuronal es entrenada por un conjunto de datos específicos conteniendo sólo los residuos de aminoácidos de esa región. La decisión final resulta de las predicciones individuales para las respectivas regiones. Las características de entrada de las redes neuronales incluyen composiciones y perfiles seleccionados de las secuencias primarias. PONDR® VL-XT puede subestimar la incidencia de regiones desordenadas largas en las proteínas. Sin embargo, este método presenta ventajas significativas en la búsqueda de posibles sitios de unión [He y col., 2009].
- PONDR® VSL2: Combina predicciones a partir de redes neuronales elaboradas para regiones desordenadas tanto cortas (< 30 residuos) como largas. Este predictor se basa en que aquellas regiones desordenadas cortas y largas pueden presentar diferencias en sus

composición de aminoácidos ya que predictores entrenados para regiones desordenadas cortas predicen mal regiones desordenadas largas y viceversa. Cada predictor individual se entrena a partir del conjunto de datos disponible que contiene secuencias de esa región específica. PONDR® VSL2 aplica no sólo el perfil de secuencia, sino también el resultado del alineamiento múltiple de secuencias producido por *PSI-blast* y la predicción de estructura secundaria generada por *PHD* y *PSI-Pred*. PONDR® VSL2 es reconocido como uno de los predictores más precisos [He y col., 2009].

- PONDR-FIT: Es un metaprograma ensamblado mediante la combinación de PONDR-VL XT, PONDR-VSL2, PONDR-VL 3, FoldIndex, IUPred y TopIDP, que permite alcanzar una precisión significativamente superior por comparación con los predictores individuales [Xue y col., 2010].

Propensión a formar α -hélices

Para evaluar la propensión del segmento 93-131 de IFABP a formar estructura secundaria se utilizaron dos de los métodos actuales más confiables: YASPIN [Lin y col., 2005] y Jpred [Drozdetskiy y col., 2015]

BIBLIOGRAFÍA

Arighi, C.N., Rossi, J.P.F.C. y Delfino, J.M.. (2003). Temperature-induced conformational switch in intestinal fatty acid binding protein (IFABP) revealing an alternative mode for ligand binding. *Biochemistry* 42:7539-7551.

Curto, L.M., Caramelo, J.J., Franchini, G.R. y Delfino, J.M.. (2009). $\Delta 98\Delta$, a minimalist model of antiparallel beta-sheet proteins based on intestinal fatty acid binding protein. *Protein Sci.* 18:735-746.

Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J., y Bax, A. D. (1995). NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *Journal of biomolecular NMR*, 6(3), 277-293.

Drozdetskiy, A., Cole, C., Procter, J., y Barton, G. J. (2015). JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic acids research*, gkv332.

Fasman, G. D. (1989). *Practical handbook of biochemistry and molecular biology*. Editorial CRC.

Flyvbjerg, H., Jobs, E. y Leibler, S.. (1996). Kinetics of self-assembling microtubules: An "inverse problem" in biochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93:5975-5979.

Franchini, G.R., Curto, L.M., Caramelo, J.J. y Delfino, J.M.. 2009. Dissection of a β -barrel motif leading to a functional dimer: the case of intestinal fatty acid binding protein. *Protein Sci.* 18:2592-2602.

He, B., Wang, K., Liu, Y., Xue, B., Uversky, V. N., y Dunker, A. K. (2009). Predicting intrinsic disorder in proteins: an overview. *Cell research*, 19(8), 929-949.

Johnson, B. A. (2004). Using NMRView to visualize and analyze the NMR spectra of macromolecules. *Protein NMR Techniques*, 313-352. Lin, K., Simossis, V. A., Taylor, W. R., y Heringa, J. (2005). A simple and fast secondary structure prediction method using hidden neural networks. *Bioinformatics*, 21(2), 152-159.

Lin, K., Simossis, V. A., Taylor, W. R., y Heringa, J. (2005). A simple and fast secondary structure prediction method using hidden neural networks. *Bioinformatics*, 21(2), 152-159.

Lowe, J. B., Sacchettini, J. C., Laposata, M., McQuillan, J. J., y Gordon, J. I. (1987). Expression of rat intestinal fatty acid-binding protein in *Escherichia coli*. Purification and comparison of ligand binding characteristics with that of *Escherichia coli*-derived rat liver fatty acid-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 262(12), 5931-5937.

Nilsson, M.R. 2004. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods* 34:151-160.

Obradovic, Z., Peng, K., Vucetic, S., Radivojac, P., y Dunker, A. K. (2005). Exploiting heterogeneous sequence properties improves prediction of protein disorder. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 61(S7), 176-182.

Peng, K., Vucetic, S., Radivojac, P., Brown, C. J., Dunker, A. K., y Obradovic, Z. (2005). Optimizing long intrinsic disorder predictors with protein evolutionary information. *Journal of bioinformatics and computational biology*, 3(01), 35-60.

Romero, P., Obradovic, Z., Li, X., Garner, E. C., Brown, C. J., y Dunker, A. K. (2001). Sequence complexity of disordered protein. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 42(1), 38-48.

Santoro, M. M., y Bolen, D. W. (1988). Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl. alpha.-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry*, 27(21), 8063-8068.

Schägger, H., y Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry*, 166(2), 368-379.

Schmid, F.. 1989. Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. In *Protein Structure: a practical approach* (Creighton, T.E., ed.), p. 251, IRL, New York.

Tsolis, A. C., Papandreou, N. C., Iconomidou, V. A. y Hamodrakas S.. (2013). A consensus method for the prediction of 'aggregation-prone' peptides in globular proteins. *PLoS One*. 8:e54175J.

Wang, K. y Kurganov B. I.. (2003). Kinetics of heat- and acidification-induced aggregation of firefly Luciferase. *Biophys. Chem*. 106:97–109.

Xue, B., Dunbrack, R. L., Williams, R. W., Dunker, A. K., y Uversky, V. N. (2010). PONDR-FIT: a meta-predictor of intrinsically disordered amino acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1804(4), 996-1010.

RESULTADOS

RESULTADOS

SECCIÓN 1: AGREGACIÓN, EFECTOS DEL TFE

Sacando provecho de las características únicas de nuestra “familia” de proteínas β , comenzamos el trabajo evaluando comparativamente la respuesta de las mismas frente a su exposición a distintas concentraciones de TFE. Se prestó atención a los cambios en la conformación, a la generación de agregados y a la estructura de estos últimos. Finalmente se desarrolló un modelo que explica el mecanismo de agregación a 25 % v/v TFE.

CARACTERIZACIÓN DE LOS AGREGADOS PROTEICOS

La presencia de especies de gran volumen molecular, tales como los agregados proteicos, causa la dispersión de la luz incidente, incrementando la absorción aparente (turbidez) de una solución. Cabe destacar que este efecto es proporcional tanto a la concentración como al tamaño de los agregados. Fijando una longitud de onda de 350 nm para la irradiación, se elude la absorción de las propias especies proteicas presentes en la solución (monómeros y oligómeros) a la vez que permite que aquellas estructuras con un tamaño molecular mayor a 350 nm contribuyan a la intensidad de la señal en forma proporcional a su longitud [Berne, 1974].

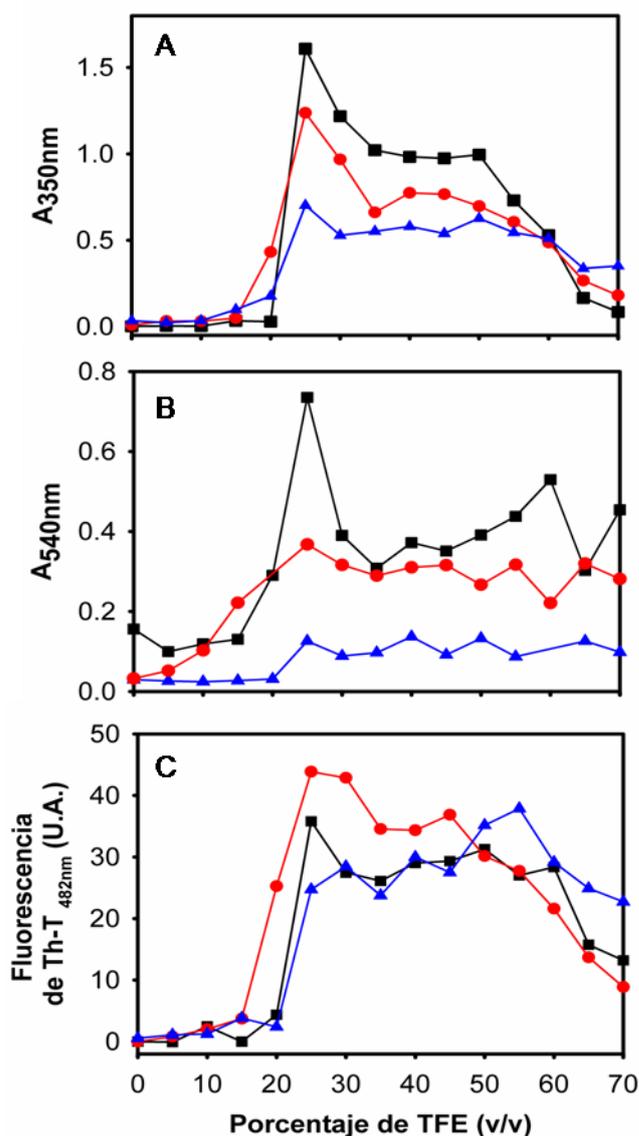


Figura 4.1. Perfil de turbidez ($A_{350\text{nm}}$) (A), cambios en la señal obtenida por unión a colorantes Rojo Congo (B) ($A_{540\text{nm}}$) y Tioflavina-T (C) ($\lambda_{\text{exc}}=440\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=482\text{ nm}$) de soluciones proteicas (0.24 mg ml^{-1}) incubadas a distintas concentraciones de TFE: IFABP (■), $\Delta 98\Delta$ (●) y $\Delta 78\Delta$ (▲).

Con el propósito de revelar la existencia de agregados proteicos, se realizó un perfil de turbidez de IFABP, $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$ en función de la concentración de TFE (Figura 4.1A). Al observar los resultados, se puede apreciar que en ningún caso ocurre agregación a concentraciones de TFE menores a $\sim 15\%$ v/v. A partir de este valor, las tres proteínas exhiben un incremento similar en los valores de turbidez que indicaría la existencia de un fenómeno de agregación. Más precisamente, se alcanza un valor máximo alrededor de 25% v/v TFE.

Frente a este fenómeno, se decidió evaluar si los agregados formados en esa condición presentan características de tipo amiloide. Para ello, se estudió, en primera instancia, la capacidad de unión de diferentes colorantes previamente

reportados como adecuados para el diagnóstico de la presencia de fibras amiloides: Rojo Congo (RC) y Tioflavina-T (Th-T).

Así, se midió el aumento en la absorción del RC por la aparición de un “hombro” a 540 nm que resulta de su unión a estructuras de hoja β repetitivas y ordenadas presentes en las fibras amiloides [Nilsson, 2008]. En la Figura 4.1B puede verse que, independientemente de las diferencias cuantitativas, la unión de RC a las tres proteínas muestra un máximo centrado a 25 % v/v TFE. Cabe destacar que a las más altas concentraciones de TFE ensayadas (60-70 % v/v), la turbidez de las muestras alcanza valores considerablemente mayores que en condiciones sub-agregantes (por ejemplo, hasta 15 % v/v).

También se registró el cambio en la intensidad de fluorescencia de Th-T a 482 nm tras su unión a los agregados [LeVine, 1993]. En la Figura 4.1C podemos apreciar que: (i) hasta 15 % v/v TFE no se observa incremento en la intensidad de fluorescencia a consecuencia de la unión a Th-T, (ii) que existe un máximo de unión a 25 % v/v TFE, (iii) que entre 35-55 % v/v TFE se observa agregación (cuali y cuantitativamente diferente de aquella a 25 % v/v TFE) y (iv) que a concentraciones más altas (> 55 % v/v TFE) se observa un descenso en la intensidad. Nuevamente, más allá de las diferencias cuantitativas -que no necesariamente darían cuenta de diferencias en la concentración de agregados amiloides presentes en razón de incertidumbres en el modo preciso de unión de los colorantes a las fibras- la unión de ambos colorantes muestra un perfil similar al obtenido por turbidez en la Figura 4.1A. Estos resultados aportan evidencia en favor de que los agregados formados a 25 % v/v TFE tendrían características de tipo amiloide.

Además, tras la unión a las fibras amiloides, el RC produce una particular birrefringencia verde azulada bajo luz blanca que atraviesa polarizadores cruzados [Li y col., 2009]. Esta última característica permitió la detección visual en lupa con magnificación 50 X de los agregados β (Figura 4.2).

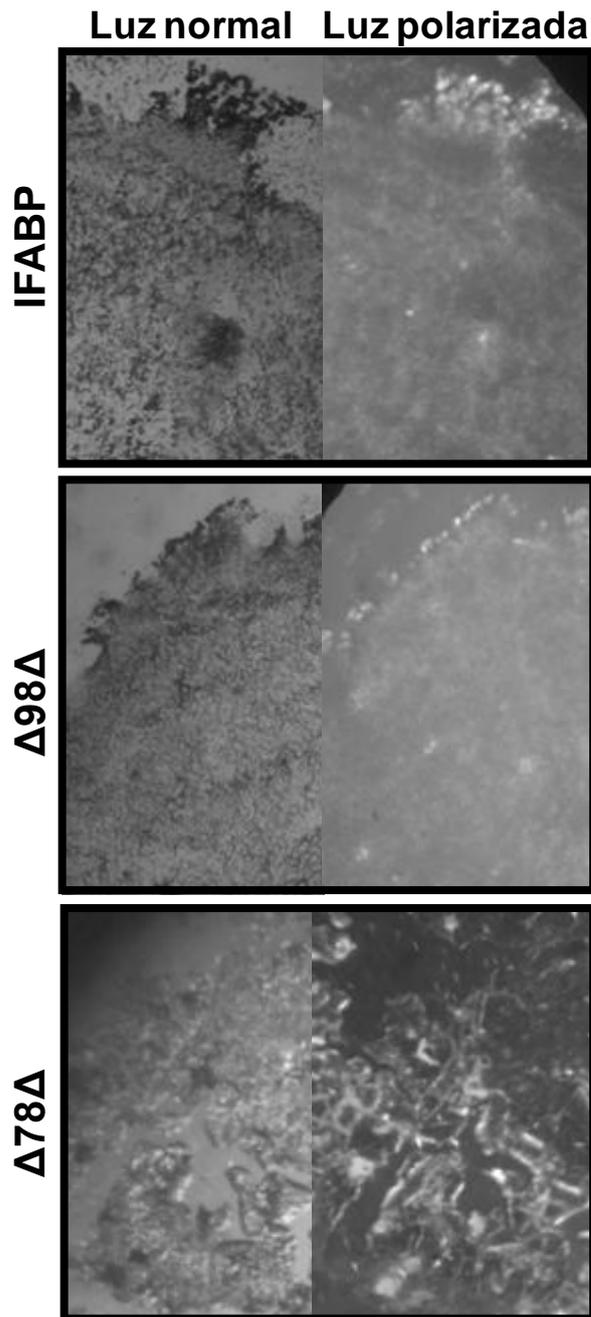


Figura 4.2. Imágenes de microscopía bajo magnificación 50X de agregados proteicos de IFABP, $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$ bajo luz normal (*izquierda*) y luz polarizada (*derecha*).

Ésta conclusión también fue validada por los resultados obtenidos a partir de la inspección de las características estructurales de los agregados al microscopio electrónico de transmisión (TEM, Figura 4.3). En TEM, una fuente de rayos catódicos se utiliza para producir un haz de electrones que se acelera por alta tensión, y que es enfocado por lentes electrostáticas y electromagnéticas. Al pasar el haz a través de una muestra -fina y transparente en distinto grado a los electrones- se forma una imagen a partir de la intensidad del haz de

electrones transmitidos. La imagen que contiene la información estructural sobre la muestra es magnificada y enfocada sobre una pantalla por una lente objetivo.

Para las tres proteínas ensayadas, las micrografías revelan que, a pesar de no observarse fibras maduras individuales, podemos encontrar estructuras anulares y en forma de manojos de distintos tamaños y curvaturas. Estas estructuras revelarían la presencia de acúmulos de fibras amiloides, pudiéndose descartar la posibilidad de que se tratase de agregación amorfa.

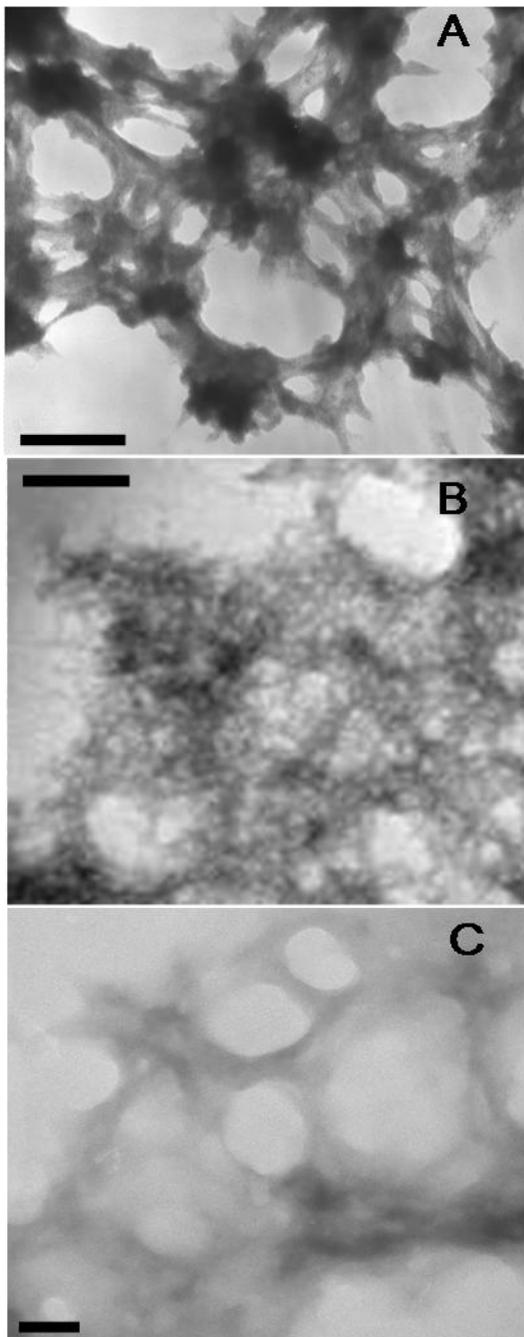


Figura 4.3. Fotografías de microscopía de transmisión electrónica (TEM) de muestras de IFABP (A), $\Delta 98\Delta$ (B) y $\Delta 78\Delta$ (C) incubadas a 25 % v/v TFE. La barra corresponde a 200 nm.

Resumiendo la información presentada hasta este punto:

En el rango 0-15 % v/v TFE, coincidentemente con la zona de pre-agregación, no existe unión a los colorantes.

Se observa un máximo de unión a colorantes en la misma región en que ocurre máxima agregación. Coincidentemente, se obtuvieron imágenes de TEM que evidencian acúmulos con características de tipo amiloide.

Asimismo, en el rango entre 35-55 % v/v TFE se observa agregación presumiblemente diferente de aquella observada a 25 % v/v TFE (datos no mostrados).

En contraste con la zona de pre-agregación, a 55-70 % v/v TFE se observa que las proteínas, aun permaneciendo mayormente solubles, se unen a los colorantes, principalmente al RC. En relación con esto último, cabe mencionar que se ha demostrado que el RC se une a estructuras del tipo glóbulo fundido [Khurana y col., 2001].

CONFORMACIÓN PROTEICA

Seguidamente se estudió el efecto del TFE sobre la conformación proteica. Para ello se recurrió a la evaluación de la estructura secundaria y terciaria mediante técnicas espectroscópicas tales como CD (Figuras 4.4 y 4.5) y emisión de fluorescencia intrínseca (Figura 4.6).

El fenómeno de CD se produce por la absorción diferencial de luz circularmente polarizada (de sentidos izquierdo o derecho), por parte de moléculas intrínsecamente quirales o que se encuentren en un entorno quiral. En el caso de las proteínas, el espectro en la región ultravioleta (UV) lejana (180 a 250 nm) es informativo de calidad y contenido de la estructura secundaria debido a que el cromóforo dominante en esa zona es el enlace peptídico. Si bien éste es plano, los sucesivos enlaces se encuentran conectados a centros quirales (carbonos α) y cada tipo de estructura secundaria se corresponde con una definida orientación relativa de los planos de los enlaces. Por otro lado, los espectros en la región UV cercana (250-350 nm) reflejan principalmente las contribuciones de las cadenas laterales aromáticas de los aminoácidos, razón por la cual proporciona información sobre la estructura terciaria del polipéptido. Es importante destacar que el espectro de CD suma las contribuciones de los componentes conformacionales presentes en cada molécula de proteína y en el conjunto de moléculas presentes en una muestra dada.

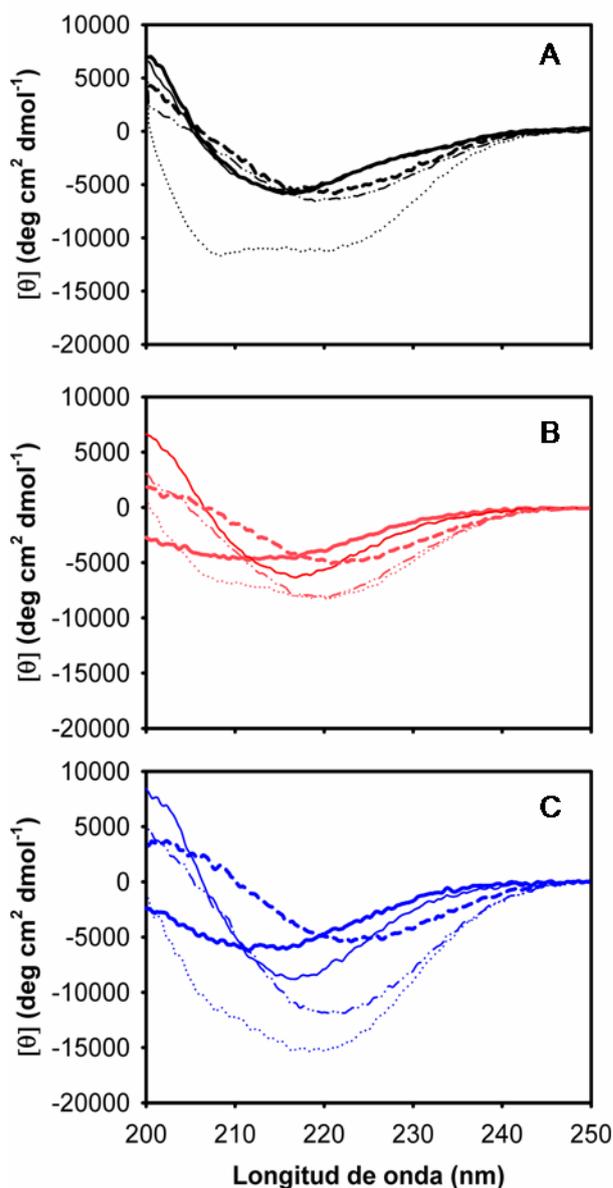


Figura 4.4. Espectros de dicroísmo circular en la región UV lejana en presencia de diferentes concentraciones de TFE para IFABP (A), $\Delta 98\Delta$ (B) y $\Delta 78\Delta$ (C). Las concentraciones de TFE usadas en cada caso son: 0 (—), 15 (— —), 25 (— — —), 45 (— · —) y 65 (· · · · ·) % v/v TFE.

En cuanto a la estructura secundaria de IFABP, el espectro de CD en la región UV lejana (Figura 4.4A) en buffer fosfatos 5 mM, NaCl 150 mM, pH 8.0 (PN8), muestra una banda positiva centrada a ~200 nm y una banda negativa con mínimo alrededor de 216 nm, siendo esto último una característica distintiva de la estructura de hoja β . Los espectros a 0 y 15 % v/v TFE resultan casi idénticos entre sí, mientras que a 25 y 45 % v/v TFE se advierte un corrimiento de ~4 nm hacia el rojo en la posición del mínimo en relación con la proteína en ausencia de TFE. Significativamente, la magnitud y la posición del nuevo mínimo son típicas de hoja β extendida, una estructura predominante en los agregados fibrilares amiloides. En cambio a 65 % v/v TFE el espectro de IFABP

muestra un cambio drástico en su forma, dando origen a dos bandas negativas centradas a ~208 nm y ~222 nm, lo que resulta característico de espectros de proteínas α -helicoidales.

Los espectros de $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$ (Figura 4.4B y C) a 0 % v/v TFE muestran un mínimo a ~216 nm también típico de conformación en hoja β . Presumiblemente, debido a la ausencia del sub-dominio α -helicoidal, la banda positiva centrada a ~200 nm desaparece y hay una disminución en la magnitud de la señal a 216 nm. Curiosamente, la presencia de 15 % v/v TFE (una concentración menor del cosolvente que aquella que conduce a la agregación) modifica la forma y la intensidad del espectro de ambas variantes truncadas. A dicha concentración, ambas proteínas muestran espectros notablemente similares al nativo de IFABP (Figura 4.4A, como se mencionó antes, es indistinguible de aquel registrado a 15 % v/v TFE). A 25 y 45 % v/v TFE la forma del espectro sigue siendo característica de proteínas de tipo β , acompañado por un desplazamiento hacia el rojo (a ~220 nm) de la banda negativa. Para 45 % v/v TFE, se observa un aumento en la intensidad de esta señal dicróica. De manera similar a IFABP, a 65 % v/v TFE el espectro en la región UV lejana de las variantes abreviadas muestran dos bandas negativas a ~208 nm y ~222 nm, hecho indicativo de una transición hacia estructura α -helicoidal.

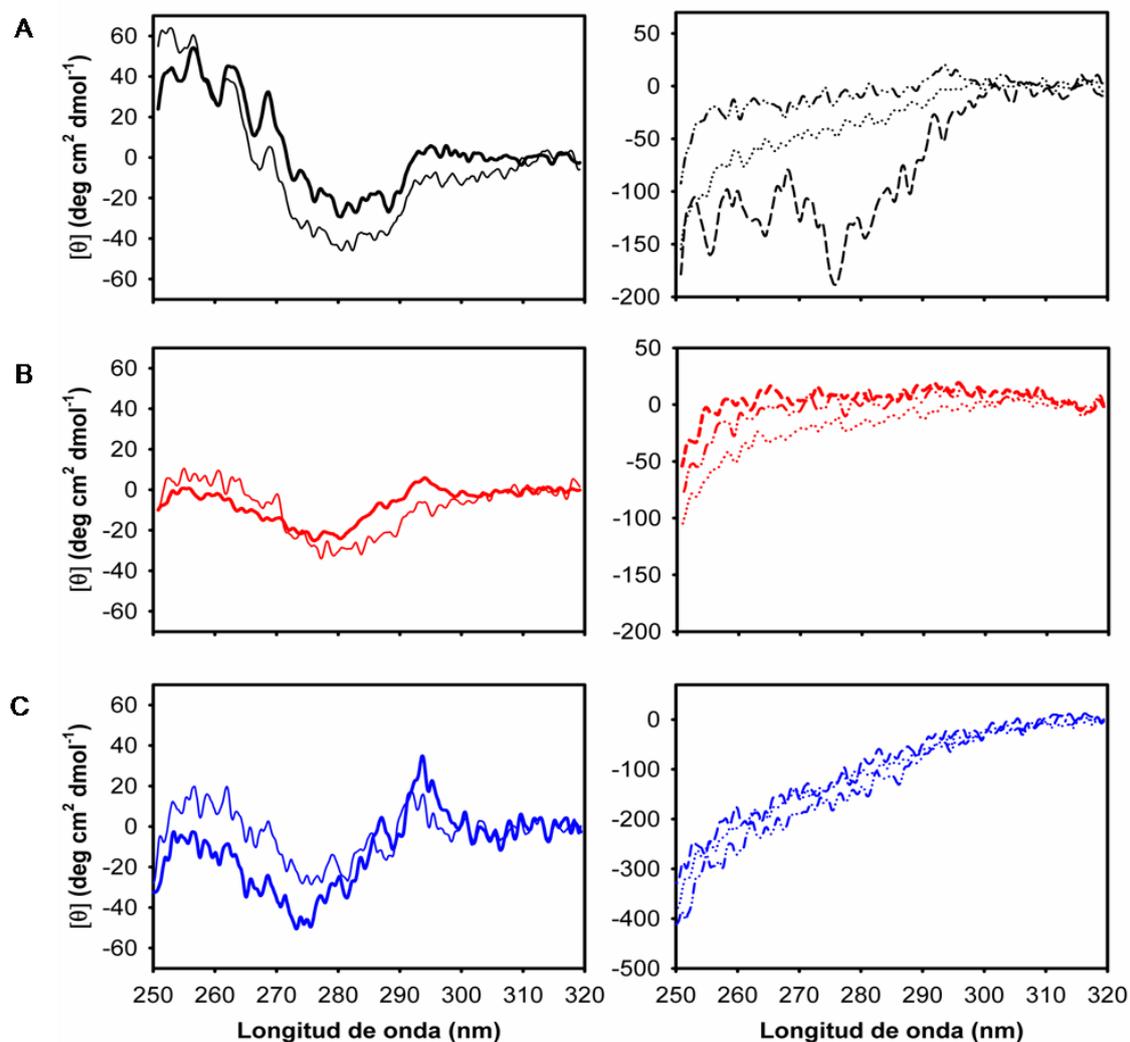


Figura 4.5. Espectros de dicroísmo circular en la región UV cercana en presencia de diferentes concentraciones de TFE para IFABP (A), $\Delta 98\Delta$ (B) y $\Delta 78\Delta$ (C). Las concentraciones de TFE usadas en cada caso son: 0 (—), 15 (---), 25 (---), 45 (-·-·-) y 65 (·····) % v/v.

IFABP muestra un espectro de CD en la región UV cercana rico en estructura fina (Figura 4.5A, panel de la izquierda), mientras que $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$ muestran bandas de menor magnitud debido a la disminución en la asimetría del entorno de los aminoácidos aromáticos (Figura 4.5B y C, paneles de la izquierda). Hasta 15 % v/v TFE se observan cambios leves en la forma del espectro de las tres proteínas, lo que indicaría que persiste la estructura de un núcleo organizado. En cambio, a 25 % v/v TFE -y concentraciones más altas de cosolvente-, los espectros revelan pérdida de la estructura terciaria nativa.

Tomados en conjunto los espectros de CD en las regiones UV lejana y cercana de las tres proteínas en presencia de 65 % v/v TFE indican la persistencia de estructura secundaria y la ausencia de estructura terciaria. Esta evidencia - junto a los resultados obtenidos en los ensayos de unión del colorante RC- es indicativo de la aparición de un estado de glóbulo fundido rico en estructura α a muy altas concentraciones de TFE.

Seguidamente, se procedió a realizar medidas de la emisión de fluorescencia de las tres proteínas (Figura 4.6A y B). La emisión de fluorescencia en proteínas es debida a la presencia de los residuos triptófano (Trp), tirosina (Tyr) y fenilalanina (Phe). El Trp presenta el más alto rendimiento cuántico y su emisión es muy sensible a la polaridad del entorno. En consecuencia, este residuo se ha convertido en la sonda fluorescente intrínseca de elección para el estudio del plegado de proteínas. IFABP contiene dos residuos de Trp: el Trp82, que está enterrado dentro del núcleo hidrofóbico en la parte más profunda del bolsillo de unión al ligando (Figura 1.6 en INTRODUCCIÓN), y el Trp6, ubicado en la posición N-terminal de la hebra- β A. Ambos residuos están casi completamente ocluidos del solvente acuoso [Arighi y col., 1998]. En la proteína de longitud completa, el Trp82 (el único remanente en las variantes abreviadas) es el responsable del 65 % de la emisión de fluorescencia y casi no hay influencia mutua (“*crosstalk*”) entre ambos residuos de Trp [Dalessio y col., 2005]. Trabajo previo de nuestro laboratorio demostró que, en las variantes abreviadas, este residuo se encuentra en un entorno similar al de IFABP [Curto y col., 2005 y 2009; y Franchini y col., 2008], convirtiéndose así en una sonda espectroscópica útil para evaluar la integridad del núcleo hidrofóbico.

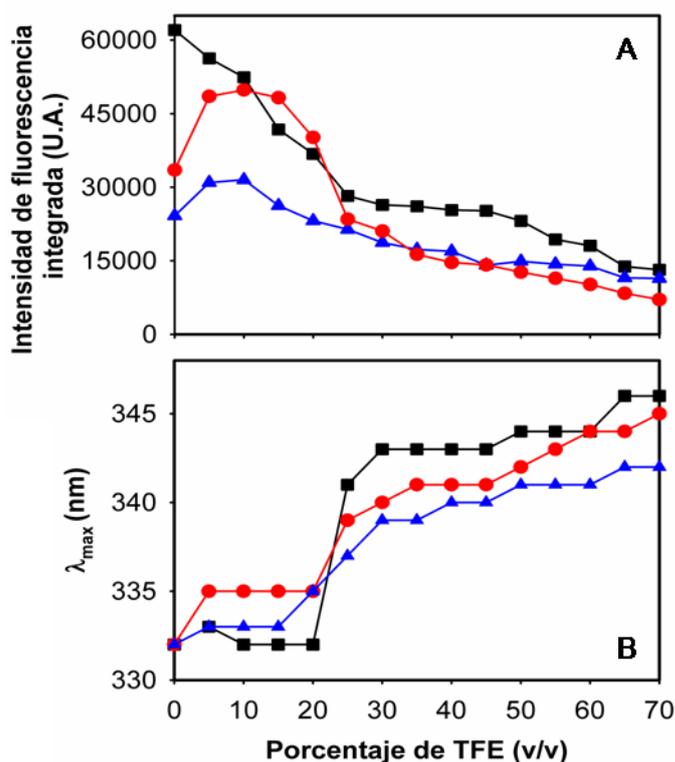


Figura 4.6. Perfil de intensidad de fluorescencia integrada (A) y longitud de onda correspondiente al máximo de emisión ($\lambda_{\text{máx}}$, B) a distintas concentraciones de TFE para IFABP (■), $\Delta 98\Delta$ (●) y $\Delta 78\Delta$ (▲).

La Figura 4.6A muestra el perfil de la variación en la intensidad de emisión y en el panel B en la posición de la longitud de onda en la cual se alcanza el máximo valor de emisión ($\lambda_{\text{máx}}$), ambos parámetros graficados en función de la concentración de TFE. De 0 a 20 % v/v TFE, podemos advertir que $\lambda_{\text{máx}}$ permanece casi invariable (332 nm) para IFABP, al tiempo que se produce una disminución significativa en la intensidad. Entre 20 y 25 % v/v TFE se produce un desplazamiento hacia el rojo de aproximadamente 9 nm y, desde ese punto hasta la concentración más alta ensayada (70 % v/v TFE), se observa un desplazamiento de 5 nm adicionales en este mismo sentido. La intensidad de fluorescencia permanece esencialmente constante entre 20 y 45 % v/v TFE, para posteriormente disminuir gradualmente hasta ~5 veces respecto del valor inicial. En cuanto a las variantes abreviadas, se observa una tendencia general similar en la intensidad y desplazamiento de $\lambda_{\text{máx}}$. No obstante, las variantes abreviadas muestran un comportamiento bimodal, descrito por un aumento de 1.3 y 1.5 veces en la intensidad de fluorescencia para $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$, respectivamente, tras la adición de tan sólo 5 % v/v TFE. Este cambio va acompañado de un corrimiento de $\lambda_{\text{máx}}$ hacia el rojo de 2 nm y 1 nm para $\Delta 98\Delta$

y $\Delta 78\Delta$, respectivamente. De este punto en adelante, la evolución de la intensidad acompaña la tendencia general descendente similar a la observada para IFABP. Significativamente, entre 20 y 30 % v/v TFE existe un aumento abrupto en $\lambda_{\text{máx}}$, aunque de menor magnitud que aquel observado para IFABP. De este último análisis podemos concluir que el comportamiento general de ambas variantes es muy similar al de IFABP, aunque con diferencias que revelan la mayor plasticidad conformacional de las proteínas frente al desafío del cosolvente.

Los cambios inducidos por TFE en la fluorescencia del Trp deben interpretarse con cautela, ya que tanto los cambios conformacionales como los efectos de apagamiento de la fluorescencia (*quenching*) por el cosolvente pueden tener lugar en simultáneo. En este sentido, se compararon los resultados obtenidos para las proteínas con aquellos esperados para un compuesto modelo de Trp en solución (N-acetil-L-triptofanamida, NATA). Con respecto a este punto, se encontró que al pasar de un buffer acuoso a 100 % v/v TFE, el espectro de NATA exhibe un cambio de 3 nm hacia el azul de su pico de emisión (de 353 a 350 nm), y una disminución de más de cuatro veces en el rendimiento cuántico [Mukhopadhyay y Basak 1998]. De manera similar, se midió una disminución de ~5 veces en el rendimiento cuántico de NATA en 30 % v/v TFE por comparación con la medida en agua [Chen y Barkley, 1995].

CINÉTICA DE AGREGACIÓN

Habitualmente, al evaluar la variación de una señal proporcional a la magnitud de agregación en función del tiempo, el perfil del proceso puede ser descrito mediante una curva sigmoidea. Tal como fuera detallado en la Introducción (Figura 1.2 en INTRODUCCIÓN), esta curva puede dividirse en tres regiones diferentes: (i) una fase de nucleación en la que los monómeros experimentan cambios conformacionales y tienden a asociarse para formar núcleos oligoméricos, (ii) una fase de elongación, en el que los núcleos crecen rápidamente por adición de monómeros (y, eventualmente polímeros) para formar fibrillas hasta alcanzar la etapa de maduración (iii).

Dada la complejidad inherente a estas proteínas y con el fin de indagar sobre los aspectos cinéticos moleculares del fenómeno para el caso de IFABP y sus variantes, se llevó a cabo un análisis tendiente a esclarecer los mecanismos involucrados.

En primer término se evaluó el impacto de la variación en la concentración proteica sobre la cinética de agregación. Se realizaron curvas de agregación a 25 % v/v TFE -la concentración de cosolvente en que verificamos que se maximiza la formación de fibras- y se monitoreó la evolución de la turbidez en función del tiempo (Figura 4.7). A simple vista notamos que las cinéticas de $\Delta 98\Delta$ llegan al valor límite en un lapso de tiempo mayor que para IFABP, mientras que $\Delta 78\Delta$ lo hace más rápidamente que las anteriores. Este hecho ilustra que existen diferencias claras entre las velocidades de agregación de las tres proteínas, siendo el orden: $\Delta 98\Delta < \text{IFABP} < \Delta 78\Delta$.

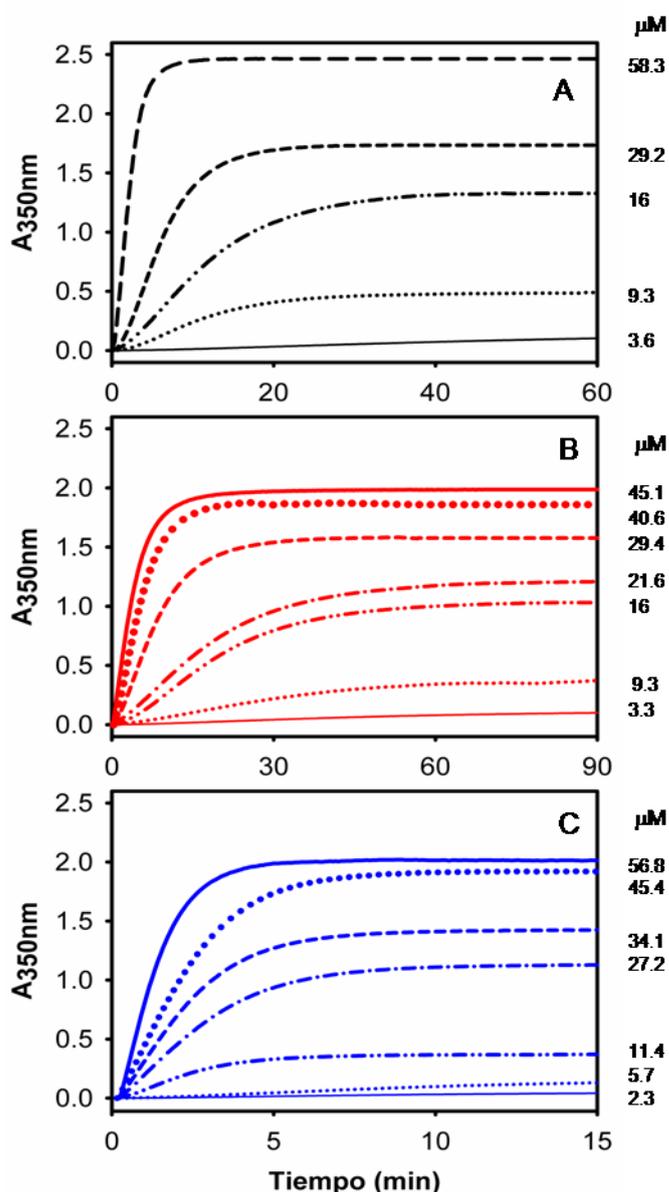


Figura 4.7. Efecto de la concentración proteica sobre la cinética de agregación a 25 % v/v TFE, monitoreada por la $A_{350\text{nm}}$ para IFABP (A), $\Delta 98\Delta$ (B) y $\Delta 78\Delta$ (C). Las concentraciones proteicas utilizadas se indican a la derecha de cada curva.

Para permitir una comparación adecuada entre diferentes proteínas a cada una de las concentraciones ensayadas, las curvas mostradas en la Figura 4.7 fueron re-escaladas doblemente de la siguiente forma: en el caso del eje y, los valores de turbidez fueron normalizados por el valor máximo (A/A_{lim}); para el eje x, cada tiempo se dividió por $t_{1/2}$ ($t/t_{1/2}$), correspondiendo el valor $t_{1/2}$ al tiempo necesario para alcanzar la mitad de A_{lim} (Figura 4.8).

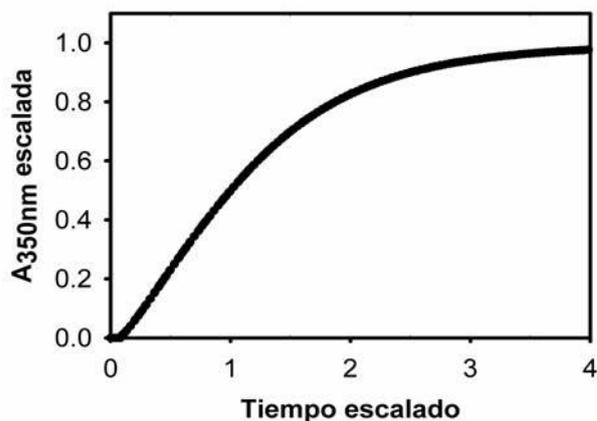


Figura 4.8. Re-escalado doble de las cinéticas de agregación a 25% v/v TFE para IFABP, $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$ (datos mostrados en la Figura 4.7) luego de relativizar la turbidez (A/A_{lim}) y el tiempo ($t/t_{1/2}$), esto es, tiempo escalado = 1 representa $t = t_{1/2}$. Para mayor claridad sólo se muestran 3 ejemplos.

Como vemos en la Figura 4.8, las curvas descritas por las tres proteínas a cada una de las concentraciones probadas, convergen en una única curva. Este hecho sugiere fuertemente que el mecanismo de agregación sería el mismo en todos los casos. Esta conclusión se fundamenta en el tratamiento de los datos indicado por Flyvbjerg y Leibler, 1996. Ver APÉNDICE SOBRE EL TRATAMIENTO CINÉTICO DE LA AGREGACIÓN para más detalles.

Para profundizar el estudio del mecanismo de agregación a 25 % v/v TFE, se ajustó, el modelo empírico descrito por Wang y Kurganov [Wang y Kurganov, 2003] a los datos disponibles. Este tratamiento permite describir satisfactoriamente las curvas de agregación para valores de $A/A_{lim} > 0.1$ (se considera que hasta valores de turbidez correspondientes a un 10 % de A_{lim} no hay presencia significativa de agregados mayores) mediante un proceso que obedece una cinética de pseudo-primer orden descrito por la siguiente ecuación: $\frac{dA}{dt} = k_1 (A_{lim} - A)$. Nótese que $A_{lim} - A$ es una magnitud proporcional a la concentración de proteína (*bulk*) presente en cada instante. Así, resulta intuitivo ver que la velocidad del proceso disminuya a medida que se agota la proteína en el medio. La ecuación diferencial anterior se integra entre los límites ($A \sim 0, t = t_0$) y (A, t) para dar la siguiente: $A = A_{lim} \{1 - e^{-k_1(t-t_0)}\}$.

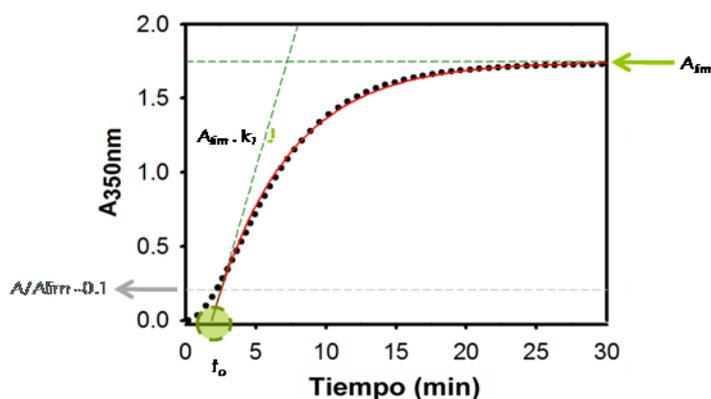


Figura 4.9 Aplicación de la ecuación integrada: $A = A_{lim}\{1 - e^{-k_1(t-t_0)}\}$ para describir la fase de elongación de la agregación. A una cinética de agregación sigmoidea (indicada en línea de puntos) se ajusta la ecuación integrada (línea color rojo). Los parámetros que se obtienen son: A_{lim} (correspondiente al valor de turbidez máximo límite de la cinética de agregación); t_0 (correspondiente al tiempo de duración de la fase de nucleación); y $A_{lim} \cdot k_1$ (correspondiente a la velocidad "inicial" (en realidad a $t = t_0$) del proceso de agregación).

La descripción del proceso como una cinética de pseudo-primer orden se deduce de la dependencia lineal observada de la constante de velocidad k_1 con la concentración proteica (Figura 4.10A). Tal como se representa en la Figura 4.9 a partir del ajuste a la ecuación integrada mencionada previamente, se logra además estimar los parámetros A_{lim} (Figura 4.10B) y t_0 (tiempo lag, Figura 4.10C). Los valores de A_{lim} resultan directamente proporcionales a la concentración total de proteína en los tres casos, lo que corrobora que el valor de la turbidez refleja fielmente la magnitud de la agregación proteica y validando el uso de dicho valor para la caracterización del mecanismo cinético del proceso de agregación. Como podemos ver en la Figura 4.10C, el parámetro t_0 , que caracteriza la duración del período lag, disminuye (con una dependencia hiperbólica inversa) con el aumento de la concentración proteica. Si suponemos que para $t \geq t_0$, la agregación sigue una cinética de primer orden, la velocidad "inicial" (pues no se trata de la verdadera velocidad inicial, ver más adelante) de este proceso puede ser calculada como la pendiente de la recta tangente a la curva en $t = t_0$ (esto es matemáticamente equivalente al producto $A_{lim} \cdot k_1$). Considerando que durante el período lag aún no habría fibras presentes, sólo sería razonable hacer estimaciones de velocidad después de pasado este período [Wang y Kurganov, 2003] (sin embargo, veremos luego que la fase lag contiene información esencial para entender el

proceso de nucleación). Dado que k_1 y A_{lim} dependen linealmente de la concentración de proteína, su producto será proporcional al cuadrado de la concentración proteica (Figura 4.10D), hecho indicativo de la presencia de un fenómeno cinético de segundo orden. Bajo la suposición de que la concentración de núcleos permanece aproximadamente constante durante la fase de elongación, la reacción de asociación de segundo orden puede ser descrita de manera satisfactoria por una aparente cinética de primer orden. Esto es consistente con la adición secuencial de monómeros a los núcleos preformados.

Analizando comparativamente estas pendientes, observamos que $\Delta 98\Delta$ muestra un valor de aproximadamente la mitad de aquel medido para IFABP. Contrariamente, para $\Delta 78\Delta$ se evidencia un aumento de unas 5.5 veces. En otras palabras, $\Delta 78\Delta$ y $\Delta 98\Delta$ difieren entre sí en un orden de magnitud en el valor de velocidad observado.

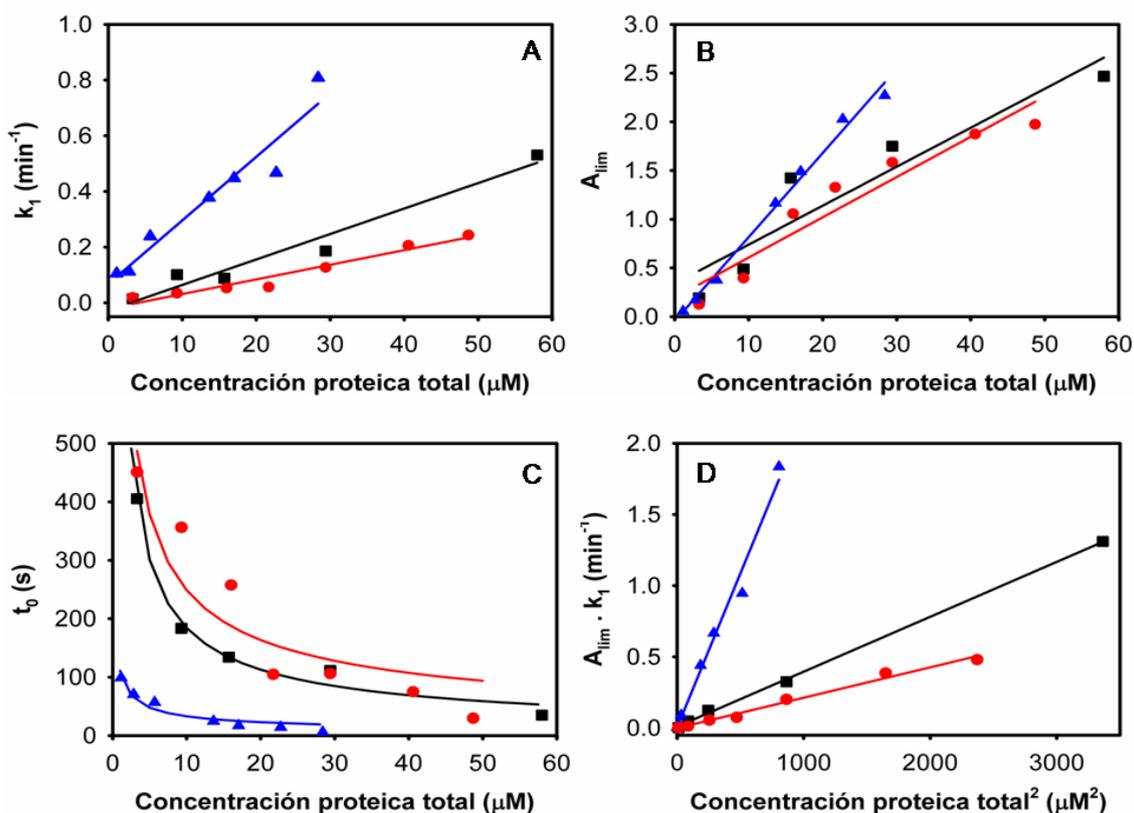


Figura 4.10. Análisis de las curvas cinéticas de agregación para IFABP (■), $\Delta 98\Delta$ (●) y $\Delta 78\Delta$ (▲). Dependencia del parámetro k_1 (A), de A_{lim} (B) y del tiempo lag (t_0) (C) con la concentración proteica total. Dependencia de la velocidad “inicial” de agregación ($A_{lim} \cdot k_1$) con el cuadrado de la concentración total de proteína (D).

Independientemente, y con el propósito de indagar con mayor profundidad en el mecanismo del proceso de agregación, se pueden interpretar los datos cinéticos siguiendo el formalismo fenomenológico propuesto por Flyvbjerg y Leibler, [1996], Esto implica que cada cinética quede completamente definida de acuerdo con una escala de turbidez propia y con una escala de tiempo característica. Del análisis del doble escalado ya descrito, resulta evidente un comportamiento general común a todas las cinéticas (Figura 4.8). Este tipo de conducta simple puede esperarse de cualquier proceso que conste de, o esté dominado por, un único mecanismo. La coincidencia de las curvas doblemente escaladas es compatible con un fenómeno de agregación primario, esto es un proceso por el cual la nucleación ocurre sólo a partir de proteínas, sin intervención de fenómenos secundarios tales como la fragmentación de fibras o la catálisis por superficies (ver INTRODUCCIÓN). Para ello se analizó la pendiente inicial (la *verdadera velocidad inicial*, esto es, valores para $t \sim 0$) a partir de una gráfica doble logarítmica de A/A_{lim} en función del tiempo (Figura 4.11). Según el formalismo empleado, en esta región se cumple una relación $A/A_{lim} \propto t^{k+2}$, es decir, en una representación doble logarítmica de $A(t)/A_{lim}$ vs t aparece una línea recta con pendiente $k + 2$, donde k sería el número de pasos intermedios que preceden la formación del núcleo. Aplicado a nuestro sistema, de la extrapolación de la recta ajustada a los primeros puntos de cada serie de datos se obtuvo un valor de 2 en el caso de IFABP y $\Delta 98\Delta$, lo que significa que se requiere un sólo paso *para que se forme un núcleo estable* y competente para iniciar el proceso de agregación ($k = 0$, Figura 4.12A). Debido a la alta velocidad de agregación de $\Delta 78\Delta$, para esta proteína no fue posible aplicar dicho tratamiento, de modo tal que en este caso resulta más incierta esta afirmación.

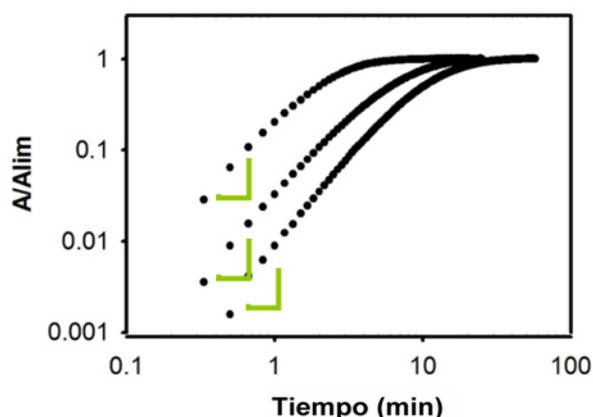


Figura 4.11. Representación doble logarítmica de A/A_{lim} en función de t . En esta región inicial se cumple la relación $A/A_{lim} \propto t^{k+2}$ y aparece una recta con pendiente $k+2$ (indicada en color verde). Para mayor claridad sólo se muestran tres curvas, cada una correspondiente a una dada concentración de proteína.

Por otra parte, a partir de un gráfico doble logarítmico que relacione el tiempo característico $t_{1/2}$ con A_{lim} (Figura 4.12B), se verifica una relación inversa simple entre estas variables $t_{1/2} \propto A_{lim}^{-s}$. Esta propiedad impone una restricción al modelo cinético, resultante del hecho de que la pendiente arroja un valor determinado y característico. Para el caso de IFABP y $\Delta 98\Delta$, dicho valor resulta aproximadamente 1 ($s = 1$), de modo que siendo $n = s(k+2)$ [Flyvbjerg y Leibler, 1996], n (la estequiometría del núcleo) resulta igual a 2. Así, el núcleo activo sería una especie dimérica. De acuerdo con esto, el proceso de agregación proteica podría dividirse en dos pasos, donde el primero de ellos está representado por la dimerización que da origen al núcleo, seguido por la asociación secuencial de monómeros que dan lugar al crecimiento de la fibra.

Otros autores han demostrado que, para un mecanismo sencillo de nucleación primaria (esto es, a partir de proteína *bulk*, sin intervención de la fibra), $t_{1/2}$ se relaciona con la *concentración total de proteína* como una ley de potencia [Cohen y col., 2012]:

$$t_{1/2} \propto \text{concentración proteica total}^{\gamma} \quad (4)$$

Esta última ecuación se convierte en una relación lineal con pendiente igual a γ cuando se representa en escala doble logarítmica, tal como se muestra en la Figura 4.12B. En los sistemas dominados por la nucleación primaria el orden de reacción del proceso de nucleación (n) puede ser fácilmente calculado dado que $\gamma = -n/2$. En el caso de $\Delta 78\Delta$, γ toma un valor de aproximadamente 0.5, lo que implica que n sería igual a 1. En consecuencia, para $\Delta 78\Delta$, esta

restricción en el modelo cinético indica que el núcleo activo sería una única molécula de $\Delta 78\Delta$. Así entonces, de manera análoga a lo ya explicado para IFABP y $\Delta 98\Delta$, el núcleo activo de $\Delta 78\Delta$ sería también un homodímero, pero formado a través de un proceso unimolecular.

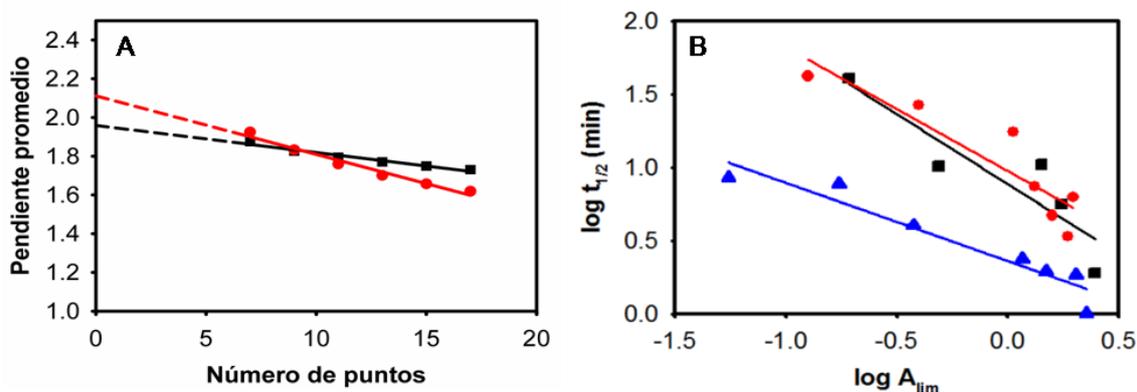


Figura 4.12. Valor de la pendiente inicial en función del número de puntos usado para su cálculo (A). Gráfico doble logarítmico de $t_{1/2}$ en función de A_{lim} para: IFABP (■) y $\Delta 98\Delta$ (●) (B). Las pendientes de las rectas ajustadas son 0.95 ± 0.26 , 0.85 ± 0.17 y 0.64 ± 0.08 , para IFABP (■), $\Delta 98\Delta$ (●) y $\Delta 78\Delta$ (▲), respectivamente (B).

En resumen, las características comunes de la cinética de agregación de IFABP, $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$ inducida por TFE son:

la existencia de un período *lag* (t_0),

la dependencia inversa de este parámetro con la concentración proteica, y la dependencia de segundo orden del proceso principal con respecto a la concentración proteica.

Resumiendo, el esquema cinético sería:



donde $n = 2$ para IFABP y $\Delta 98\Delta$ (proceso bimolecular de nucleación), y $n = 1$ para $\Delta 78\Delta$ (proceso unimolecular de nucleación).

Este esquema incluye un paso previo de equilibrio rápido $P \rightleftharpoons P^*$ (que no influye sobre la evolución irreversible posterior). El mismo da cuenta del cambio conformacional inducido por el cosolvente sobre la forma nativa de la proteína P . A consecuencia del mismo, se poblaría P^* , una especie con una elevada

propensión a la agregación. Luego de la formación del núcleo (P_n), la adición de más P^* conduciría a la formación de fibras (F).

HERRAMIENTAS DE PREDICCIÓN PARA LOS SEGMENTOS AMILOIDOGÉNICOS

Un enfoque actual consiste en el uso de herramientas computacionales para evaluar la presencia de segmentos aminoacídicos con mayor tendencia a la agregación dentro de la secuencia proteica. Así, se utilizó la herramienta AMYLPRED2 [Tsolis y col., 2013] para este propósito. Este método combina 11 de los algoritmos de predicción existentes y define un consenso cuando al menos la mitad de los métodos seleccionados dieron resultado positivo. AMYLPRED2 incluye diferentes métodos que se basan en: la tendencia natural de los aminoácidos a formar agregados, patrones de secuencia encontrados en proteínas que notoriamente forman amiloides, segmentos peptídicos con potencialidad de formar hoja β dentro de una posible estructura amiloide compacta, regiones que constituyen hélices α en estructuras nativas, pero presentan tendencia a formar hojas β , entre otros criterios.

El resultado obtenido para la proteína de longitud completa se muestra en la Figura 4.13. Las tres regiones que se consideran “propensas a la agregación” serían aquellas comprendidas entre las siguientes posiciones en la secuencia: 23-26, 58-71 y 114-118.

Asimismo, otro algoritmo llamado FoldAmyloid [Garbuzynskiy y col., 2003] también predice las regiones 59-64 y 114-118 de IFABP como amiloidogénicas. En resumen, ambos algoritmos apuntan a dos zonas como putativas responsables principales de la propensión a la agregación: un segmento C-terminal corto (114-118) y un tramo central mayor que abarca los residuos 58-64/71. El sector N-terminal predicho por AMYLPRED2 está ausente en las dos variantes abreviadas. Vale aclarar que el sector central -que es aquél de mayor tamaño- coincide razonablemente bien con la región de mayor hidrofobicidad local, detectada en toda la secuencia (ver DISCUSIÓN DE RESULTADOS).

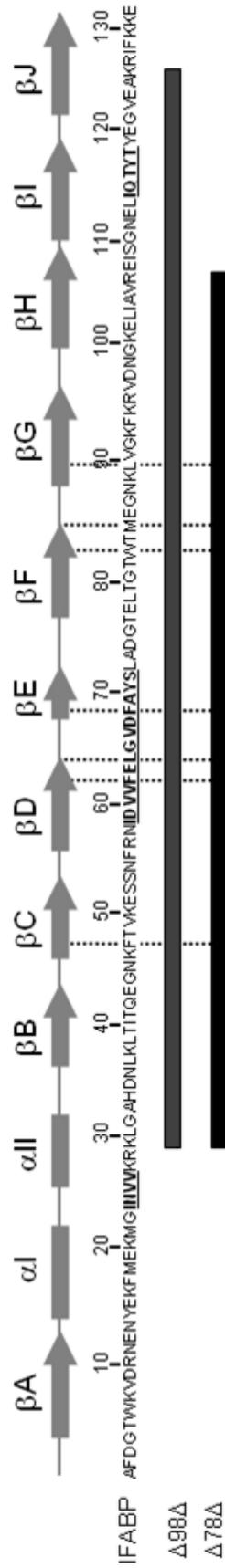


Figura 4.13 Predicción consenso de regiones “propensas a la agregación” (segmentos subrayados). En la parte superior se representan los elementos de estructura secundaria de IFABP según la estructura cristalográfica (2IFB). Debajo se muestra la secuencia aminoacídica de IFABP y por debajo la representación de los segmentos correspondientes a las variantes abreviadas. Los aminoácidos constituyentes del núcleo hidrofóbico están señalados con líneas punteadas.

EXPERIMENTOS CON EL PÉPTIDO 1-28

Frente a la información obtenida por predicción computacional, resultó interesante ensayar experimentalmente si los segmentos ausentes en las variantes abreviadas pudiesen ejercer algún efecto sobre el proceso de agregación, dado que contendrían un sector predicho como amiloidogénico. Recordemos que $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$ carecen del péptido que involucra los primeros 28 aminoácidos de IFABP. Notablemente, $\Delta 98\Delta$ ostenta la menor tendencia a la agregación. Por ello, el fragmento mayor eliminado (péptido 1-28) fue sintetizado y ensayado junto a $\Delta 98\Delta$ en su capacidad para influir sobre proceso (Figura 4.14). El péptido 1-28 aislado no muestra tendencia alguna a formar agregados inducidos por TFE. Consistentemente, la incubación de este péptido en buffer PN8 durante 6 h a 50 °C tampoco promueve su agregación (datos no mostrados). Además, una mezcla equimolar de este último con $\Delta 98\Delta$, incubado durante 1 h a temperatura ambiente previa a la adición de TFE, muestra una cinética que se superpone con la de $\Delta 98\Delta$ aislado. Esto estaría indicando la ausencia de cualquier influencia del péptido sobre el proceso de agregación de la proteína abreviada.

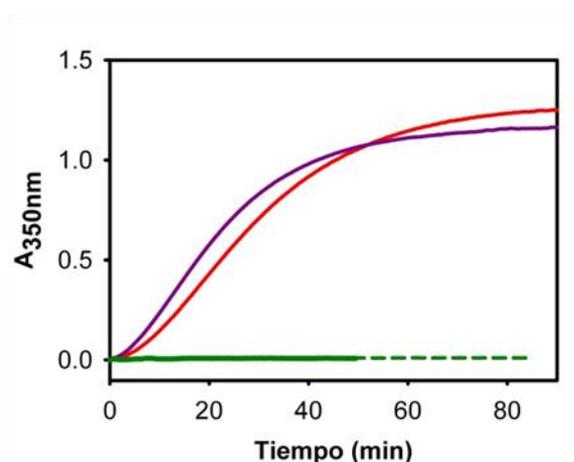


Figura 4.14. Cinéticas de agregación del péptido 1-28 a 29 mM (línea continua) y 58 mM (línea discontinua corta), $\Delta 98\Delta$ (línea continua) a 29 mM y $\Delta 98\Delta$ en presencia del péptido 1-28, a 29mM (línea punteada).

En segunda instancia se evaluó la conformación de este péptido. El péptido 1-28 se comporta como una entidad desestructurada, adquiriendo estructura helicoidal al incubarlo en presencia de 25 % v/v TFE. De manera significativa, independientemente de la presencia de TFE, el espectro de CD (Figura 4.15) de una mezcla 1:1 de $\Delta 98\Delta$ y el péptido 1-28 resulta indistinguible de la suma algebraica de los espectros correspondientes a cada una de estas especies

medidas de manera aislada. Esto estaría indicando que por sí mismo -o aún en presencia de $\Delta 98\Delta$ en el medio- este péptido no sería capaz de formar agregados.

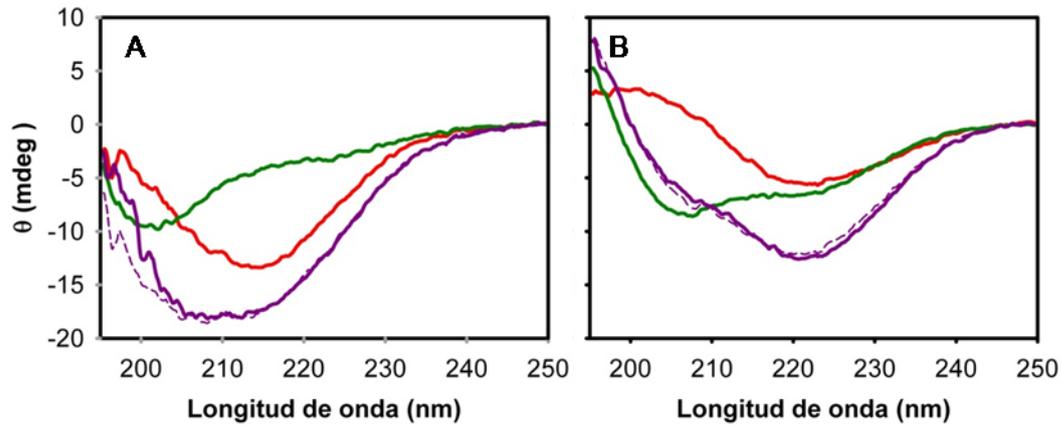


Figura 4.15 Espectros de CD en la zona UV lejana a 0 (A) y 25 (B) % v/v TFE del péptido 1-28, $\Delta 98\Delta$, $\Delta 98\Delta$ en presencia del péptido 1-28 (línea continua) y la suma algebraica de los espectros correspondientes al péptido 1-28 y a $\Delta 98\Delta$ (línea discontinua).

SECCIÓN 2: PREAGREGACIÓN, EFECTO DE BAJAS CONCENTRACIONES DE TFE

El punto de partida para la caracterización de las proteínas a bajas concentraciones de TFE fue la sorprendente estructuración alcanzada por las variantes abreviadas a concentraciones sub-agregantes de este cosolvente. Por este hallazgo es que, decidimos focalizar la atención en la conducta de los sistemas a baja concentración de TFE. Dado que las condiciones que disparan la agregación (~25 % v/v TFE) no nos permiten una adecuada ventana temporal para realizar estudios biofísicos ulteriores, mediante este nuevo enfoque pretendemos explorar los cambios conducentes a la agregación amiloide de estas proteínas.

CONFORMACIÓN PROTEICA

En primera instancia, se evaluó la conformación de IFABP y de las variantes abreviadas mediante CD. En cuanto a IFABP (Figura 4.16A), a ninguna de las concentraciones ensayadas del cosolvente TFE se observa cambio alguno en los espectros de CD en la región UV lejana. Esto último estaría indicando la ausencia de cambios significativos en la estructura secundaria de dicha proteína. Contrariamente, para las variantes abreviadas se observa un comportamiento rotundamente diferente. Como puede observarse en la Figura 4.16B y C, con tan sólo 2.5 % v/v TFE ambas proteínas sufren un cambio dramático en la forma de los espectros. El mínimo se desplaza 4 nm hacia el rojo y aparece una banda positiva centrada en ~200 nm. A medida que aumenta la concentración de TFE hasta la máxima concentración ensayada (15 % v/v TFE), los espectros no cambian su forma general, pero la señal aumenta progresivamente. Sorprendentemente, a ~15 % v/v TFE los espectros de CD en la zona UV lejana de las tres proteínas adoptan un aspecto casi idéntico.

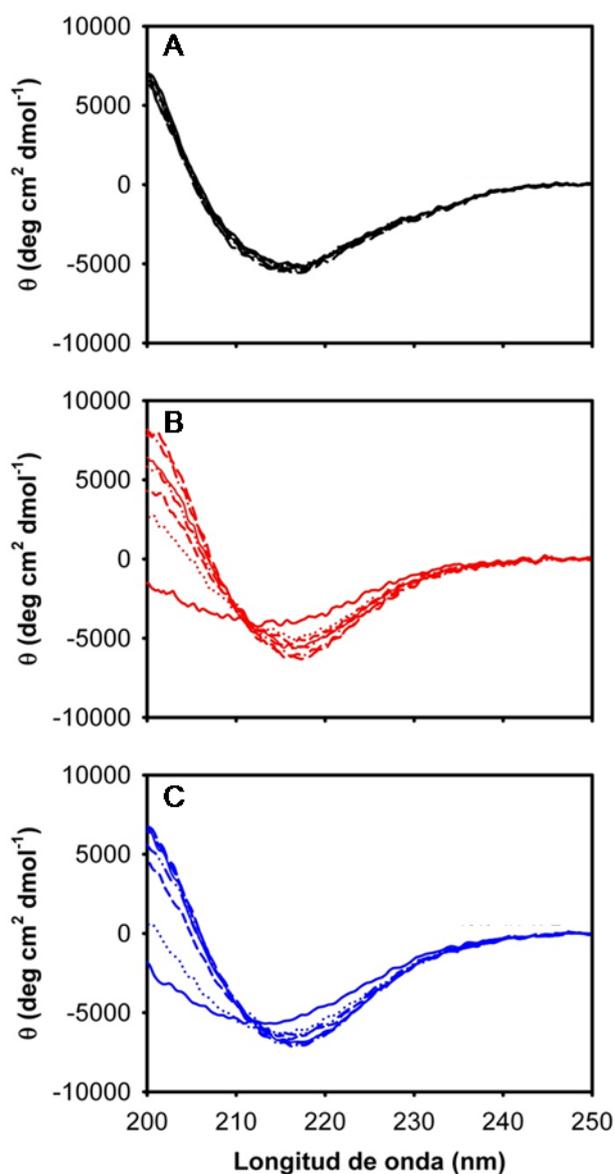


Figura 4.16. Espectros de CD en la región UV lejana en presencia de diferentes concentraciones de TFE para **IFABP** (A), **Δ98Δ** (B) y **Δ78Δ** (C). Las concentraciones del cosolvente usadas fueron: 0 (—), 2.5 (·····), 5 (---), 7.5 (---), 10 (—), 12.5 (---), y 15 (—) % v/v TFE.

En los ensayos subsiguientes, se eligió trabajar con una concentración máxima de 10 % v/v TFE a fin de asegurar la ausencia de agregación, ya que 15 % v/v TFE es una condición demasiado cercana al límite superior que permite estudiar fenómenos de preagregación. En ese sentido, tal como se muestra en la Figura 4.4, a 20 % v/v TFE se observa la presencia evidente de agregados proteicos.

En cuanto a los espectros de CD en la región UV cercana (Figura 4.17), para todos los miembros de esta familia, la adición de 10 % v/v TFE provoca sólo cambios espectrales menores. La conservación de la estructura fina del

espectro pone en evidencia que la estructura terciaria se mantiene en presencia del cosolvente.

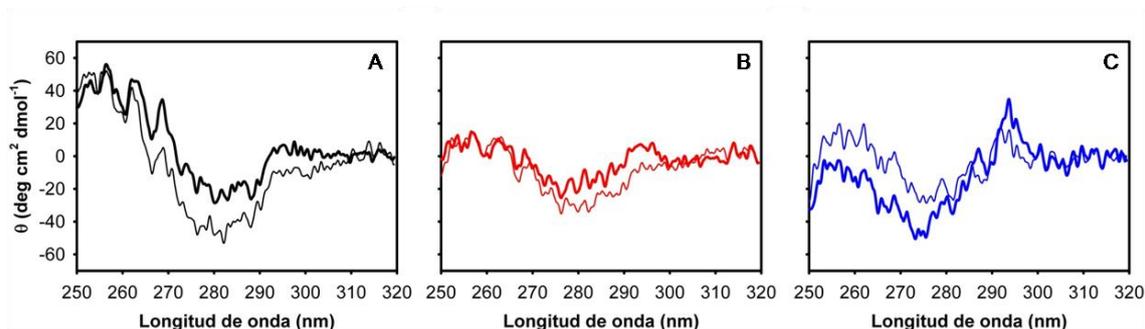


Figura 4.17. Espectros de CD en la región UV cercana a 0 (—) y 10 (— · —) % v/v TFE para IFABP (A), $\Delta 98\Delta$ (B) y $\Delta 78\Delta$ (C).

Posteriormente, se evaluó el impacto de las mismas concentraciones de TFE ensayadas por CD sobre la fluorescencia intrínseca de estas proteínas (Figura 4.18). Para las variantes abreviadas, se observa un comportamiento bimodal. Tras un aumento inicial de la fluorescencia -coincidente con la intensificación de la señal observada por CD- se llega a un valor de meseta que, finalmente continúa con un descenso similar al que domina el perfil de IFABP.

En cuanto a la evolución de la longitud de onda del centro de masa espectral, para IFABP no se observan cambios en el rango de concentraciones ensayadas, mientras que para las variantes abreviadas la menor concentración ensayada ya produce un corrimiento hacia el rojo de ~2 nm, situación que se mantiene hasta 15 % v/v TFE.

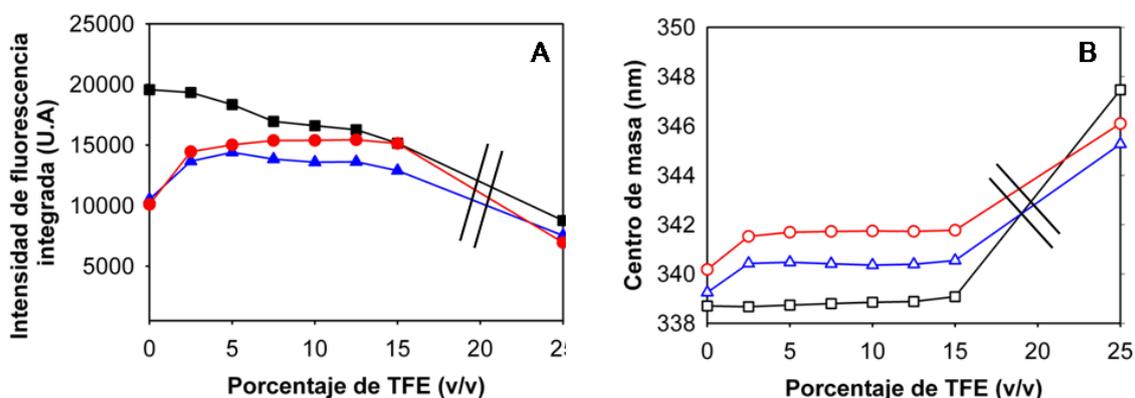


Figura 4.18. Perfil de intensidad de fluorescencia intrínseca integrada (A) y centro de masa (B) a concentraciones variables de TFE para IFABP (■, □), $\Delta 98\Delta$ (●, ○) y $\Delta 78\Delta$ (▲, △).

Tras la adición de 10 % v/v TFE, los espectros de emisión de fluorescencia de IFABP (Figura 4.19) no revelaron cambios en la posición de la longitud de onda máxima ($\lambda_{m\acute{a}x}=330$ nm), pero sí una reducción del 15 % en la intensidad de fluorescencia integrada. Por comparación, cabe recordar que el efecto esperado de TFE sobre el compuesto de referencia NATA es un desplazamiento al azul del pico de emisión y una disminución en el rendimiento cuántico [Mukhopadhyay y col., 1998]. Inversamente, para $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$, la presencia de TFE *aumenta en gran medida* la intensidad de emisión de fluorescencia y provoca un *desplazamiento del $\lambda_{m\acute{a}x}$ hacia el rojo* de 2 nm (a valores de 331 y 333 nm, respectivamente).

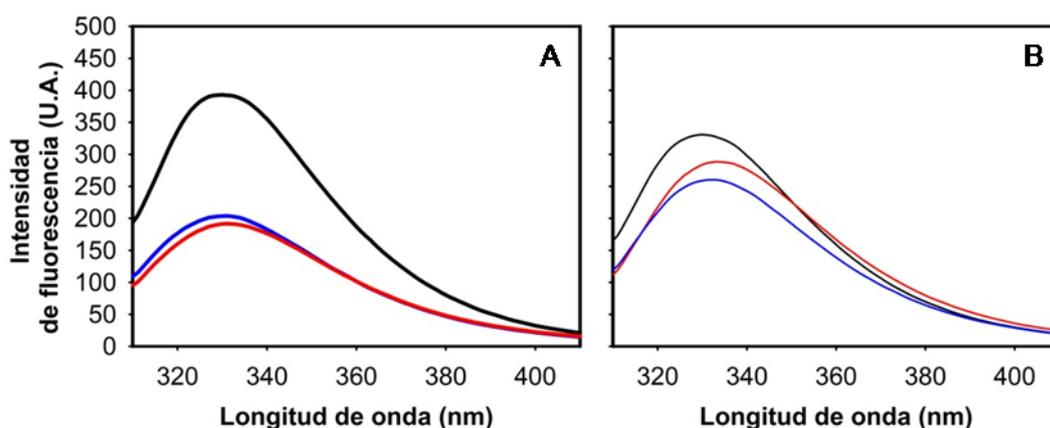


Figura 4.19. Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de IFABP, $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$ a 0 (A) y 10 (B) % v/v TFE.

Resulta importante destacar que *los cambios inducidos por TFE en la estructura de $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$ son reversibles*. Esto fue comprobado tanto por CD (Figura 4.20) como por fluorescencia intrínseca (datos no mostrados) luego de dializar las proteínas durante toda la noche en buffer PN8.

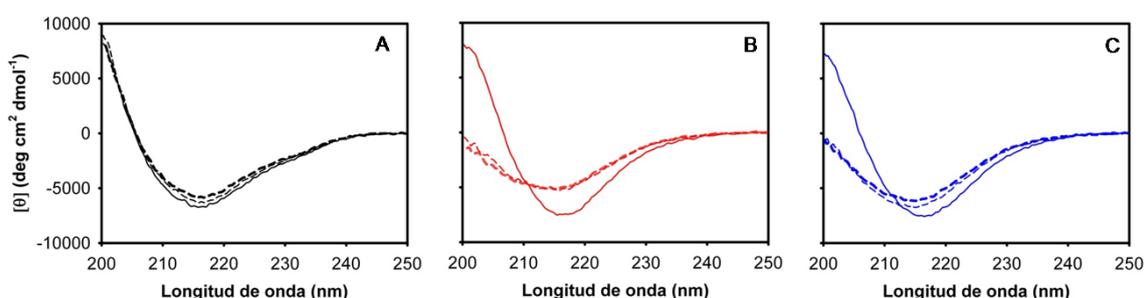


Figura 4.20. Espectros de CD en la zona UV lejana para IFABP (A), $\Delta 98\Delta$ (B) y $\Delta 78\Delta$ (C) a 0 % v/v TFE (línea fina discontinua), a 10 % v/v TFE (línea fina continua) y 10 % v/v TFE luego de dializar exhaustivamente contra buffer PN8 (línea gruesa discontinua).

EVALUACIÓN DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL POR ^1H NMR

La resonancia magnética nuclear es un fenómeno físico por el cual ciertos elementos tales como el hidrógeno (^1H , espín nuclear $\frac{1}{2}$) pueden absorber selectivamente energía electromagnética de radiofrecuencia al ser colocados bajo un potente campo magnético. La ventaja del hidrógeno como núcleo es que, además de ser muy abundante (99.99%), tiene una alta sensibilidad intrínseca (valor elevado de la constante giromagnética: $\gamma = 26.75 \times 10^7$ rad/sT). En forma práctica, esta determinación *no requiere enriquecer isotópicamente la proteína*. Un espectro monodimensional (1D) de protones (^1H) contiene gran cantidad de información de desplazamiento y acoplamiento químico, y es el punto de partida para la mayoría de las determinaciones de la estructura tridimensional.

Se realizó un espectro monodimensional (1D) de ^1H NMR (Figura 4.21) para cada una de las proteínas en ausencia o en presencia de TFE. Se muestra sólo la región de los protones amídicos. Se puede apreciar que, a diferencia de IFABP, a 0 % v/v TFE, las variantes abreviadas poseen un espectro poco poblado en la zona que va de 8.5 a 11 ppm y la coexistencia de señales agudas y otras ensanchadas. Consistentemente con los demás datos espectrales, el agregado de TFE a la proteína madre no produce grandes cambios en el espectro. Por el contrario, al incubar $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$ en 10 % v/v TFE, se observa un espectro con mayor cantidad y definición de picos, aunque resultan no tan agudos y resueltos como los de la proteína madre, lo que indicaría diferenciación mayor para los entornos que ocupan protones amídicos, hecho coherente con la ganancia de estructura.

Además, para las variantes abreviadas en 10 % v/v TFE, aparece una señal alrededor de 10 ppm. Si bien las señales en un espectro de ^1H no son inmediatamente identificables, posiblemente ésta corresponda al Trp82, debido a que se halla donde aparece habitualmente la señal del protón del NH indólico del triptófano, por lo que podría corresponder con el desplazamiento químico observado para el mismo en la proteína madre. Este último indicio indicaría que el entorno molecular del Trp en las tres proteínas podría ser similar.

Una vez más, la información estructural aquí presentada da cuenta de la consolidación estructural de ambas variantes abreviadas tras el agregado del cosolvente.

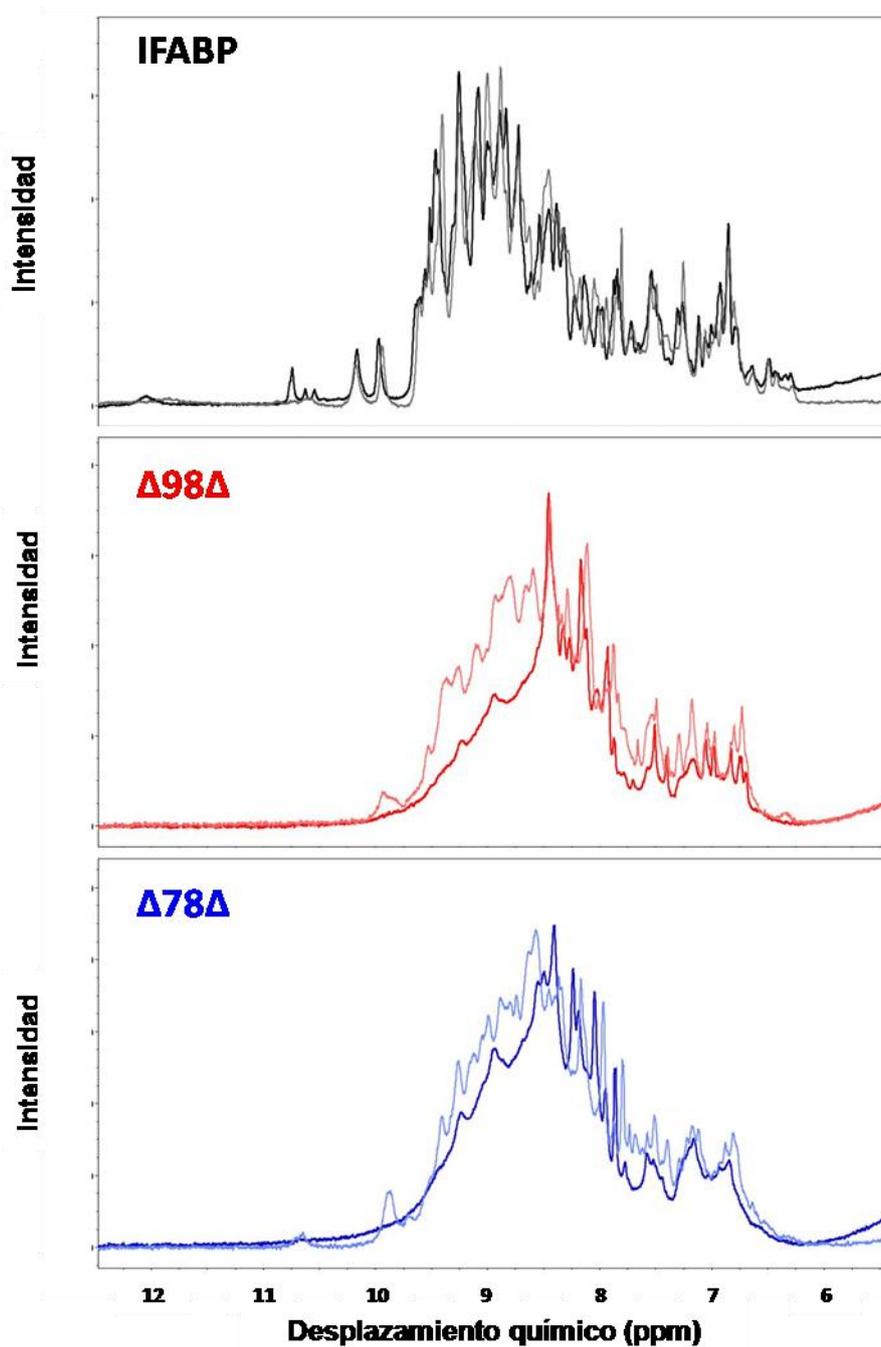


Figura 4.21. Espectro de ^1H NMR monodimensional (1D) de IFABP, $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$ a 0 (—) y 10 (---) % v/v TFE.

PROTEÓLISIS LÍMITADA

A fin de estudiar el impacto de TFE en la flexibilidad de estas proteínas, se llevaron a cabo experimentos de proteólisis limitada. Como es sabido, la proteólisis limitada es una aproximación experimental al análisis de la conformación proteica basada en el hecho de que un evento proteolítico no sólo dependerá de la especificidad intrínseca de la proteasa por su sustrato sino también de la estereoquímica y flexibilidad de la proteína sustrato. En ese sentido, para que la digestión ocurra, la cadena polipeptídica deberá poder unirse y por ende adaptarse a la estereoquímica específica impuesta por el sitio activo de la proteasa [Schechter y Berger, 1967]. Si bien las proteínas bien plegadas presentan cierta resistencia aumentada a la proteólisis con respecto a las proteínas totalmente desplegadas o mal plegadas, preservan aún regiones lo suficientemente flexibles como para ser susceptibles de proteólisis.

Para llevar a cabo estos experimentos, se recurrió a diferentes proteasas. En una primera instancia, se utilizó clostripaína, la misma proteasa utilizada originalmente en nuestro laboratorio para obtener ambas variantes abreviadas. Sin embargo, dada la alta especificidad y la escasa cantidad de sitios de corte que presenta esta enzima, podría no resultar tan útil y presentar un sesgo en los resultados. Por ello, se decidió incorporar otras dos proteasas con mayor probabilidad de sitios de corte: quimotripsina, que cliva preferentemente uniones peptídicas cuyo carbonilo pertenece a residuos aromáticos; y proteinasa K, que es totalmente inespecífica.

Luego de incubar las tres proteínas con cada proteasa en ausencia o en presencia de 10 % v/v TFE a 30 °C, las mezclas de digestión enzimática fueron separadas utilizando SDS-PAGE (Figura 4.22). Los resultados mostraron que las variantes abreviadas resultan más resistentes a la degradación en presencia de 10 % v/v TFE indicando así una reducción de la flexibilidad conformacional. El mismo resultado se obtiene para las tres proteasas. Esto es consistente con la consolidación estructural puesta de manifiesto por los espectros de CD (Figura 4.16B y C).

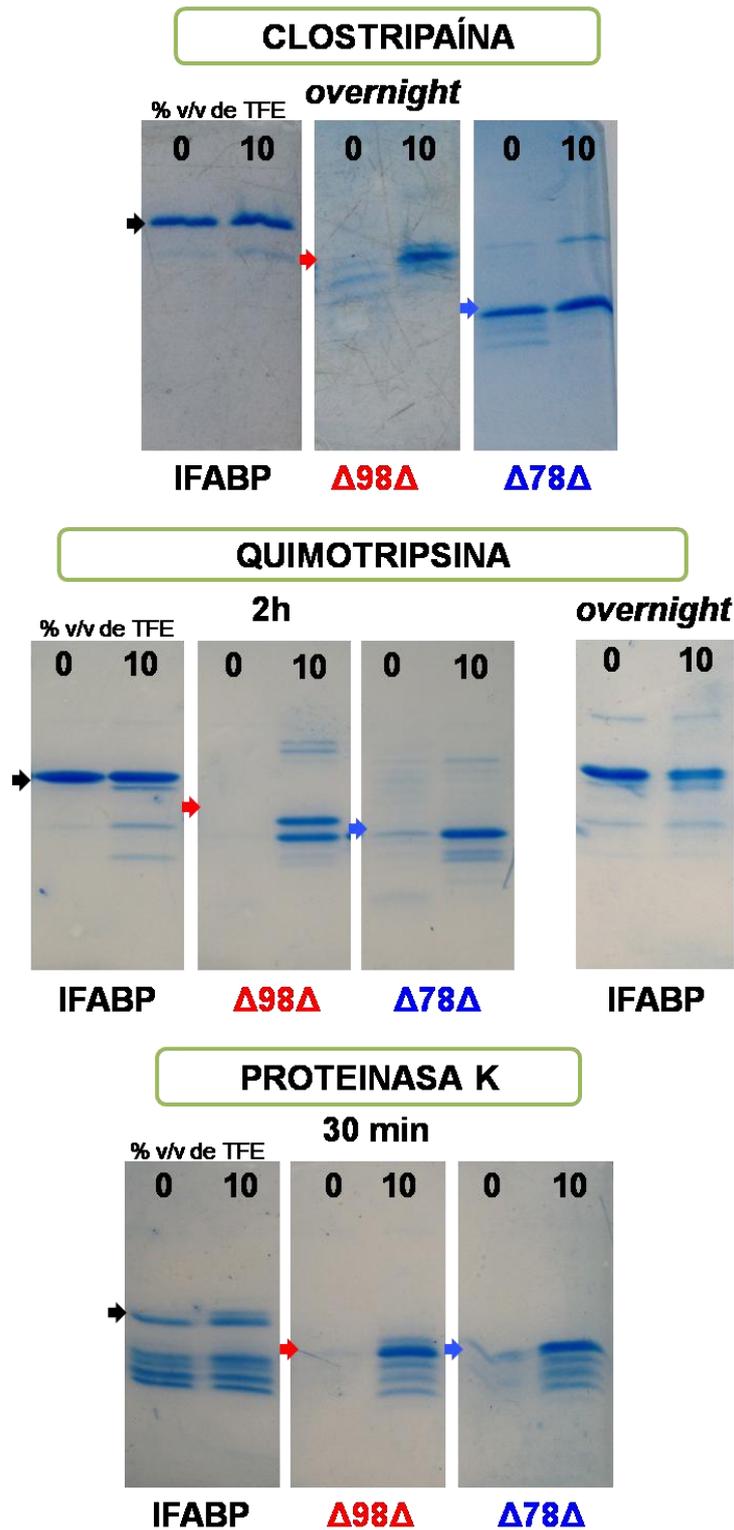


Figura 4.22. Patrón de proteólisis limitada de IFABP, $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$ a 0 o 10 % v/v TFE (30 °C). En cada SDS-PAGE se sembraron muestras obtenidas tras digestión con diferentes proteasas: clostripaína a una relación 20:1 de masa de proteína/proteasa; quimotripsina a una relación 200:1 de masa de proteína/proteasa (*panel izquierdo*) y de 20:1 (*panel derecho*); proteinasa K, a una relación 200:1 de masa de proteína/proteasa.

Con flechas se indica la posición de las proteínas originales.

Para la proteína de longitud completa, el tratamiento con clostripaína, proteinasa K y quimotripsina durante 2 h no muestra diferencias apreciables en el patrón de digestión, por lo que se utilizó un tratamiento más energético con quimotripsina a una relación 20:1 (masa de proteína:proteasa), durante toda la noche (*overnight*). En esta nueva situación, se observa que la banda del gel correspondiente a la proteína que se incubó en 10 % v/v TFE resulta más tenue. Este comportamiento es similar al observado para otras proteínas nativas, tales como α -lactalbúmina, albúmina de suero bovino y lisozima. Las mismas *se digieren más fácilmente en presencia de TFE* (Figura 4.23). Teniendo en cuenta la conservación de la forma e intensidad de los espectros de CD para IFABP en presencia de TFE (Figura 4.16A), el cosolvente podría estar favoreciendo la interacción de la proteína de largo completo con la proteasa.

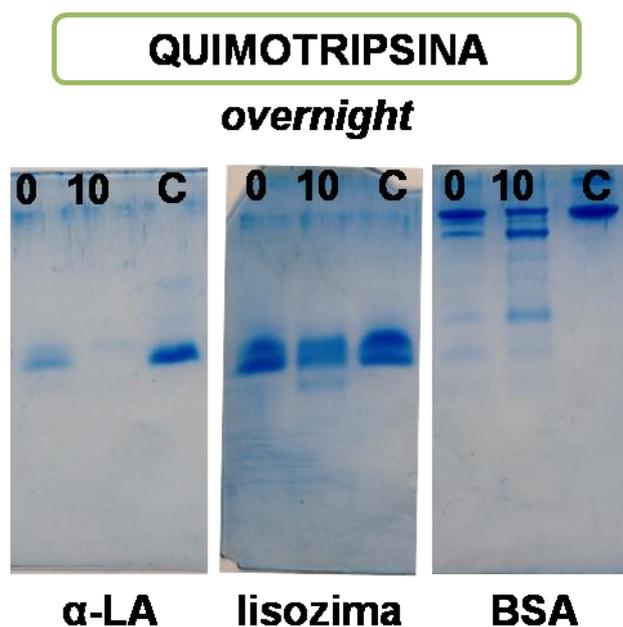


Figura 4.23. Patrón de proteólisis limitada con quimotripsina en una relación 10:1 de masa de proteína/proteasa, por incubación *overnight* a 30 °C, de α -lactalbúmina (α -LA), lisozima y seroalbúmina bovina (BSA) a 0 o 10 % v/v TFE. Se adicionó una calle patrón (C, control) donde se muestran las proteínas sin digerir.

Si bien ha sido informado que la adición de hasta 15 % v/v TFE causa cambios menores en la estructura secundaria de la quimotripsina, pudiendo consecuentemente reducir su capacidad proteolítica [Hackl, 2014], los resultados obtenidos para IFABP muestran en contrario una mayor proteólisis en presencia de 10 % v/v TFE. De esta manera demostramos en este experimento control la conservación de la capacidad proteolítica en esta condición. De esta manera los cambios observables en el patrón de proteólisis serían atribuibles a cambios en la conformación de la proteína sustrato.

A continuación, se decidió evaluar el efecto del TFE sobre la conformación de $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$ poniendo atención en los eventos proteolíticos tempranos/iniciales. Se tomaron muestras a diferentes tiempos de digestión con quimotripsina y se analizó la mezcla de fragmentos obtenidos por espectrometría de masa. Del análisis de los datos colectados se deduce la existencia de un fragmento límite común a las tres proteínas (Figura 4.24).

Para $\Delta 78\Delta$ digerida en ausencia de TFE, después de 30 min de exposición se encontró sólo un péptido de 8366.9 Da (péptido correspondiente al fragmento 29-102 de IFABP). Este mismo péptido está presente en la muestra digerida en presencia de TFE, pero en esta condición, la señal principal corresponde al protómero intacto (8807.0 Da) indicando protección ante el desafío proteolítico. La variante $\Delta 98\Delta$ es más rápidamente digerida, razón por la cual se analizaron tiempos de incubación más cortos. En este caso, después de 5 min, junto con la proteína intacta (11089.6 Da), aparece un fragmento de 11055.7 Da (fragmento 29-117 de IFABP), que resulta ser el componente principal de la mezcla de digestión. Adicionalmente tanto en la proteína incubada en ausencia como en presencia de TFE -a 5 min y 12 min respectivamente- se encontró un péptido de 8367.6 Da. Este último es, de hecho, el mismo que aquel obtenido a partir de la digestión de $\Delta 78\Delta$. Destacablemente, este fragmento conserva todos los aminoácidos que pertenecen al núcleo hidrofóbico de la proteína.

Como se observa a partir de estos resultados, *no existe diferencia cualitativa* en el patrón de fragmentos proteolíticos obtenidos a 0 o 10 % v/v TFE, sino que se trata de variaciones cuantitativas en el rendimiento de cada fragmento. Como condición general, para *las variantes abreviadas en presencia de 10 % v/v TFE muestran una mayor resistencia a la digestión proteolítica.*

Notablemente, no se encontraron cortes proteolíticos ubicados en las cercanías del extremo N-terminal.

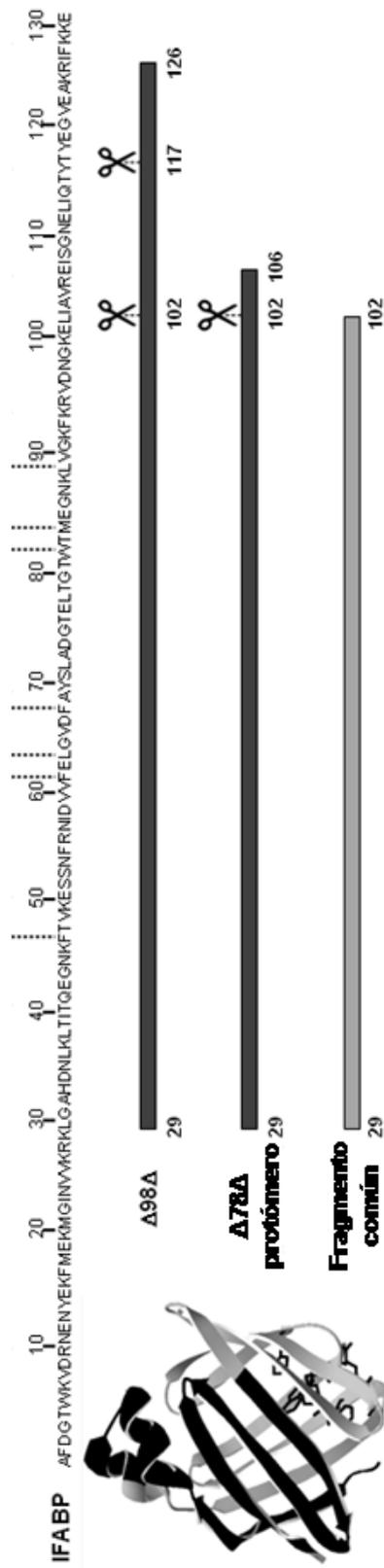


Figura 4.24. Secuencia aminoacídica de IFABP y por debajo representación de los segmentos correspondientes a las variantes abreviadas. Los residuos de aminoácidos que pertenecen al núcleo hidrofóbico de IFABP se indican con líneas de puntos y se representan con sus cadenas laterales en la representación de poli-tubo. Se representa también el fragmento proteolítico común obtenido después de la escisión por la quimotripsina. Este último también está pintado en color gris claro en el modelo 3D construida a partir de las coordenadas cristalográficas de la proteína de longitud completa (AP 2IFB).

ANÁLISIS DE LA PROPENSIÓN INTRÍNSECA AL DESORDEN

Con el propósito de identificar determinantes estructurales que promueven a la generación de especies propensas a la agregación, se realizó un análisis bioinformático que permitió revelar la posible presencia de segmentos desordenados en nuestras proteínas.

A pesar del hecho de que tanto las estructuras obtenidas por cristalografía de rayos X [Scapin y col., 1992; Sacchettini y col., 1992] como las obtenidas por NMR [Hodsdon y col., 1996; Hodsdon y Cistola, 1997] no revelan regiones significativamente desordenadas en IFABP, se analizó la proteína (UniProt FDI: P02693) con predictores de propensión intrínseca al desorden (PONDR® VL-XT, PONDR® VSL2 y PONDR-FIT, Figura 4.25).

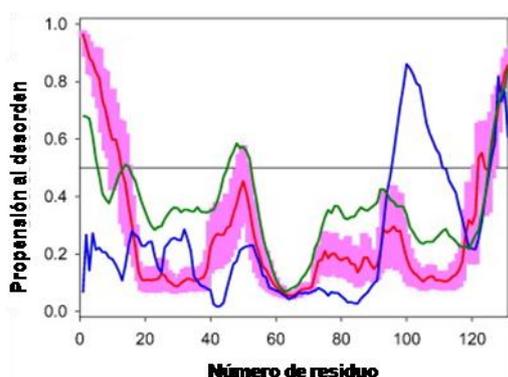


Figura 4.25. Análisis de IFABP con predictores de propensión intrínseca al desorden: PONDR® VL-XT (línea azul), PONDR® VSL2 (línea verde) y PONDR-FIT (línea roja). La sombra de color rosa alrededor de la curva PONDR-FIT representa la distribución del error estadístico.

En el caso de PONDR® VL-XT, dentro de la región C-terminal de IFABP predicha como desordenada está incluido un fragmento con una menor propensión al desorden, que se manifiesta como un valle centrado en el residuo 120. Además, PONDR® VSL2 informa la existencia de un valle cercano al extremo N-terminal de la proteína (centrado en el residuo 9). Por lo general, estos valles corresponden a potenciales sitios de unión [Oldfield y col., 2005; Cheng y col. 2007]. Además, la presencia de tales sitios se evaluó por la herramienta MoRFPred [Disfani y col., 2012], que es el principal predictor de regiones de reconocimiento molecular (MoRF). Este análisis reveló la existencia de MoRFs en los residuos 8-13 y 118-131. Otro MoRF se predijo en la región 60-68, que coincide con el segmento amiloidogénico central. Es

destacable el hecho que la mayor parte de la cola C-terminal predicha como desordenada se conserve en $\Delta 98\Delta$, mientras que ambas desaparezcan en $\Delta 78\Delta$.

Notablemente, de acuerdo con este análisis, las regiones N y C-terminales (~15 primeros residuos y ~30 últimos residuos, respectivamente) de IFABP se prevén como aquellas con mayor tendencia al desorden.

ANÁLISIS DE LA PROPENSIÓN A FORMAR HÉLICES- α

YASPIN [Lin y col., 2005] y Jpred [Drozdetskiy y col., 2015] son algunos de los métodos más confiables para la predicción de estructura secundaria. Jpred funciona mediante la combinación de resultados de varios métodos para generar un consenso. Por otro lado, Jpred construye un alineamiento múltiple de secuencia a partir de la secuencia a analizar. Además, hace predicciones de regiones accesibles al solvente y *coiled-coil*. YASPIN utiliza el algoritmo de PSI-BLAST para obtener una matriz de puntajes para cada posición específica de la secuencia de entrada, que después utiliza para realizar su predicción. Los predictores clasifican cada residuo de aminoácido como perteneciente a estructuras secundarias de tipo hélice α ("H"), hoja β ("E", por *extended*) o no H o E ('-').

En la Figura 4.26 se muestran los resultados obtenidos tras analizar el segmento 93 a 131 de IFABP. Para evitar efectos de borde, teniendo en cuenta que el aminoácido 102 corresponde al último sitio de corte de la proteasa quimotripsina observado por espectrometría de masa, se eligió ensayar el segmento desde el aminoácido 93, que corresponde al siguiente sitio de corte de la proteasa. Este sector correlacionaría con regiones que son más móviles en la conformación nativa de las variantes abreviadas, y estaría mayormente estructurado en presencia del cosolvente.

	100	110	120	130
Sequence:				
	FKRVDNGKELTAVREISGNELIQTYTYEGVEAKRIFKKE			
Experimental structure:	EEEE---EEEEEEEEEE-EEEEEEEEEE-EEEEEEEEEE			
J-Pred algorithm:	-----EEEEEEEEEE-----EEEEEE-----HHHHHH-----			
Yaspin algorithm:	-----EEEEEEEEEE-----EEEEEEEEEE-HHHHHH-----			

Figura 4.26. Predicción de elementos de estructura secundaria para el segmento C-terminal de IFABP (93 a 131) obtenida como resultado de los algoritmos Jpred y YASPIN. E y H representan conformaciones de hoja β *extended* y helicoidales, respectivamente. Los guiones corresponden a posiciones en las que no se puede predecir estructura secundaria definida.

ESTADO DE AGREGACIÓN Y COMPACTACIÓN

Los cambios en las propiedades hidrodinámicas de las proteínas como consecuencia del desafío con el cosolvente TFE se estudiaron mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC-FPLC). Aquí, la separación se consigue utilizando como fase estacionaria una matriz porosa. En principio, la accesibilidad de las moléculas a los poros de la fase estacionaria depende de su tamaño. Así, las moléculas más grandes interactúan menos con la fase sólida, son excluidos y, por ende, son menos retenidas por la columna. Contrariamente, las moléculas más pequeñas pueden penetrar a través de los poros, haciéndose “más largo” su recorrido dentro de la matriz y, consecuentemente, presentando un mayor volumen de elución. Las moléculas, eluirán entonces de acuerdo con su radio de Stokes, que se define como el radio promedio de una esfera compacta que difunda en forma equivalente al soluto.

Datos previos de nuestro laboratorio indican que los valores del radio de Stokes de las variantes abreviadas resultan más grandes que los predichos para proteínas globulares del mismo peso molecular [Curto y col., 2005; Franchini y col., 2009]. Este comportamiento puede deberse a que -en realidad- adoptan forma asimétrica o se trata de proteínas expandidas.

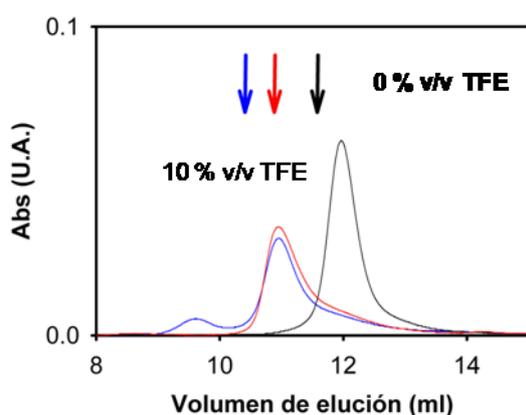


Figura 4.27. Cromatografía de exclusión molecular de IFABP, $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$ a 10 % v/v TFE (—) llevada a cabo en una columna Superdex-75. Las flechas indican el volumen de elución de cada proteína a 0 % v/v TFE.

En la Figura 4.27 pueden verse superpuestas secciones de los perfiles de elución de las tres proteínas. En ese mismo gráfico se indica mediante flechas los volúmenes de elución observados en ausencia de TFE. Tal como se muestra, el radio hidrodinámico de IFABP y $\Delta 78\Delta$ se reduce significativamente en presencia de TFE. Esto último, nos indicaría que el TFE estaría ocasionando la compactación de estas estructuras. Sin embargo, en el caso de $\Delta 98\Delta$, no se observa mayor cambio en el volumen de elución.

Para confirmar que no se produjeran cambios en el estado de oligomerización de las proteínas a 10 % v/v TFE, se utilizó un detector de dispersión de luz estática en línea con la columna de exclusión molecular. La dispersión de luz estática permite estimar el peso molecular absoluto de una molécula mediante la relación física que existe entre la intensidad de la luz dispersada por una molécula y su peso molecular (*Rayleigh scattering*). Los resultados obtenidos indican que tras el agregado de TFE, las tres proteínas mantienen el estado oligomérico que presentaban en ausencia del cosolvente: esto es, IFABP y $\Delta 98\Delta$ resultan monoméricas, y $\Delta 78\Delta$, dimérica (datos no mostrados).

APAGAMIENTO DE LA FLUORESCENCIA

Para evaluar la accesibilidad del solvente al núcleo de la proteína, donde reside el residuo W82, se investigó el apagamiento (*quenching*) de la fluorescencia intrínseca tras el agregado de concentraciones crecientes de acrilamida. El fenómeno de *quenching* se refiere a los distintos procesos (reacciones de los estados excitados, transferencia de energía, formación de complejos o colisiones) que provocan una disminución de la emisión de fluorescencia de un fluoróforo determinado, en este caso, el grupo indol del triptofano. Los fenómenos de apagamiento se pueden clasificar en dos grandes grupos: dinámicos (dado por colisión entre moléculas) o estáticos (debido a formación de complejos). Hay numerosas sustancias capaces de actuar como apagadores (*quenchers*) de la fluorescencia, entre ellas la acrilamida. Ésta molécula orgánica presenta insaturaciones, pequeña, neutra y soluble en medio acuoso. Dadas sus características, es muy utilizada para analizar el grado de exposición al solvente de residuos aromáticos proteicos. Por ende, aquellos Trp que se encuentren ocultos del solvente serán menos accesibles a las moléculas de acrilamida y, por consiguiente, afectados en menor medida que otros Trp expuestos al solvente.

Una solución concentrada de acrilamida fue adicionada a soluciones proteicas - en ausencia o en presencia de TFE- midiéndose la fluorescencia intrínseca remanente. En cada caso, se graficó el cociente entre la intensidad de fluorescencia en ausencia o en presencia del apagador (F_0/F) en función de la concentración del agente apagador (gráfico de Stern-Volmer) (Figura 4.28).

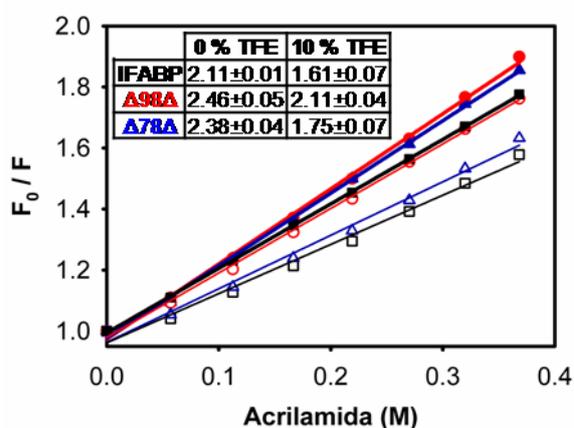


Figura 4.28. Gráfico de Stern-Volmer realizado a 25 °C para IFABP, A98A y A78A a 0 (símbolos llenos) y 10 (símbolos vacíos) % v/v TFE con el agente *quencher* acrilamida. La tabla inserta presenta los valores de las pendientes de cada gráfico (constantes de Stern-Volmer).

Para cada conjunto de datos experimentales, se ajustó una ecuación que describe un comportamiento lineal (en ningún caso se observó desviación significativa de la linealidad) y se obtuvo el valor de la pendiente y su desvío estándar. Dichos valores, representan la constante de Stern-Volmer (K_{sv}), el parámetro que cuantifica el grado de accesibilidad del apagador al fluoróforo.

Los datos obtenidos muestran que las K_{sv} resultan más bajas en presencia de TFE, revelando accesibilidad reducida del solvente al Trp82, residuo que se encuentra ubicado en el núcleo hidrofóbico. Estos resultados guardan coherencia con los presentados en la Figura 4.27, presumiendo que la compactación de estas proteínas sería la responsable de la menor accesibilidad al solvente del núcleo. Una vez más, la adición del cosolvente ejerce un mayor efecto sobre $\Delta 78\Delta$ y IFABP (~25 y 15% de disminución de los valores de K_{sv} , respectivamente) que sobre $\Delta 98\Delta$.

Para descartar cualquier efecto trivial del cosolvente se realizó un experimento similar utilizando NATA, que reveló idéntica a 0 y 10 % v/v TFE (Figura 4.29).

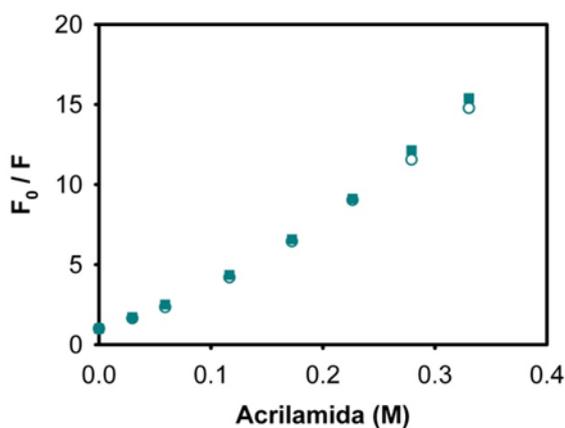


Figura 4.29. Gráfico de Stern-Volmer realizado a 25 °C para NATA a 0 (símbolos llenos) y 10 (símbolos vacíos) % v/v TFE con el agente *quencher* acrilamida.

UNIÓN DE ANS

Para comprender el impacto de los cambios inducidos por TFE sobre la exposición de zonas hidrofóbicas al medio acuoso, se llevaron a cabo experimentos de unión de ANS (ácido 8-anilino 1-naftalen sulfónico) a las tres proteínas.

El ANS es una sonda fluorescente ampliamente utilizada para detectar sitios de unión con carácter hidrofóbico en diferentes proteínas. Su utilidad radica en que su rendimiento cuántico se incrementa conforme aumenta la hidrofobicidad del entorno en el que se encuentra, observándose además un desplazamiento al azul del máximo de emisión de fluorescencia. A diferencia de la mayoría de las proteínas nativas, las proteínas de la familia IFABP son capaces de unir ANS dentro de la cavidad de unión al ligando. Sin embargo, difieren en su comportamiento frente al desplazamiento con el ligando natural: ácido oleico (18:1). Para la proteína madre, se observa un desplazamiento completo del ANS por parte del ácido oleico, mientras que para las variantes abreviadas se observa que una cantidad considerable de ANS permanece unida, incluso en presencia de un gran exceso de ácido graso. Esta observación reveló la existencia de otro sitio de unión no desplazable, ausente en la proteína de longitud completa [Yeh y col., 2001; Curto y col. 2005; Curto y col., 2009].

Para llevar a cabo los experimentos, se adicionó ANS (25 μM) a una solución proteica (2 μM) en buffer PN8 en ausencia o en presencia de 10 % v/v TFE. En la Figura 4.30, se observa que para IFABP en presencia de 10 % v/v TFE, la emisión de fluorescencia de ANS aumenta un 80%. A la inversa, para $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$, la presencia de TFE conduce a una reducción en la intensidad (~ 60 % y 80 %, respectivamente). De hecho, la reducción en el caso de $\Delta 78\Delta$ en 10 % v/v TFE es tal, que el espectro de emisión de ANS resulta casi indistinguible del blanco. Estas variaciones pueden estar vinculadas a modificaciones en la exposición de zonas hidrofóbicas, revelando así una disminución del área para $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$, y un aumento para IFABP en comparación con sus respectivas áreas hidrofóbicas expuestas en ausencia de TFE. Como se muestra en Figura 4.30, con el fin de revelar la unión del ANS a sitios no desplazables por el ligando ácido graso, se adicionó una cantidad en exceso de ácido oleico (en

relación molar 5:1 de ácido oleico con respecto al protómero de proteína). En presencia de TFE, la fluorescencia residual de ANS unido a IFABP representa el 44 % de la señal original, hecho que podría indicar la aparición de un nuevo sitio de unión no desplazable en la proteína madre. Bajo las mismas condiciones, se sigue observando el sitio no desplazable de $\Delta 98\Delta$, mientras que $\Delta 78\Delta$ ya no sería capaz de unir ANS. En consecuencia, para este último, la adición de ácido oleico no cambia el espectro de emisión.

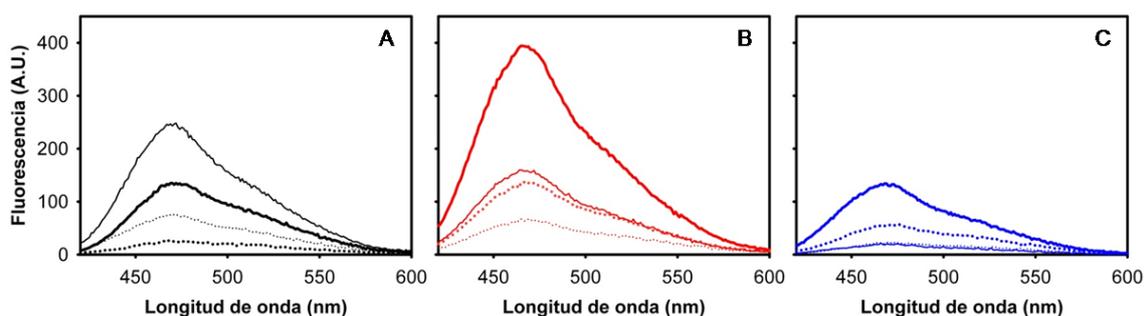


Figura 4.30. Espectros de emisión de fluorescencia del ANS unido a IFABP (A), $\Delta 98\Delta$ (B) y $\Delta 78\Delta$ (C) en ausencia (línea gruesa) o en presencia de 10 (línea fina) % v/v TFE. En línea punteada se muestran los espectros obtenidos luego del agregado de ácido oleico en una relación molar 5:1 con respecto a las proteínas.

UNIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

La evidencia directa de unión de ácidos grasos utilizando espectroscopia de CD proviene principalmente de dos enfoques experimentales: (i) los cambios conformacionales experimentados tras la unión del ácido oleico a las proteínas y, (ii) las bandas inducidas de ácido *trans*-parinárico promovidas por el ambiente asimétrico del sitio de unión en las proteínas.

UNIÓN DE ÁCIDO OLEICO

El ácido oleico es un ácido graso natural monoinsaturado *cis* de 18 carbonos (18:1). Resultados anteriores de nuestro laboratorio muestran que la adición de ácido oleico a las variantes abreviadas, pero no a IFABP, ejerce un efecto inductor del orden [Curto y col., 2005; Franchini y col., 2009]. En los espectros de CD en la región UV lejana, este efecto puede ser visto como un aumento en la intensidad de la banda negativa centrada a ~216 nm (Figura 4.31, *izquierda*). En presencia de 10 % v/v TFE para las tres proteínas se observa un incremento en la magnitud de esta banda y tras la unión del ligando, un ensanchamiento en el rango de 215 a 235 nm. En resumen, independientemente de la presencia del cosolvente, IFABP, $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$ son capaces de unir ácido oleico. Es destacable que en esta condición $\Delta 78\Delta$, aun siendo incapaz de unir ANS en su cavidad, retenga efectivamente la capacidad de unir su ligando natural.

Las perturbaciones en el entorno de los residuos aromáticos debidas a la unión del ácido graso pueden ser detectadas mediante el estudio de los cambios espectrales en la región UV cercana. En condiciones nativas, el efecto inductor del ligando también puede ser visto por CD en la región UV cercana como una intensificación de las señales espectrales (Figura 4.31, *derecha*). En presencia de TFE, sólo se observan cambios menores como consecuencia de la unión del ácido oleico a la proteína. Por otra parte, independientemente del orden de adición (TFE + ácido oleico o viceversa), los espectros finales resultan indistinguibles, hecho que señala la situación de equilibrio del sistema (datos no mostrados).

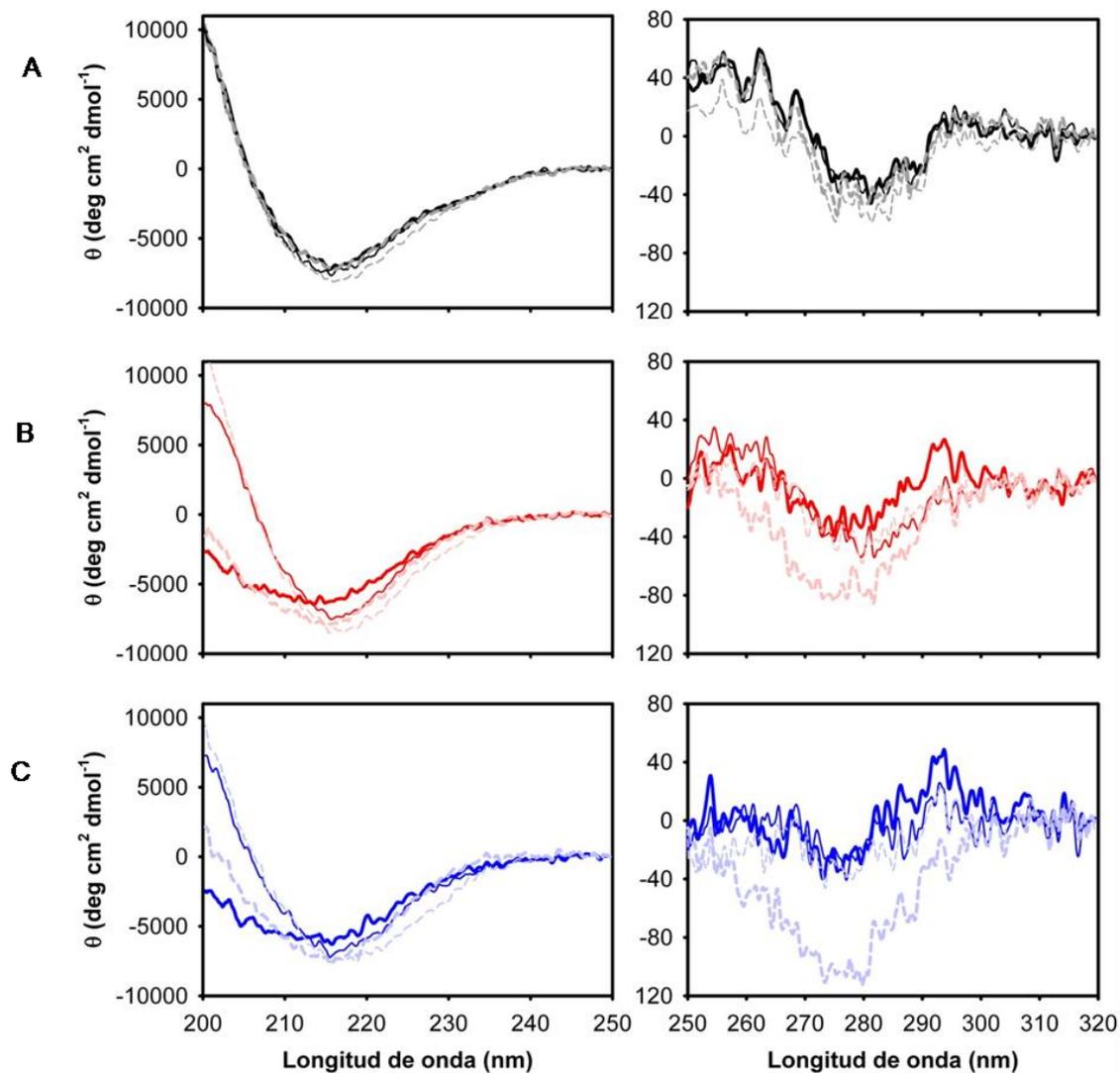


Figura 4.31. Espectros de CD en la región UV lejana (*izquierda*) y cercana (*derecha*) tras la unión de ácido oleico a IFABP (A), $\Delta 98\Delta$ (B) y $\Delta 78\Delta$ (C), a 0 (línea gruesa) y 10 (línea fina) % v/v TFE. Los espectros en presencia de ácido oleico se representan con línea punteada de color claro.

UNIÓN DE ÁCIDO TRANS-PARINÁRICO

El ácido *trans*-parinámico (t-PA) es un ácido graso natural poliinsaturado de 18 carbonos (18:4, todo *trans*) con propiedades espectroscópicas ventajosas que lo posicionan como una sonda muy útil en biofísica [Zsila y Bikádi, 2005]. Como puede verse en la Figura 4.32, el t-PA presenta varias bandas de absorción agudas y bien resueltas. Una de ellas se encuentra en la región UV cercana y está dada por una transición π - π^* intensa a más de 300 nm, región en la cual la mayoría de las proteínas apenas absorben luz [Zsila y Bikádi, 2005]. Asimismo, esta sonda fluorescente presenta un rendimiento cuántico y posición del espectro fuertemente dependientes de su entorno. El rendimiento cuántico aumenta marcadamente al pasar de un ambiente acuoso (buffer) a uno más hidrofóbico (el bolsillo de unión de la proteína). Este ligando, además de ser fluorescente, tiene la propiedad de inducir bandas dicroicas al situarse en un entorno quiral como consecuencia de su unión a proteínas. De este modo, el t-PA -que por sí solo carece de señal dicroica en solución- presenta transiciones ópticamente activas al unirse a proteínas, sirviendo éstos como señales para el estudio de dichos sitios [Zsila y col., 2004].

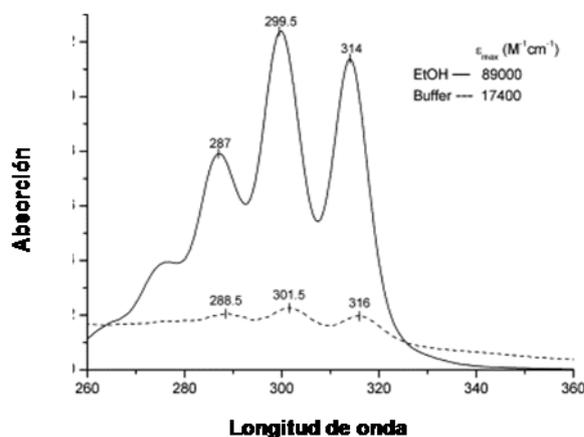


Figura 4.32. Espectro de absorción UV del t-PA a 25 °C en etanol y en buffer fosfatos 0.01 M (pH 7.29). Extraído de Zsila y Bikádi, 2005.

Se realizaron espectros de CD para las tres proteínas antes y después del agregado del ácido *trans*-parinámico en las dos regiones espectrales: UV lejana (Figura 4.33, izquierda) y cercana (Figura 4.33, derecha). Para las proteínas abreviadas, se observa una banda negativa centrada a ~247 nm y una banda positiva centrada a ~235 nm (Figura 4.33B y C) [Curto y col., 2009; Franchini y col., 2009]. Para IFABP (Figura 4.33A), aparecen adicionalmente tres bandas

débiles entre 290 y 320 nm. La presencia de un espectro fino estructurado de CD en la región UV cercana podría indicar la mayor rigidez del entorno de unión provisto por IFABP, capaz de crear un ambiente más asimétrico alrededor del ligando (Figura 4.33A, derecha). La presencia de 10 % v/v TFE conduce a varias modificaciones en la forma de los espectros: (i) la intensidad de la banda centrada a ~235 nm es mayor para IFABP y $\Delta 78\Delta$, mientras que la misma sufre un desplazamiento hacia el rojo en el caso de $\Delta 98\Delta$; (ii) para todas las proteínas, la banda centrada inicialmente a ~247 nm sufre un cambio dramático hacia el rojo (~13 nm), y adicionalmente, para IFABP y $\Delta 78\Delta$ se observa un aumento de su intensidad. En resumen, se demuestra un efecto inductor del t-PA sobre la estructura de las proteínas en presencia de TFE.

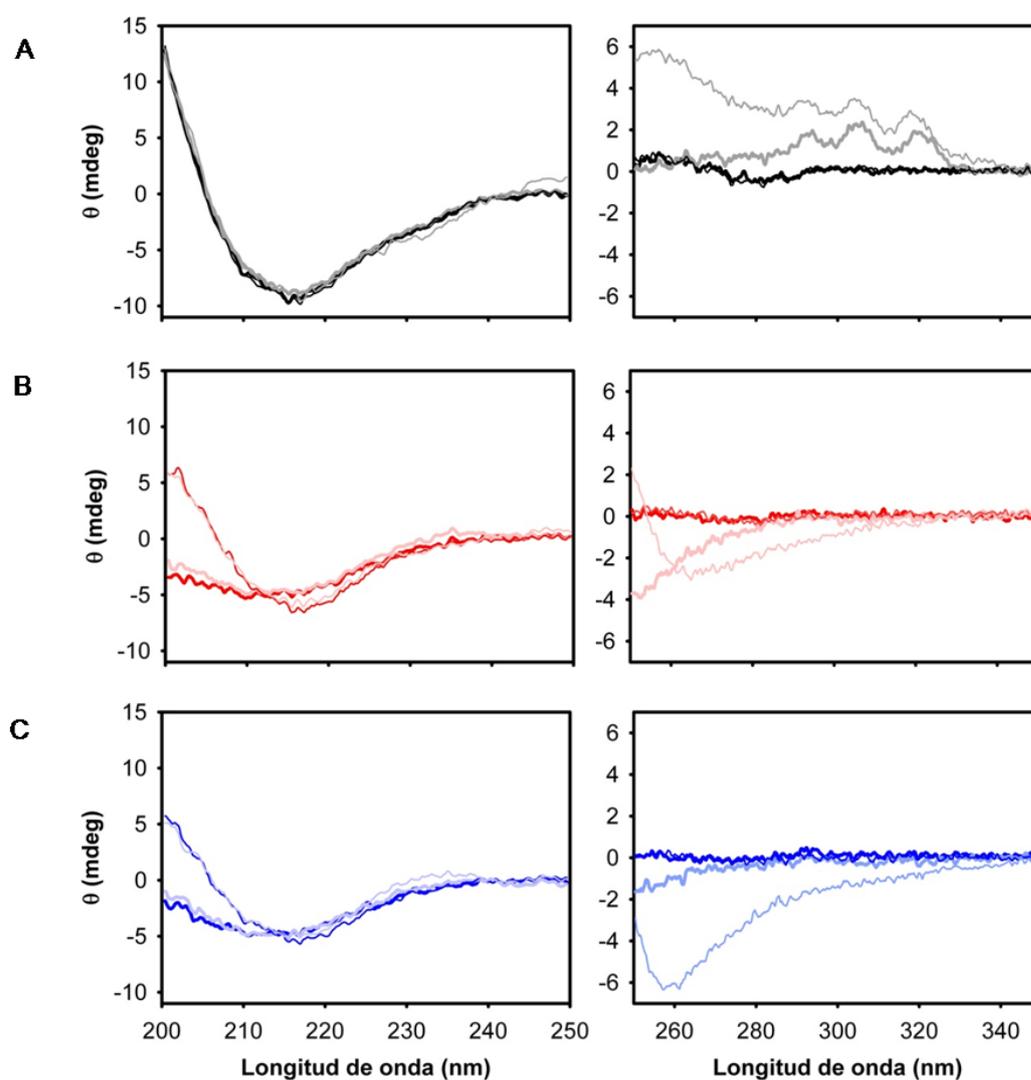


Figura 4.33. Espectros de CD en la región UV lejana (*izquierda*) y cercana (*derecha*) tras la unión de ácido *trans*-parinámico (t-PA) a IFABP (A), $\Delta 98\Delta$ (B) y $\Delta 78\Delta$ (C), a 0 (línea gruesa) y 10 (línea fina) % v/v TFE. Los espectros en presencia de t-PA se representan con línea clara.

ESTABILIDAD CONFORMACIONAL

Para comprender el impacto global del TFE sobre la estabilidad de estas proteínas, se realizaron los perfiles de desnaturalización inducidos por temperatura o agentes químicos tales como el cloruro de guanidinio o la urea.

DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA

Con el objeto de estudiar la transición conformacional inducida por temperatura, se monitoreó la caída en el valor absoluto de la elipticidad a 216 nm, longitud de onda que resulta sensible al contenido de estructura secundaria de tipo β . En consecuencia, se evaluó el efecto de la temperatura sobre soluciones proteicas (12 μM) en buffer PN8 tanto en ausencia como en presencia de 10 % v/v TFE. A los datos obtenidos en ausencia de TFE, se ajustó un modelo que describe una transición reversible de dos estados (Figura 4.34, izquierda). Los valores de la temperatura media de transición (T_m) obtenidos para IFABP, $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$ fueron 76, 64 y 67 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

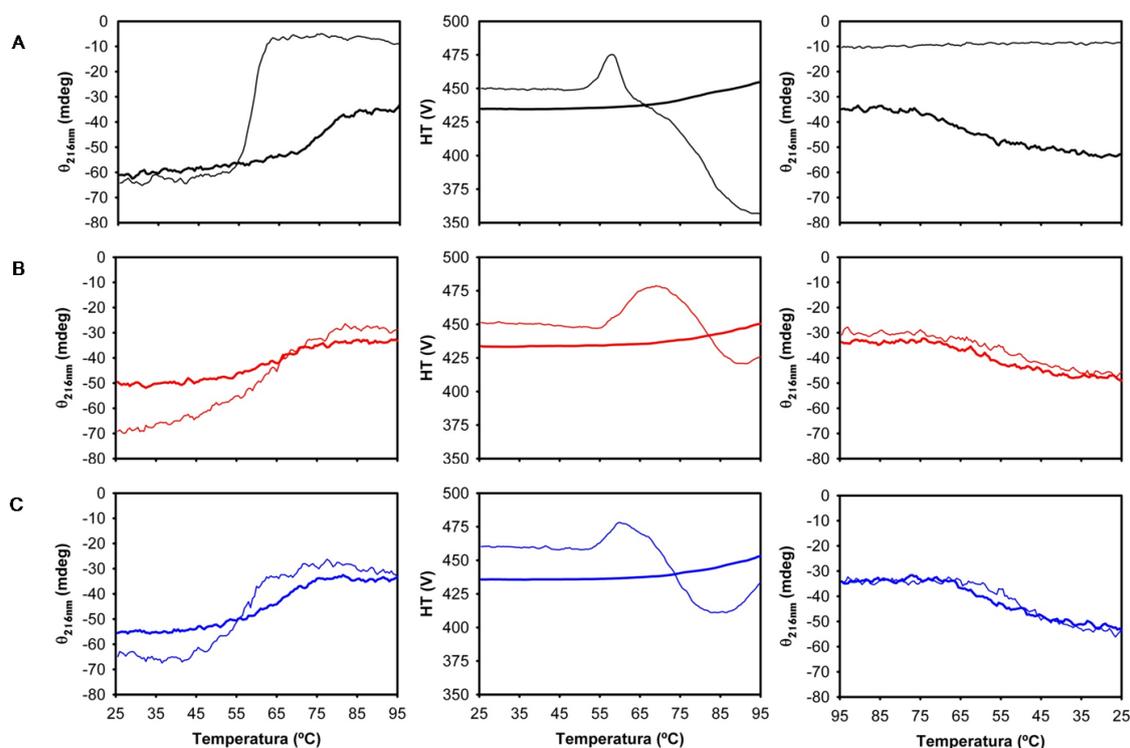


Figura 4.34. Desnaturalización térmica de IFABP y sus variantes. Evolución de la elipticidad a 216 nm (*izquierda*), tensión aplicada al dinodo (*centro*) y recuperación de la señal dicroica por enfriamiento (*derecha*) en función de la temperatura para IFABP (A), $\Delta 98\Delta$ (B) y $\Delta 78\Delta$ (C), a 0 (—) o 10 (---) % v/v TFE.

En presencia de TFE, un modelo de dos estados no resulta adecuado, ya que se observa la formación de agregados concomitantemente con la desnaturalización. Si bien la agregación es masiva en el caso de IFABP, la magnitud de este fenómeno resulta notablemente menor para las variantes abreviadas. El aumento en la tensión aplicada al dinodo revela la aparición de turbidez debida a la presencia de agregados proteicos (Figura 4.34, centro). Cabe aclarar que los espectrómetros de CD permiten registrar no sólo la absorción diferencial entre la luz circularmente polarizada derecha e izquierda, sino también la tensión del dínodo, que está dada por el voltaje aplicado al fotomultiplicador para compensar la reducción en la intensidad de la luz que llega al detector provocada por absorción o dispersión. De esta manera, este enfoque permite correlacionar adecuadamente la variación en la señal debida a cambios conformacionales con la agregación [Benjwal y col., 2006]. En la Figura 4.34, los datos mostrados en los paneles de la derecha permiten corroborar esto último: al proceder al enfriamiento de la muestra, la elipticidad de IFABP se mantiene invariante y próxima a cero; mientras que las muestras de $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$ alcanzan un valor de elipticidad cercano, aunque levemente inferior al del punto de partida previo al calentamiento. Para las variantes abreviadas, esta diferencia puede deberse a que la proporción menor de proteína que agregó por el calentamiento no sería capaz de retornar a su conformación nativa. Como la desnaturalización y la agregación ocurren concomitantemente, las transiciones resultan intrínsecamente irreversibles y no pueden ser analizadas por el modelo de dos estados empleado en ausencia de TFE. En tales casos, y como se muestra en la Figura 4.35, el parámetro que se utilizó fue *Ton* (por *onset-temperature*), que representa aquella temperatura para la cual se inicia la desnaturalización y consecuente agregación de las proteínas. Una menor *Ton* estaría relacionada con una disminución de la estabilidad, ya que corresponde a una reducción de la temperatura en que comienza el desplegamiento (y la agregación). Sorprendentemente, en presencia de 10 % v/v TFE, los valores resultan muy similares para las tres proteínas: 52, 57 y 54 °C para IFABP, $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$, respectivamente.

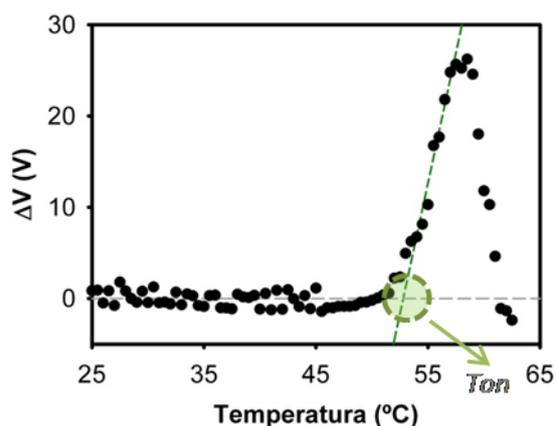


Figura 4.35. Cálculo de la temperatura de aparición de agregación (T_{on}). Este valor se obtiene después de ajustar una línea recta a los valores de voltaje medidos a temperaturas menores a aquella donde ocurre la transición y otra recta para los valores correspondientes a la propia transición. El valor de intersección de ambas rectas corresponde a T_{on} . El monocromador se fija en 216 nm. El voltaje aplicado al fotomultiplicador (HT) se representa en el eje de ordenadas como la diferencia (ΔV) con respecto al valor medido a 25 °C.

DESNATURALIZACIÓN QUÍMICA

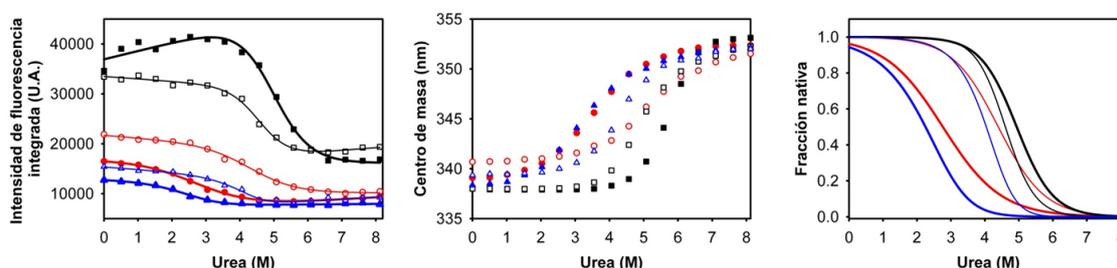
Se prepararon series de muestras individuales de concentración fija de proteína (12 μM) en buffer PN8 y creciente de caótropro (cloruro de guanidinio o urea) según corresponda. La transición conformacional en ausencia o en presencia de 10 % v/v TFE se monitoreó por la variación en la intensidad de la fluorescencia integrada en todo el rango de emisión.

Para todos los casos, por simplicidad se ajustó una ecuación que describe un modelo de dos estados [Santoro y Bolen, 1988] a los datos provenientes de los experimentos de fluorescencia. Dado que tanto los valores del centro de masa como de la longitud de onda del máximo de emisión no guardan una relación lineal con la fracción molar de proteína nativa o desnaturalizada [Monsellier y Bedouelle, 2005], no se procesaron subsecuentemente estos parámetros.

Datos previos de nuestro laboratorio [Curto y col., 2005; Franchini y col., 2009] revelaron que en buffer, ambas variantes abreviadas muestran una transición cooperativa siendo el orden de la estabilidad calculado con cloruro de guanidinio para las tres proteínas (a juzgar por la energía libre de desplegado $\Delta G^0_{\text{H}_2\text{O}}$): IFABP > $\Delta 78\Delta$ > $\Delta 98\Delta$.

Sorprendentemente, en presencia de urea (Figura 4.36) la estabilidad de ambas variantes en presencia de TFE aparenta aumentar, mientras que el valor de $\Delta G^0_{\text{H}_2\text{O}}$ para la proteína de longitud completa no presenta diferencias

significativas. El comportamiento diferente observado frente a cada caótopo, evidente en el caso de las variantes abreviadas, revela complejidades asociadas probablemente a la presencia de intermediarios en el proceso, esto es, no se trataría en realidad de una transición simple de dos estados. Aunque las pendientes de las curvas ajustadas en presencia de TFE resultan ligeramente más altas, las diferencias no son significativas. Vale destacar que en presencia del cosolvente, los puntos medios calculados para las transiciones son muy similares entre las tres proteínas: ~ 4.6, 4.4 y 4.0 M para IFABP, $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$, respectivamente, por comparación con los valores obtenidos en ausencia del TFE ~ 4.9, 2.8 y 2.3 M.



		IFABP	IFABP 10%	$\Delta 98\Delta$	$\Delta 98\Delta$ 10%	$\Delta 78\Delta$	$\Delta 78\Delta$ 10%
$\Delta G^0_{H_2O}$	kCal/mol	5.49±0.75	6.29±1.00	1.91±0.15	3.82±0.60	4.88±0.22	7.39±1.17
m	kCal mol ⁻¹ M ⁻¹	1.11±0.14	1.37±0.22	0.69±0.06	0.87±0.12	0.68±0.08	1.00±0.27

Figura 4.36. Desnaturalización con urea de IFABP, $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$ a 0 (símbolos llenos, línea gruesa) o 10 % v/v TFE (símbolos vacíos, línea fina). En el *panel A* se muestra la intensidad de fluorescencia total, en el *panel B* el centro de masa y en el *panel C* la fracción nativa en función de la concentración de urea. Debajo de la Figura se muestra una tabla con los valores de $\Delta G^0_{H_2O}$ y la pendiente (m).

A continuación, se llevaron a cabo experimentos para medir la transición inducida por cloruro de guanidinio (Figura 4.37). Frente a este agente desnaturante, IFABP y $\Delta 98\Delta$ exhiben una disminución en la estabilidad cuando se encuentran en presencia del cosolvente, mientras que se esboza un leve aumento en el caso de $\Delta 78\Delta$ muestra un leve aumento. Las pendientes de las curvas ajustadas en presencia de TFE disminuyen para las tres proteínas. Nuevamente, los puntos medios calculados para las transiciones a 10 % v/v TFE (1.1, 1.0 y 1.1 M para IFABP, $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$, respectivamente) resultan muy similares entre sí, en relación con aquellos obtenidos en ausencia del cosolvente: ~1.5, 1.0 y 0.7 M, respectivamente.

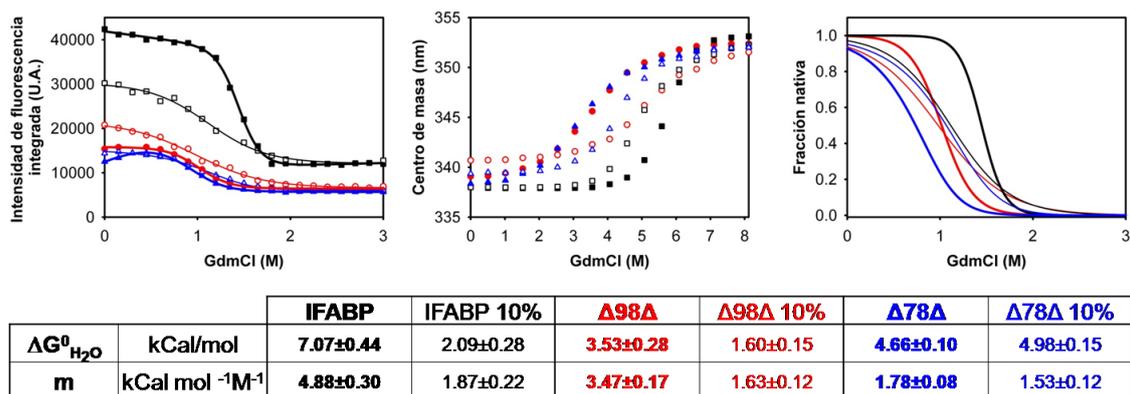


Figura 4.37. Desnaturalización con cloruro de guanidinio de IFABP, $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$ a 0 (símbolos llenos, línea gruesa) o 10 % v/v TFE (símbolos vacíos, línea fina). En el *panel A* se muestra la intensidad de fluorescencia total, en el *panel B* el centro de masa y en el *panel C* la fracción nativa en función de la concentración de cloruro de guanidinio.

Debajo de la Figura se informa una tabla con los valores de $\Delta G^0_{H_2O}$ y la pendiente (m).

En resumen, para ambos caótipos se observa un colapso en las curvas de desnaturalización a 10 % v/v TFE, esto es, *en presencia del cosolvente las curvas de las tres proteínas se asemejan entre sí en mayor medida.*

SECCIÓN 3: EVALUACIÓN DE LOS EVENTOS TEMPRANOS DEL PROCESO DE AGREGACIÓN

Finalmente, con el objetivo último de entender cuáles serían los eventos iniciales que llevan a la formación del núcleo de agregación, se estudiaron aquellos cambios que ocurren inmediatamente después de la adición de TFE hasta una concentración final de 25 % v/v y se compararon con la información estructural disponible medida a bajas concentraciones del cosolvente.

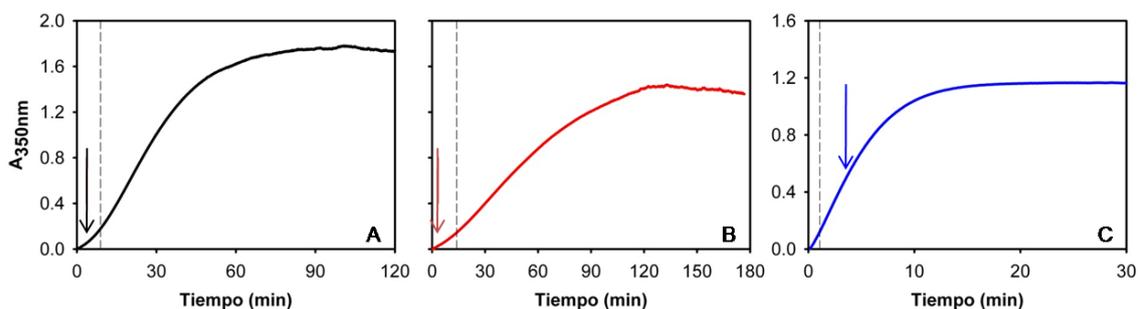


Figura 4.38. Cinéticas de agregación de IFABP (A), $\Delta 98\Delta$ (B) y $\Delta 78\Delta$ (C) a 25 % v/v TFE. Las soluciones proteicas (0.24 mg ml^{-1} , $20 \text{ }^\circ\text{C}$) fueron monitoreadas por la aparición de turbidez ($A_{350\text{nm}}$). Se indica en línea de puntos vertical el valor correspondiente a $A/A_{lim} \approx 0.1$. Los espectros de CD en las regiones UV lejana y cercana mostrados en las Figuras subsiguientes fueron medidos inmediatamente (al cabo de 3.53 min como máximo tiempo, indicado por flechas) después de diluir la proteína en 25 % v/v TFE

Se tomaron espectros de CD y de emisión de fluorescencia intrínseca antes e inmediatamente después del agregado del cosolvente. Con la intención de determinar la duración de la fase de latencia (*lag phase*, $A/A_{lim} \approx 0.1$, líneas de puntos en el gráfico) se realizaron cinéticas de agregación a 25 % v/v TFE (Figura 4.38) en las mismas condiciones de colección de datos espectrales. De este modo, pudimos estimar el tiempo óptimo de finalización de la colección de los espectros. Cabe destacar que en este caso los espectros son colectados mientras el proceso de agregación avanza en el tiempo, por lo que resulta necesario optimizar el rango total de tiempo para cada cinéticas. Se fijó la temperatura en $20 \text{ }^\circ\text{C}$ y se evaluó la evolución de la turbidez ($A_{350\text{nm}}$) a una concentración fija (0.24 mg ml^{-1}) de cada proteína. La temperatura elegida fue menor que la que habitualmente se emplea para experimentos de caracterización cinética ($25 \text{ }^\circ\text{C}$), de modo que fuese posible tomar espectros más cómodamente dentro del período de latencia. Es importante destacar que para esta nueva temperatura, también se verifica que cuando se escala

turbidez (A/A_{lim}) y tiempo ($t/t_{1/2}$), todas las cinéticas se superponen en una sola curva, a su vez, esta curva resulta idéntica a aquella obtenida previamente a 25 °C, confirmando nuevamente el hecho de que las tres proteínas presentan el mismo mecanismo de agregación.

Las soluciones proteicas adicionadas con TFE hasta una concentración final de 25 % v/v se evalúan inmediatamente por CD en ambas regiones espectrales (Figuras 4.39 y 4.40) y fluorescencia intrínseca (Figura 4.41).

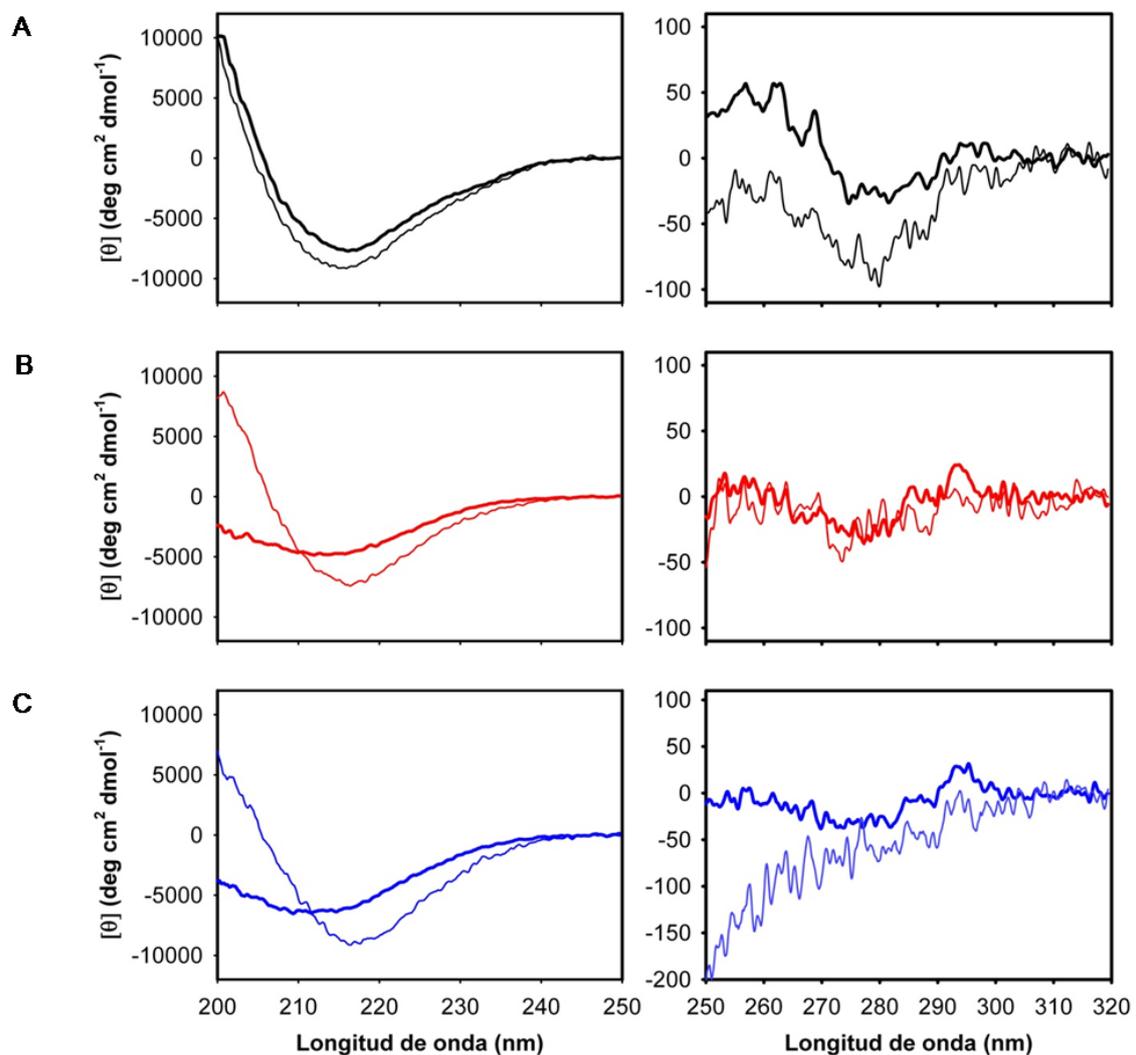


Figura 4.39. Espectros de CD en las regiones UV lejana (*izquierda*) y cercana (*derecha*) de IFABP (A), $\Delta 98\Delta$ (B) y $\Delta 78\Delta$ (C) en 0 % v/v TFE antes (línea gruesa) e inmediatamente después de diluir las proteínas en 25 % v/v TFE (línea fina).

En los paneles de la izquierda de la Figura 4.39 se observa que los espectros de CD en la región UV lejana cambian su forma en presencia de 25 % v/v TFE, adquiriendo un aspecto similar al que presentan las proteínas en presencia de 10 % v/v TFE (Figura 4.17 y 4.18). En el caso de los espectros en la región UV cercana (Figura 4.39, paneles de la derecha), si bien los espectros presentan ruido considerable, hecho que resulta de la colección de un único barrido espectral, la estructura fina aparece conservada. Particularmente para $\Delta 78\Delta$, el espectro en la región UV cercana podría estar influido por la presencia de fibras en la solución. El tiempo total de colección de datos de CD en la región UV cercana fue de ~ 4 min (indicado con flechas en la Figura 4.38). Como se puede apreciar, se debe tener en cuenta que la colección de datos espectrales para $\Delta 78\Delta$ concluye a tiempos mayores que el límite establecido de $A/A_{lim} \approx 0.1$, debido al hecho de que se trata de la variante con mayor velocidad de agregación. Por esta razón, se decidió reducir la concentración proteica y aumentar la tasa de colección de datos -de 20 nm min^{-1} a 50 nm min^{-1} - de modo tal que el proceso de agregación se enlentezca lo suficiente como para permitir una ventana temporal de trabajo más amplia dentro de la fase *lag* (Figura 4.40). A pesar del deterioro evidente de la señal, se observa que el espectro aparenta conservarse, al menos en tanto concierne a la región 270-320 nm.

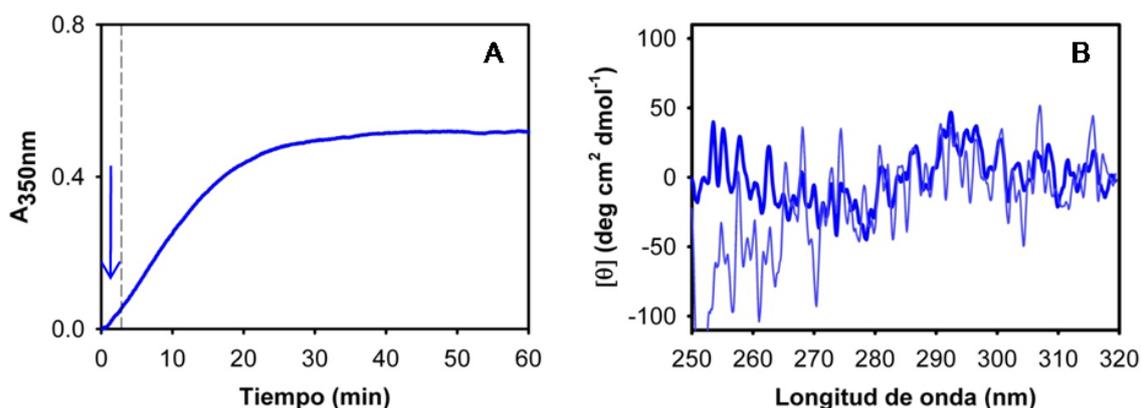


Figura 4.40. Cinéticas de agregación de $\Delta 78\Delta$ (0.12 mg ml^{-1} a $20 \text{ }^\circ\text{C}$) en 25 % v/v TFE seguidas por turbidez (A). Se indica en línea de puntos vertical el valor correspondiente a $A/A_{lim} \approx 0.1$. Los espectros de CD en la región UV cercana mostrados en el panel B fueron medidos inmediatamente después de diluir la proteína en 25 % v/v TFE dentro de los 1.4 min (valor indicado con una flecha azul). Cabe señalar el considerable ruido que afecta los datos espectrales por tratarse de una única colección sobre una muestra con baja concentración proteica.

En tanto a los espectros de fluorescencia intrínseca, en la Figura 4.41 se observa un descenso muy significativo en la intensidad de emisión de IFABP, mientras que para $\Delta 98\Delta$ verifica un leve aumento y corrimiento hacia el rojo del centro de masa. Una vez más, este resultado resulta similar al que se obtiene luego de exponer las proteínas a 10 % v/v TFE (Figura 4.20). Lo observado para $\Delta 78\Delta$ podría verse afectado por la posible presencia de fibras en la muestra. No obstante, esta proteína muestra un corrimiento hacia el rojo del centro de masa, sin intensificación del máximo de emisión.

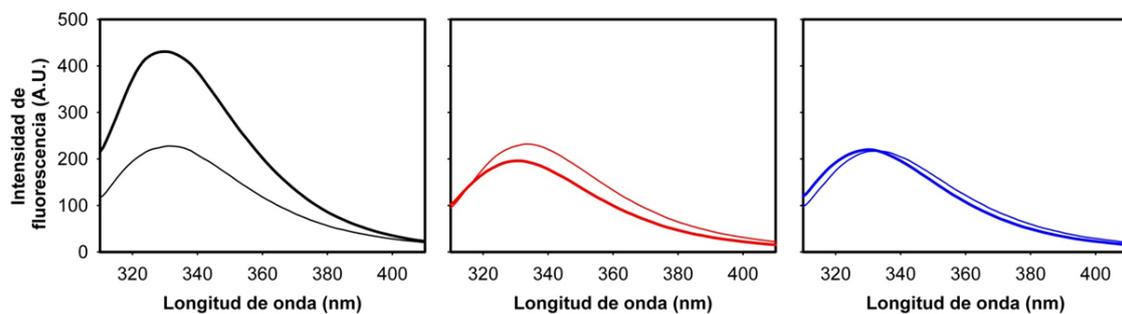


Figura 4.41. Intensidad de fluorescencia de IFABP (A), $\Delta 98\Delta$ (B) y $\Delta 78\Delta$ (C) en 0 % v/v TFE antes (línea gruesa) e inmediatamente después de diluir las proteínas en 25 % v/v TFE (línea fina).

Los resultados presentados en esta sección representan los primeros esfuerzos en el sentido de investigar con mayor profundidad las etapas tempranas del proceso de agregación. Dada la evidencia presentada aquí, indicativa de procesos que ocurren a gran velocidad, actualmente hemos iniciado experimentos mediante la técnica de *stopped flow* en colaboración con la Dra. Mónica Montes (IQUIFIB, UBA- CONICET) con la intención de dilucidar aspectos del fenómeno de agregación en la escala de milisegundos.

BIBLIOGRAFÍA

- Arighi, C. N., Rossi, J. P. F., y Delfino, J. M. (1998). Temperature-induced conformational transition of intestinal fatty acid binding protein enhancing ligand binding: a functional, spectroscopic, and molecular modeling study. *Biochemistry*, 37(47), 16802-16814.
- Benjwal, S., Verma, S., Röhm, K. H., y Gursky, O. (2006). Monitoring protein aggregation during thermal unfolding in circular dichroism experiments. *Protein Science*, 15(3), 635-639.
- Berne, B. J. (1974). Interpretation of the light scattering from long rods. *Journal of molecular biology*, 89(4), 755-758.
- Chen, Y., Liu, B., y Barkley, M. D. (1995). Trifluoroethanol quenches indole fluorescence by excited-state proton transfer. *Journal of the American Chemical Society*, 117(20), 5608-5609.
- Cheng, Y., Oldfield, C. J., Meng, J., Romero, P., Uversky, V. N., y Dunker, A. K. (2007). Mining α -helix-forming molecular recognition features with cross species sequence alignments. *Biochemistry*, 46(47), 13468-13477.
- Cohen, S. I., Vendruscolo, M., Dobson, C. M., y Knowles, T. P. (2012). From macroscopic measurements to microscopic mechanisms of protein aggregation. *Journal of molecular biology*, 421(2), 160-171.
- Curto, L. M., Caramelo, J. J., Franchini, G. R., y Delfino, J. M. (2009). $\Delta 98\Delta$, a minimalist model of antiparallel β -sheet proteins based on intestinal fatty acid binding protein. *Protein Science*, 18(4), 735-746.
- Curto, L. M., Caramelo, J. J., y Delfino, J. M. (2005). $\Delta 98\Delta$, a functional all- β -sheet abridged form of intestinal fatty acid binding protein. *Biochemistry*, 44(42), 13847-13857.
- Dallessio, P. M., Fromholt, S. E., y Ropson, I. J. (2005). The role of Trp-82 in the folding of intestinal fatty acid binding protein. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 61(1), 176-183.
- Disfani, F. M., Hsu, W. L., Mizianty, M. J., Oldfield, C. J., Xue, B., Dunker, A. K., ... y Kurgan, L. (2012). MoRFPred, a computational tool for sequence-based prediction and characterization of short disorder-to-order transitioning binding regions in proteins. *Bioinformatics*, 28(12), i75-i83.
- Drozdetskiy, A., Cole, C., Procter, J., y Barton, G. J. (2015). JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic acids research*, gkv332.
- Flyvbjerg, H., Jobs, E., y Leibler, S. (1996). Kinetics of self-assembling microtubules: an "inverse problem" in biochemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(12), 5975-5979.
- Franchini, G. R., Curto, L. M., Caramelo, J. J., y Delfino, J. M. (2009). Dissection of a β -barrel motif leads to a functional dimer: The case of the intestinal fatty acid binding protein. *Protein Science*, 18(12), 2592-2602.
- Garbuzynskiy, S. O., Lobanov, M. Y., y Galzitskaya, O. V. (2010). FoldAmyloid: a method of prediction of amyloidogenic regions from protein sequence. *Bioinformatics*, 26(3), 326-332.
- Hackl, E. V. (2014). Limited proteolysis of natively unfolded protein 4E-BP1 in the presence of trifluoroethanol. *Biopolymers*, 101(6), 591-602.
- Hodsdon, M. E., y Cistola, D. P. (1997). Discrete backbone disorder in the nuclear magnetic resonance structure of apo intestinal fatty acid-binding protein: implications for the mechanism of ligand entry. *Biochemistry*, 36(6), 1450-1460.
- Hodsdon, M. E., Ponder, J. W., y Cistola, D. P. (1996). The NMR solution structure of intestinal fatty acid-binding protein complexed with palmitate: application of a novel distance geometry algorithm. *Journal of molecular biology*, 264(3), 585-602.
- Khurana, R., Uversky, V. N., Nielsen, L., y Fink, A. L. (2001). Is Congo red an amyloid-specific dye?. *Journal of Biological Chemistry*, 276(25), 22715-22721.

- LeVine 3rd, H. (1993). Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein science*, 2(3), 404-410.
- Li, H., Rahimi, F., Sinha, S., Maiti, P., Bitan, G., y Murakami, K. (2009). Amyloids and protein aggregation—analytical methods. *Encyclopedia of analytical chemistry*; Meyers, R. A., Ed.; John Wiley & Sons Ltd.: Chichester, U.K.; pp 1– 32.
- Lin, K., Simossis, V. A., Taylor, W. R., y Heringa, J. (2005). A simple and fast secondary structure prediction method using hidden neural networks. *Bioinformatics*, 21(2), 152-159.
- Mukhopadhyay, K., y Basak, S. (1998). Conformation induction in melanotropic peptides by trifluoroethanol: fluorescence and circular dichroism study. *Biophysical chemistry*, 74(3), 175-186.
- Monsellier, E., y Bedouelle, H. (2005). Quantitative measurement of protein stability from unfolding equilibria monitored with the fluorescence maximum wavelength. *Protein Engineering Design and Selection*, 18(9), 445-456.
- Nilsson, M. R. (2004). Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods*, 34(1), 151-160.
- Sacchettini, J. C., Scapin, G., Gopaul, D., y Gordon, J. I. (1992). Refinement of the structure of *Escherichia coli*-derived rat intestinal fatty acid binding protein with bound oleate to 1.75-Å resolution. Correlation with the structures of the apoprotein and the protein with bound palmitate. *Journal of Biological Chemistry*, 267(33), 23534-23545.
- Santoro, M. M., y Bolen, D. W. (1988). Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl. alpha.-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry*, 27(21), 8063-8068.
- Scapin, G., Gordon, J. I., y Sacchettini, J. C. (1992). Refinement of the structure of recombinant rat intestinal fatty acid-binding apoprotein at 1.2-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 267(6), 4253-4269.
- Schechter, I., & Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and biophysical research communications*, 27(2), 157-162.
- Tsolis, A. C., Papandreou, N. C., Iconomidou, V. A., y Hamodrakas, S. J. (2013). A consensus method for the prediction of 'aggregation-prone' peptides in globular proteins. *PloS One*, 8(1), e54175.
- Oldfield, C. J., Cheng, Y., Cortese, M. S., Romero, P., Uversky, V. N., y Dunker, A. K. (2005). Coupled folding and binding with α -helix-forming molecular recognition elements. *Biochemistry*, 44(37), 12454-12470
- Wang, K., y Kurganov, B. I. (2003). Kinetics of heat-and acidification-induced aggregation of firefly luciferase. *Biophysical chemistry*, 106(2), 97-109.
- Yeh, S. R., Ropson, I. J., y Rousseau, D. L. (2001). Hierarchical folding of intestinal fatty acid binding protein. *Biochemistry*, 40(14), 4205-4210.
- Zsila, F., y Bikádi, Z. (2005). trans-Parinaric acid as a versatile spectroscopic label to study ligand binding properties of bovine β -lactoglobulin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 62(1), 666-672.
- Zsila, F., Bikádi, Z., Fitos, I., y Simonyi, M. (2004). Probing protein binding sites by circular dichroism spectroscopy. *Current drug discovery technologies*, 1(2), 133-153

**DISCUSIÓN
DE
RESULTADOS**

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

SECCIÓN 1: AGREGACIÓN, EFECTOS DEL TFE

Tal como fue mencionado en la introducción, desde hace varios años en nuestro laboratorio realizamos estudios biofísicos que apuntan a comprender más cabalmente el plegado de proteínas β . Específicamente, se usó como modelo la proteína que une ácidos grasos de intestino de rata (IFABP). A partir de ella y con el objetivo de estudiar los determinantes de plegamiento y funcionalidad, se obtuvieron las variantes $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$ que fueron caracterizadas biofísicamente por las Dras. Curto y Franchini respectivamente [Curto y col., 2005; Curto y col., 2009; Franchini y col., 2009].

Nuestra primera propuesta en este trabajo apunta al estudio de la tendencia amiloidogénica de estas proteínas. En este sentido, se analizaron las características morfológicas de los agregados formados en presencia de trifluoroetanol (TFE) así como también los determinantes estructurales que podrían prevenir o inducir la agregación. Además, se realizó un estudio cinético detallado para hallar el mecanismo que subyace al proceso de agregación desencadenado en presencia del cosolvente.

Para entender el comportamiento general de estas proteínas frente al TFE, se comenzó evaluando el perfil de turbidez y de unión a los colorantes Th-T y RC (Figura 4.1). De este estudio se deduce que el comportamiento de las variantes abreviadas frente a dicho cosolvente se asemeja al de IFABP. La aparición de turbidez y la evolución de las señales de CD (Figuras 4.4 y 4.5) revelan que se producen concomitantemente cambios conformacionales y agregación. Sin embargo, existen en las variantes abreviadas características que indicarían una mayor plasticidad conformacional. Tanto $\Delta 98\Delta$ como $\Delta 78\Delta$ muestran un comportamiento bimodal en el perfil de fluorescencia intrínseca (Figura 4.6) en el rango 0 -15 % v/v TFE. A bajas concentraciones, el cosolvente provoca un aumento notable en la emisión de fluorescencia que conlleva un pequeño desplazamiento hacia el rojo en $\lambda_{\text{máx}}$ con respecto al de las variantes disueltas en buffer. A concentraciones mayores, la intensidad de fluorescencia total adopta la tendencia general descendente evidenciada por IFABP. Del mismo

modo, en este rango, se observa una intensificación de todas las características espectrales medibles por CD en la región UV lejana y una leve intensificación en la región cercana dando indicios de un fenómeno de consolidación de la estructura en ambas proteínas. Una discusión más detallada sobre los cambios estructurales y funcionales ocurridos en las proteínas a concentraciones subagregantes se encontrará en la siguiente sección.

Particularmente a 25 % v/v TFE, los reordenamientos estructurales observados por espectroscopia de CD se producen simultáneamente con una gran disminución en la intensidad de fluorescencia y un desplazamiento significativo del $\lambda_{\text{máx}}$ hacia el rojo. Estos resultados, combinados con los obtenidos a partir de la unión a Th-T y RC, y las imágenes tomadas por TEM (Figuras 4.3 y 4.4), demuestran el carácter β -amiloide de los agregados proteicos. A 25 % v/v TFE, los espectros de fluorescencia y CD para las tres proteínas aportan evidencia acerca de la existencia de una conformación común para los agregados proteicos de todas ellas (Figuras 4.4, 4.5, y 4.6).

Contrariamente, a 65 % v/v TFE, IFABP muestra una conformación rica en hélice α a la vez que una pérdida del entorno rígido del triptófano, lo que evidencia una transición a un estado soluble de glóbulo fundido, a juzgar por los espectros de CD y fluorescencia respectivamente. En esta condición el centro de masa está desplazado 16 nm hacia el azul con respecto al de IFABP desplegada en cloruro de guanidinio 3 M (353 nm) y 4 nm desplazado hacia el azul con respecto al NATA en 100 % v/v TFE. Esto concuerda con la existencia de un ambiente parcialmente ocluido al solvente -aunque flexible- para el Trp82. En estas condiciones, si bien la proteína se convierte en una forma que permanece soluble (Figura 4.1A), esto no excluye la posibilidad de unión de los colorantes (Figura 4.1B y C) utilizados para la detección de fibras amiloides. En este sentido, es bien sabido que el RC se une a estructuras del tipo glóbulo fundido [Khurana y col., 2001]. De manera similar a IFABP, a 65 % v/v TFE las variantes truncadas muestran acumulación de una estructura α -helicoidal, como lo demuestra el espectro de CD en la región UV lejana (Figura 4.4). En resumen, a 65 % v/v TFE las tres proteínas adoptan una conformación de glóbulo fundido rica en estructura alfa.

Por otro lado, los estudios cinéticos nos proporcionan una vía particularmente valiosa para la caracterización de la generación de nuevos agregados [Knowles y col., 2011, Orte y col., 2008]. En lo que respecta al fenómeno de agregación estudiado a 25 % v/v TFE, la cinética observada para IFABP y sus variantes abreviadas puede explicarse por un mecanismo común de nucleación-elongación de tipo primario, esto es, donde el núcleo se origina exclusivamente a partir de la forma soluble de la proteína (Figura 5.1). El primer evento sería un paso de equilibrio rápido, donde el TFE induciría una reorganización conformacional de la proteína nativa (P), dando lugar a un estado propenso a la agregación (P^*). El proceso de agregación subsiguiente incluye la nucleación (P_n) de la proteína conformacionalmente alterada en una especie con un número definido n de subunidades ($n = 2$), seguido por la elongación de los agregados fibrilares (F) por la aposición irreversible de más P^* . Esto representa un esquema mínimo, que guarde cierta similitud con el propuesto por Finke - Watzky [Watzky y Finke, 1997] y que representa una visión simple de aquel descrito por Flyvbjerg y Knowles [Flyvbjerg y Leibler, 1996; Knowles y col., 2011] (ver Figura 5.1).

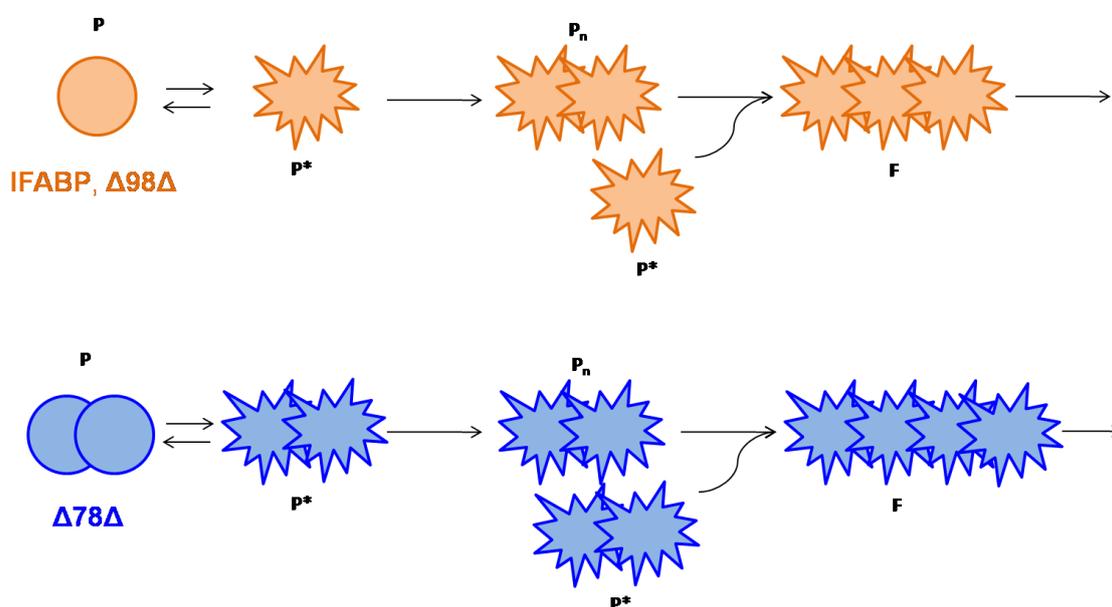


Figura 5.1. Representación esquemática del mecanismo de agregación de IFABP, $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$ en 25 % v/v TFE. En la misma, P se refiere a la proteína en su estado nativo, P^* a la proteína alterada conformacionalmente con propensión a la agregación, P_n al núcleo compuesto por n moléculas de monómero y F a la fibra.

Tal como se mencionara anteriormente, en todos los casos evitamos deliberadamente la agitación de las muestras, de modo que se minimice cualquier efecto debido a la fragmentación de las fibras [Knowles y col., 2009]. En este escenario, el período *lag* de la cinética se relaciona principalmente con la etapa de nucleación. Tal como puede ser predicho, un aumento en la concentración de proteína favorece la formación del núcleo, y por consiguiente, se produce la disminución en la duración del período *lag* (Figura 4.10C). La dependencia hiperbólica inversa observada para t_0 con la concentración proteica es consistente con el comportamiento predicho a partir de un mecanismo de nucleación-elongación. Después de completada la etapa de nucleación, ocurre el crecimiento de los agregados, fenómeno que puede describirse por una reacción de pseudo-primer orden, donde la concentración de núcleos permanece aproximadamente constante (régimen de estado estacionario).

En este campo de la biofísica, existe un dogma que postula que la tendencia a la agregación *in vitro* es potenciada por la desestabilización del estado nativo. En bibliografía pueden encontrarse varios ejemplos en los que el primer paso crítico de la fibrillogénesis es el desplegado parcial de la proteína [Uversky y Fink, 2004, Chiti y Dobson, 2009, Silva y Foguel, 2009]. Debido a las inevitables fluctuaciones térmicas, la estructura promedio de una proteína globular en condiciones funcionales puede ser descrita como una mezcla rápidamente interconvertible de conformaciones bien plegadas y otras múltiples conformaciones menos compactas (“*breathing*” conformacional). En este sentido, se ha demostrado que la mayoría de las mutaciones asociadas con la aceleración de la agregación y con enfermedades de depósito de proteínas, desestabilizan la estructura nativa de las proteínas, aumentando así la concentración de confórmers parcialmente plegados. Asimismo, otros factores que desencadenan la desestabilización de la estructura globular nativa (por ejemplo, pH extremos, altas temperaturas o presión, presencia de baja a moderada concentración de agentes desnaturizantes fuertes o disolventes orgánicos, etc.) pueden acelerar de manera significativa la velocidad de formación de fibras [Uversky y Fink, 2004]. Contrariamente a lo esperado, el dogma antes mencionado hubiera predicho una mayor propensión a la

agregación para $\Delta 98\Delta$, no obstante esta muestra una tendencia similar (o incluso menor) a la agregación que IFABP dada su menor estabilidad conformacional. Sin embargo, la velocidad de agregación de esta variante resultó ser la más baja. En cuanto a $\Delta 78\Delta$, si bien esta forma presenta una estabilidad mayor que la de IFABP, ostenta la mayor velocidad de agregación.

Thirumalai y col. [2003] postularon que la cinética de polimerización está determinada por la tasa de producción de P^* , que a su vez, está controlada por las barreras que separan P y P^* . En este escenario, la estabilidad intrínseca de P no sería el mejor indicador de la velocidad de agregación. Aunque la generalidad de esta observación aún no se ha establecido, nuestras variantes ilustran ejemplos del papel secundario ejercido por la estabilidad conformacional estimada en ausencia de perturbantes (medida como $\Delta G^0_{H_2O}$). En este sentido, cabe señalar que la energía libre de desplegamiento se refiere a la diferencia entre la forma nativa P y el estado (ensamble) desnaturalizado en ausencia de desnaturalizantes químicos, cuya relación con P^* no podría establecerse en forma sencilla.

Se puede intentar entender las diferencias en la tendencia amiloidogénica en función de las diferencias estructurales de la familia IFABP. Éstas últimas pueden predecirse sobre la base del modelo de plegado jerárquico propuesto para IFABP [Yeh y col., 2001]. Brevemente, el polipéptido desplegado colapsaría primeramente en una estructura semi-compacta que rodea a un núcleo formado por los residuos hidrofóbicos (Phe47, Phe62, Leu64, Phe68, Trp82, Met84 y Leu89). Seguidamente, las hebras βB a βG se propagarían desde el núcleo hidrofóbico en forma análoga a cierres relámpago entrelazados. Si bien estos elementos no están unidos fuertemente por interacción entre cadenas laterales, no obstante se lograría establecer la topología nativa del barril. Durante la última fase del plegado, esta topología nativa serviría de molde para la organización de las tres hebras restantes del barril (βH a βJ). Simultáneamente se completaría la red nativa de puentes de hidrógeno a través de la minimización de la energía de interacción entre las cadenas laterales de los aminoácidos. De acuerdo con este modelo: (i) $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$ conservarían todos los residuos que participan en el evento inicial de nucleación, (ii) completarían las etapas que conducen al establecimiento de la

topología del barril, pero (iii) serían incapaces de finalizar la etapa de formación de la red de puentes de hidrógeno que permite la consolidación de la estructura nativa. Para $\Delta 98\Delta$, este proceso incompleto daría lugar a una estructura con un núcleo hidrofóbico compacto acompañado de una periferia laxa. Por lo tanto, por su propia naturaleza, $\Delta 98\Delta$ constituiría un modelo minimalista capaz de poblar conformaciones escasamente representadas en el conjunto (ensamble) de la proteína de longitud completa [Curto y col., 2009]. De hecho, ya ha sido reportada por NMR la existencia de intermediarios en equilibrio para IFABP, que guarden cierta semejanza estructural con $\Delta 98\Delta$ [Hodsdon y Frieden 2001; Ropson y col., 2006]. Para $\Delta 78\Delta$ el extenso truncamiento podría determinar la aparición de bordes libres que desencadenarían la dimerización en condiciones nativas. La asociación de los protómeros podría implicar una nueva interfaz que involucra enlaces puente de hidrógeno estabilizantes de la estructura dimérica (Franchini y col., 2009).

Debido a que mutaciones en los segmentos implicados en el último evento del plegado jerárquico conllevan efectos significativos sobre la estructura y estabilidad de las construcciones [Kim y Frieden, 1998, Clérico y col., 2000, Chattopadhyay y col., 2002] no se puede descartar que, a menos que dichos residuos alcancen la conformación precisa presente en la forma nativa, éstos podrían contribuir a la propensión a la agregación observada para la proteína de longitud completa. En este contexto, $\Delta 98\Delta$ carece *tanto de los segmentos N- y C-terminales, que interactúan mutuamente* para completar el último evento en el plegado del barril β . A pesar de que se genera una estructura menos estable, el extenso truncamiento produce una forma plegada y flexible que exhibe una tendencia algo inferior a agregar. Este hallazgo paradójico estaría en desacuerdo con la idea de que la perturbación de la estructura nativa compacta poblaría, ineludiblemente, especies con propensión aumentada a la agregación.

Otro de los dogmas establecidos en el campo de la agregación amiloide sostiene que la propensión a la agregación sería consecuencia de la presencia de secuencias particulares relativamente cortas [Pawar y col., 2005]. Para evaluar la existencia de segmentos con propensión potencial a la agregación, la secuencia de la proteína de largo completo IFABP fue analizada haciendo

uso de diversos algoritmos *ad-hoc* (Figura 4.13). El resultado de dicho estudio reveló la existencia de dos posibles regiones que favorecerían la agregación: un segmento C-terminal corto (114-118) y un tramo central más largo (que abarca los residuos 58-64/71). Por su expansión y dado que el primero está ausente en $\Delta 78\Delta$, se puede especular que el péptido central podría ser la región mayormente responsable de la agregación de estas tres proteínas. Esta evidencia pone de relieve la posibilidad de que la tendencia a la agregación de un constructo dado no sea sólo función de la secuencia aminoacídica, sino que *las interacciones de largo alcance entre las distintas regiones también desempeñaren un papel importante en este proceso*. En este sentido, las variaciones en la velocidad de agregación observadas podrían deberse a diferencias en la conformación proteica que, a su vez, podrían estar relacionadas con la exposición/accesibilidad de este segmento central. Cabe destacar que el péptido amiloidogénico principal se encuentra justamente en la brecha (*gap*) entre la hebra βD y βE de IFABP, un lugar con pocos enlaces puente de hidrógeno inter-hebra [Hodsdon y col., 1996] (Figura 5.2).

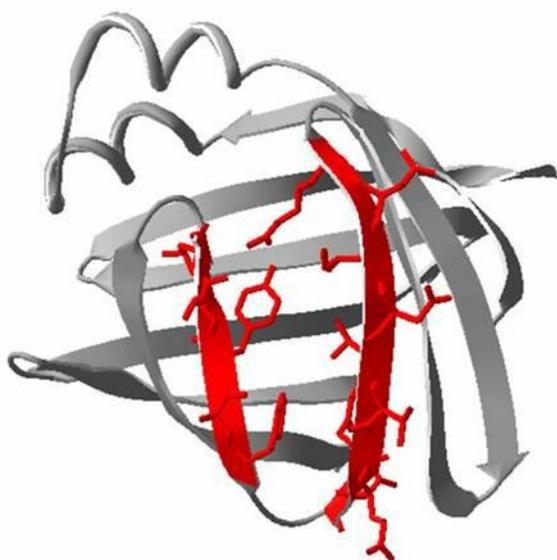


Figura 5.2. Diagrama de cintas de IFABP. Las hebras que delimitan la hendidura (βD y βE) y los aminoácidos que las componen se encuentran coloreados en rojo.

Existe aquí un solapamiento significativo entre las regiones hidrofóbicas de la secuencia que se encontrarían expuestas al solvente y aquellas identificadas como determinantes críticos de la velocidad de agregación. Monti y col. reportaron que un alto grado de exposición de dichas zonas al solvente sería una característica inherente a las regiones que iniciarían el proceso de agregación [Monti y col., 2004]. De hecho, un gráfico de hidropatía (Figura 5.3)

revela al segmento central común como aquella región de más alta hidrofobicidad. El extenso truncamiento de estas proteínas favorecería la exposición de residuos hidrofóbicos, hecho que primariamente podría aumentar su tendencia a la agregación. Sin embargo, se podría especular que la dimerización de $\Delta 78\Delta$ impediría esta vía al ocultar estos segmentos hidrofóbicos en la estructura dimérica [Franchini y col., 2009]. De esta manera, el TFE podría alterar la conformación del dímero, dando lugar a un aumento en su velocidad de agregación. A pesar de que el estado nativo de muchas proteínas es dimérico, la formación de una especie dimérica es a menudo el primero de los eventos que conduce a la agregación de muchas proteínas amiloidogénicas [Ma y Nussinov, 2006]. Este último fenómeno generalmente está bajo control cinético (menor barrera de activación), presentando el dímero una energía más alta que el monómero. Es importante destacar que la dimerización puede bloquear conformaciones mal plegadas, desplazando el equilibrio lejos del estado nativo. Además, la dimerización también podría catalizar la conversión de elementos de la secuencia en cadenas β , y en este escenario, un dímero de hebras β podría aumentar la velocidad de la formación de oligómeros [Ma y Nussinov, 2006]. Esta última posibilidad representaría un caso de nucleación secundaria (ausente en nuestro caso según el análisis cinético).

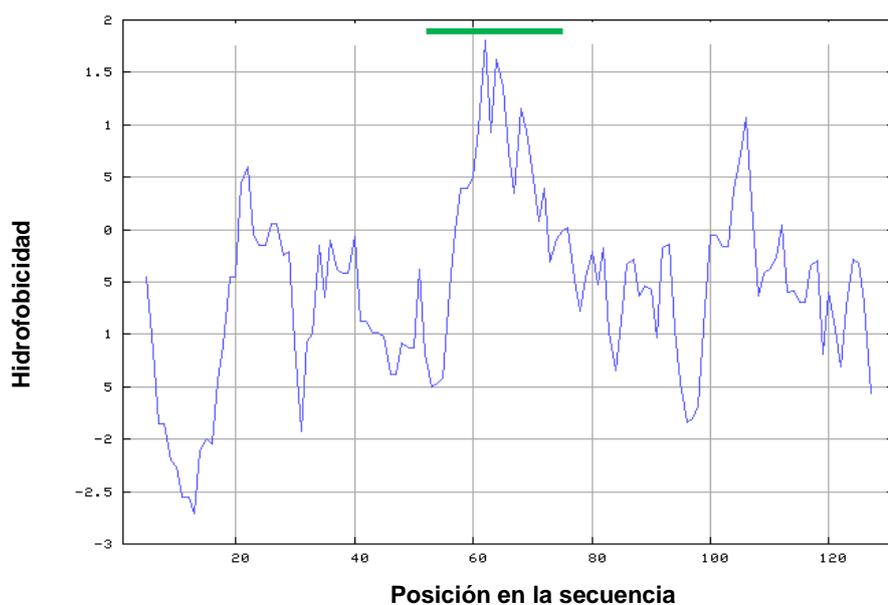


Figura 5.3. Gráfico de Kyte-Doolittle [Kyte y Doolittle, 1982] para la secuencia aminoacídica de IFABP utilizando escala Kyte-Doolittle y un tamaño de ventana de 9 aminoácidos. Con barra de color verde se indica la zona de más alta hidrofobicidad.

Además de los segmentos amiloidogénicos obtenidos por predicción computacional que se mencionaron previamente, el segmento 1-28 -ausente tanto en $\Delta 98\Delta$ como en $\Delta 78\Delta$ - podría contribuir *per se* al fenómeno de agregación. Éste péptido, en el contexto de la estructura completa incluye algunas de las regiones más flexibles de la proteína, característica que por sí sola desfavoreciendo su capacidad de actuar como un núcleo de agregación (Figura 4.14). De hecho, hemos confirmado que por sí mismo -o aún en presencia de $\Delta 98\Delta$ en el medio- este péptido no forma agregados. Además, el péptido aislado resulta desestructurado en medio acuoso y sólo adopta una estructura helicoidal cuando se lo desafía en presencia de 25 % v/v TFE (Figura 4.15). De modo significativo, independientemente de la presencia de TFE, el espectro de la mezcla de 1:1 de $\Delta 98\Delta$ y del péptido 1-28 resulta indistinguible de la suma algebraica de los espectros correspondientes a cada uno por separado. No obstante, los experimentos anteriores no descartan la posibilidad de que las interacciones entre el péptido N-terminal y la región central principal puedan ser demasiado débiles como para ser observadas por CD, incluso a las más altas concentraciones ensayadas de péptido y proteína. Como nota de advertencia general para la interpretación de experimentos en esta área, uno debe ser consciente de que la propensión a la agregación de una construcción dada pueda no ser sólo función de una secuencia aminoacídica particular, ya que las *interacciones entre diferentes regiones* de la proteína también podrían desempeñar un papel importante en el proceso.

SECCIÓN 2: PREAGREGACIÓN, EFECTO DE TFE A BAJAS CONCENTRACIONES

En resumen hasta aquí, IFABP y sus variantes truncadas $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$ se han convertido en modelos útiles para el estudio de los determinantes moleculares relacionados con la agregación de las proteínas del tipo barril β . Se ha discutido que no es posible hallar una correlación directa entre la estabilidad ($\Delta G^0_{H_2O}$: IFABP > $\Delta 78\Delta$ > $\Delta 98\Delta$) y la propensión a la agregación inducida por TFE ($\Delta 78\Delta$ > IFABP \geq $\Delta 98\Delta$). Este hecho relativiza la importancia que tendría el papel secundario que tendría, en estos casos, la medida de la diferencia de energía libre asociada a la proteína nativa (P) respecto del estado desnaturalizado. Además, como las tres proteínas comparten el fragmento común propenso a la agregación, las variaciones en la velocidad de agregación observadas se podrían explicar a partir de las diferencias en la conformación de la proteína, factor que modularía la exposición/accesibilidad de este fragmento crítico. Resulta ahora claro que, con el fin de entender más cabalmente aquellos factores que influyen sobre el fenómeno de agregación proteica, resulta imperioso caracterizar los primeros acontecimientos que conducen a la génesis del núcleo. Planteamos entonces que sería más apropiado correlacionar la propensión a la agregación con la estabilidad medida en presencia de TFE. Dado que concentraciones mayores a 20 % v/v TFE disparan irreversiblemente el proceso de agregación, intentamos evaluar el impacto de concentraciones menores del cosolvente -condición para que la proteína se mantenga soluble- sobre la conformación y la estabilidad de las proteínas. A partir de la información obtenida sobre la evolución de la estructura y la estabilidad en esta condición subagregante, podría extrapolarse el escenario de acontecimientos que sucedería a mayores concentraciones de cosolvente. En este sentido, procedimos a caracterizar los cambios ocurridos hasta 10 % v/v TFE.

El punto de partida para la caracterización de las proteínas a 10 % v/v TFE fue la sorprendente estructuración alcanzada por las variantes abreviadas a dicho porcentaje de cosolvente (Figura 4.4). Para las tres proteínas se evidencia una coalescencia estructural a partir de la coincidencia de los espectros de CD en la región UV lejana (Figura 5.4). A partir de esta observación, decidimos

focalizar la atención en esta condición experimental para intentar comprender si los cambios conformacionales encuentran correlato con la propensión a la agregación.

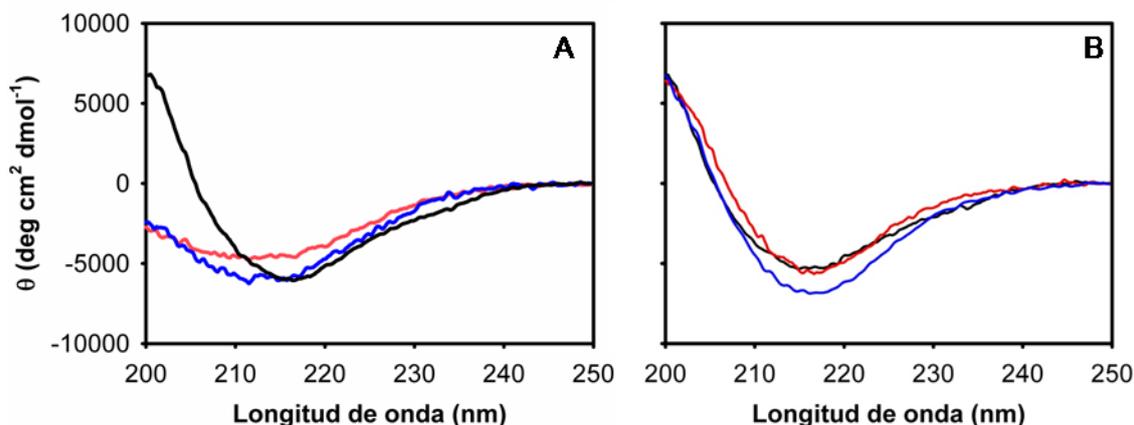


Figura 5.4. Espectros de CD en la región UV lejana de IFABP, $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$ a 0 (A) y 10 (B) % v/v TFE.

Las principales consecuencias sobre la conformación de IFABP y las variantes truncadas de la adición de concentración subagregante de TFE se ilustran en las Figuras 4.16 y 4.18. No se evidencia cambio significativo en la conformación de IFABP, tal como lo demuestra la conservación de la estructura secundaria y el ligero cambio en la estructura terciaria, documentado en los espectros de CD y fluorescencia. Por otro lado, se observa una reducción del 33 % en la intensidad de emisión, que probablemente sería consecuencia de un efecto general de apagamiento de la fluorescencia (*quenching*) provocado por el TFE [Chen y col., 1995, Mukhopadhyay y Basak, 1998]. Para las variantes abreviadas, la evolución de los espectros de CD en la región UV lejana en función de la concentración de TFE demuestra la mayor plasticidad de estas proteínas respecto de IFABP (Figura 4.16). Los resultados mostrados indicarían que dicho cambio es gradual, aumentando (en módulo) la señal dicroica con el agregado del cosolvente.

Es interesante destacar que aún 2.5 % v/v TFE (el mínimo porcentaje de TFE ensayado), provoca cambios significativos en el espectro de éstas proteínas. Estos resultados son consistentes considerando que las variantes abreviadas resultan de truncamientos de la proteína madre IFABP, una estructura con una conformación evolutivamente consolidada. Dado que las variantes abreviadas

presentar regiones más flexibles que la proteína madre presumiblemente como consecuencia de la pérdida de interacciones de puentes de hidrógeno entre las hebras, es de esperar que el cosolvente TFE influya en mayor medida sobre $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$ que sobre IFABP. A juzgar por la intensificación de los espectros de CD en la región UV lejana de las variantes abreviadas, se podría concluir que las mismas exhiben una ganancia en estructura. Es importante destacar que la estructuración alcanzada a concentraciones de TFE \leq a 15 % es de carácter reversible ya que, al quitar el cosolvente del medio, las proteínas retornan a su estado conformacional original. Por otro lado, los espectros de CD en la región UV lejana en función de la concentración de TFE para cada una de las variantes abreviadas exhiben puntos isodicroicos, hecho consistente con la coexistencia de dos entidades con conformaciones secundarias distintas. Cabe destacar que identificar un punto isodicroico es una condición necesaria, pero no suficiente, para definir una transición entre dos estados conformacionales.

En cuanto a la información disponible sobre la estructura tridimensional, los espectros de CD en la región UV cercana (Figura 4.17) demuestran, fundamentalmente, una conservación general de esta estructura. Al mismo tiempo, el estudio de los espectros de fluorescencia (Figura 4.18) muestra un comportamiento diferencial de estas proteínas. Como una nota de advertencia, es preciso aclarar que el residuo de Trp que aporta en mayor medida a la emisión de fluorescencia -y el único existente en el caso de las variantes abreviadas- corresponde al Trp82 ubicado en el *core* de estas proteínas. Por lo tanto, la información extraída a partir de estos espectros reflejará principalmente los cambios ocurridos en esta zona de la proteína.

El comportamiento bimodal observado para los espectros de fluorescencia de las variantes abreviadas (Figura 4.18), presenta un incremento de la señal a bajas concentración de TFE seguido de una fase de meseta a mayores concentraciones. Este perfil podría estar reflejando una ganancia en estructura superpuesto a efecto general de apagamiento de la fluorescencia del Trp82. Una interpretación de esta evidencia sería un balance entre la estructuración de la periferia y un rearrreglo del *core*. Por el contrario IFABP exhibe un comportamiento monótonamente descendente para todo el rango de

concentraciones ensayadas. En este sentido, IFABP muestra un comportamiento similar al compuesto de referencia NATA en cuanto a la evolución de la intensidad de fluorescencia. En cambio, el centro de masa espectral permanece prácticamente constante para IFABP, mientras que NATA exhibe un previsible corrimiento hacia el azul en la longitud de onda del máximo de emisión. De este modo, podría especularse que existirá un fenómeno compensatorio en la conducta observada para IFABP causado por un cambio hacia una mayor polaridad del entorno del Trp82.

En conclusión, de acuerdo con los resultados obtenidos a partir de las mediciones de CD y fluorescencia, las variantes abreviadas exhiben una ganancia de estructura que conduce a una coalescencia conformacional de las tres proteínas a 10 % v/v TFE. El fenómeno de estructuración también encuentra correlato en los experimentos de 1D ^1H NMR (Figura 4.21).

Con el fin de aportar nueva evidencia sobre la estructura tridimensional de estas proteínas en presencia de TFE, se analizó la información derivada de experimentos de proteólisis (Figuras 4.22). Aunque en presencia del cosolvente se evidencia la misma distribución de los sitios de corte para las tres proteínas, se observan cambios significativos en la susceptibilidad proteolítica. En presencia de TFE, tanto para $\Delta 98\Delta$ como para $\Delta 78\Delta$, la velocidad de proteólisis disminuye, es decir, las proteínas son digeridas más lentamente, confirmando así lo mencionado anteriormente: este cosolvente estaría disminuyendo la flexibilidad de estas variantes proteicas al inducir una ganancia de estructura. Por el contrario, en esta condición, IFABP parece ser más susceptible a la digestión proteolítica (a pesar de poseer un patrón idéntico de sitios de escisión), hecho que pudiere indicar una mayor flexibilidad. Para confirmar que el comportamiento de IFABP fuere el generalmente esperable para una proteína naturalmente "bien plegada" se probaron tres proteínas nativas a modo de control (lisozima, α -lactalbúmina y seroalbúmina bovina) todas las cuales resultaron comportarse de manera similar a IFABP (Figura 4.23). Es razonable pensar que, a baja concentración de TFE, la conformación nativa de una proteína consolidada tal como IFABP se vea vulnerada, de modo tal que existan más oportunidades de acceso de la proteasa al sitio de corte.

Más precisamente, conjugando la información estructural obtenida a partir de las técnicas espectroscópicas (Figura 4.16) y el análisis por espectrometría de masa (Figura 4.24), postulamos que la reducción en la velocidad de corte de la proteasa hasta, al menos, el residuo 102 podría deberse a una rigidización del tramo C-terminal en las variantes abreviadas debido al aumento en el contenido de estructura secundaria. Este segmento podría incluso extenderse más allá dado que el siguiente sitio proteolítico sería el residuo 93 y correspondería a regiones más móviles en la conformación nativa de las variantes abreviadas y, en cambio, estaría mayormente estructurado en presencia del cosolvente. Tal efecto ejercido por el TFE podría implicar, en parte, la inducción helicoidal a lo largo de la sección C-terminal de las variantes abreviadas, que de otro modo serían “desordenadas” a juzgar por las predicciones de desorden (Figura 4.25). En este sentido es bien conocido el efecto inductor de estructura de tipo α del TFE en péptidos [Lehrman y col., 1930; Hackl, 2014]. Los predictores de desorden señalan como zonas menos ordenadas a regiones que comprenden alrededor de los primeros 15 y los últimos 30 residuos de aminoácidos de la proteína de longitud completa. En cambio, las predicciones dadas por los algoritmos JPred y YASPIN indican una hélice α para el segmento de 122 a 128 de IFABP (Figura 4.26).

Es probable que las colas potencialmente propensas al desorden en IFABP puedan jugar al menos dos funciones diferentes. En primer lugar, tal como se mencionó antes están involucrados en el cierre del barril β y en segundo lugar, podrían servir como “cerdas entrópicas” que impidan la oligomerización de IFABP en el transcurso del proceso de plegado jerárquico. A causa de los movimientos aleatorios alrededor de su punto de unión/anclaje, las “cerdas entrópicas” podrían barrer una región significativa en el espacio y entrópicamente excluir partículas grandes pero no pequeñas moléculas tales como el agua, sales, metales o cofactores. Nótese que la mayor parte de la cola C-terminal predicha como desordenada para IFABP se conserva en $\Delta 98\Delta$, mientras que está virtualmente ausente en $\Delta 78\Delta$. En este último caso, debido a su insuficiente tamaño, ésta región sería incapaz de ejercer el papel de “cerda entrópica”, y debido a ello la proteína sería capaz de adoptar su estado oligomérico (dímero). Sobre esta base, puede especularse que el sector C-

terminal desordenado de $\Delta 98\Delta$ podría inhibir el proceso de oligomerización. Más aún, la menor velocidad de agregación observada para $\Delta 98\Delta$ con respecto a IFABP y $\Delta 78\Delta$ podría explicarse por la alta movilidad esperable para este segmento que posiblemente retrase la formación del núcleo de agregación (P_n). Además, de acuerdo con Chiti y Dobson, 2006 un aumento en el contenido helicoidal -en nuestro caso inducido a bajas concentraciones de TFE- sería otro factor que contribuiría a reducir la propensión a la agregación de esta variante. Para el caso de $\Delta 78\Delta$, la mayor velocidad de agregación podría radicar en su naturaleza dimérica, que como se mencionó en la sección anterior, simplificaría el proceso de nucleación, de otro modo bimolecular, en uno unimolecular.

En conclusión hasta aquí, el TFE a bajas concentración podría aumentar el contenido helicoidal de ciertas regiones de la proteína. Al formar estructuras helicoidales, estas regiones perderían su alta flexibilidad y, por lo tanto, resultarían más protegidas de la actividad de las proteasas [Hackl, 2015]. Esta *ganancia en estructura α -helicoidal* podría explicar su menor propensión a la digestión y los cambios observados en los espectros de CD en la región UV lejana -donde se manifiesta un aumento de señal en la región centrada alrededor de ~ 200 nm característico de este tipo de estructuras.

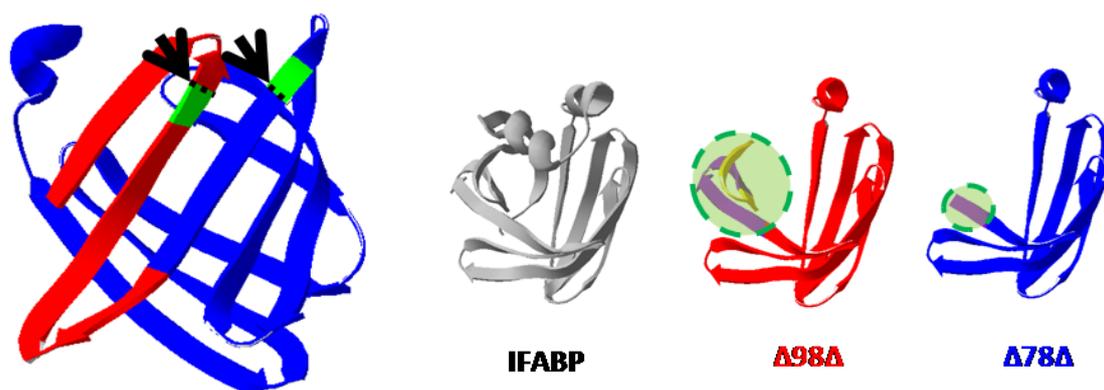


Figura 5.4. Sobre la base del esquema de cintas correspondiente a la estructura de IFABP (PDB 2IFB) se han borrado los segmentos ausentes en $\Delta 98\Delta$. En **rojo** se muestra el sector C-terminal de $\Delta 98\Delta$, segmento ausente en $\Delta 78\Delta$ (que se muestra en **azul**). Con flechas se señalan los sitios de corte de la proteasa quimotripsina. A la derecha se muestran los esquemas de las tres proteínas: **IFABP**, **$\Delta 98\Delta$** , **$\Delta 78\Delta$** . Para las variantes abreviadas se indica en color **violeta** y **amarillo** los fragmentos correspondientes a los sitios de corte de la quimotripsina, y con círculo de color **verde** el posible fragmento desestructurado que se organizaría en hélice α .

Los nuevos datos disponibles nos permiten refinar el modelo estructural propuesto para las proteínas abreviadas: éstas podrían presentar una región común similar a la nativa “decorada” con un tramo C-terminal de mayor o menor longitud de naturaleza desordenada. Es sabido que los efectos del TFE sobre los elementos de estructura secundaria presentes en una proteína pueden diferir de los observados para péptidos pequeños. En este sentido, el cosolvente podría ejercer una función dual sobre las proteínas, perturbando la región nativa [Povey y col., 2007] y al mismo tiempo induciendo estructura helicoidal a lo largo del segmento C-terminal desordenado.

Como consecuencia estructural global de la adición de cosolvente, se observa un efecto significativo de compactación, tal como la muestra la Figura 4.27. Este fenómeno alcanza gran magnitud para $\Delta 78\Delta$, es un tanto menor en el caso de IFABP y se convierte en insignificante para $\Delta 98\Delta$. Cabe destacar que, en el caso de $\Delta 78\Delta$, la gran disminución del radio hidrodinámico no es consecuencia de una disociación del dímero ya que la proteína conserva su estructura dimérica a 10 % v/v TFE (datos no mostrados, comprobados tanto por dispersión luminosa (*light scattering*) acoplada a la columna de exclusión molecular (SEC) como por NMR). En consecuencia, al compactarse, la accesibilidad al solvente del núcleo hidrofóbico en presencia de TFE se verá disminuida, tal como lo demuestran los experimentos de apagamiento de la fluorescencia con acrilamida (Figura 4.28). Podemos observar que en todo el rango 0-10 % v/v TFE, $\Delta 98\Delta$ presenta accesibilidad similar al solvente del núcleo, hecho que se corresponde con la información sobre su tamaño aportada por la cromatografía de exclusión molecular. Esta evidencia indicaría que ésta variante persistiría como aquella más expandida. En el caso de $\Delta 78\Delta$, la accesibilidad se vería comprometida, posiblemente debido a la gran compactación sufrida. Además, para todas las proteínas, en ambas condiciones, los gráficos de Stern Volmer guardan una relación lineal, sugiriendo la existencia de un único mecanismo de apagamiento de la fluorescencia.

Para comprender el impacto de los cambios inducidos por TFE en la exposición de zonas hidrofóbicas, se llevaron a cabo experimentos de unión de ANS (ácido 8-anilino 1-naftalen sulfónico) a las tres proteínas. En lo que respecta a

la proteína madre, se observa un aumento de la fluorescencia del ANS (Figura 4.30) -que se relacionaría con una mayor exposición de zonas hidrofóbicas- hecho consistente con la ya mencionada mayor sensibilidad a la proteólisis (Figura 4.22). Esta evidencia demostraría que si bien IFABP sólo sufriría alteraciones estructurales menores en presencia de 10 % v/v TFE, los cambios resultarían claramente deletéreos. En contraposición, $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$ evidencian una disminución tanto de la propensión a la proteólisis (Figura 4.22) como en la exposición de zonas hidrofóbicas (Figura 4.30), hechos consistentes con el efecto promotor de estructura propuesto para el TFE. Curiosamente, en presencia de TFE, la variante dimérica ya no es capaz de unir ANS. Esto se puede racionalizar ya sea por la gran contracción del bolsillo hidrofóbico y/o por un acceso estéricamente impedido a la cavidad de unión.

Notablemente, aún bajo la influencia del TFE, estas proteínas siguen siendo funcionales, pues son capaces de unir ácidos grasos (Figuras 4.31 y 4.33). Llamativamente, $\Delta 78\Delta$, aun siendo incapaz de unir ANS, retiene la capacidad de unir los ácidos *trans*-parinárico y oleico. Esto podría explicarse en razón de que el ANS es una molécula considerablemente más grande y menos flexible que los ácidos grasos. En presencia de TFE, tras la unión del t-PA podemos ver que, para las tres proteínas, las bandas inducidas -reveladoras de las características estructurales de los sitios de unión- presentan un corrimiento hacia el rojo de la señal espectral en la región UV cercana. Este efecto podría ser la manifestación de un entorno más ocluido del solvente para el sitio de unión del ácido graso. Además, a juzgar por los espectros en la región UV lejana en presencia de TFE, las proteínas abreviadas no evidencian mayor estructuración al unir ácido oleico. Esta última condición es similar a la experimentada por IFABP en ausencia de cosolvente, donde esencialmente no existe efecto promotor de la estructura tras la unión del ligando [Curto y col., 2005]. Una vez más, esto podría indicar que el TFE consolida la estructura de estas proteínas abreviadas y las torna similares a IFABP.

Como la retención de la funcionalidad es característica del estado nativo, se puede concluir que la presencia de 10 % v/v TFE podría estar enriqueciendo una población de subestados conformacionalmente alternativos -ya presentes en el ensamble- pero poco explorados en medio acuoso. Existe evidencia que

aboga por una descripción más general del estado nativo mediante un conjunto de conformaciones, colectivamente denominado “ensamble del estado nativo” [Rangwala y Karypis, 2011]. Dado que las proteínas no son entes rígidos, el estado nativo puede describirse como un conjunto estadístico caracterizado por una serie de estructuras que ocupan mínimos locales de energía, separados por regiones localmente desplegadas correspondientes a estados de alta energía libre poblados transitoriamente [Zacharias, 2010]. En síntesis, el cosolvente TFE perturbaría subestados en equilibrio dentro del ensamble conformacional nativo de las proteínas.

El análisis de la estabilidad térmica de las proteínas en presencia de TFE (Figura 4.34) muestra que IFABP, siendo menos compacta en presencia de este cosolvente, resulta mucho más susceptible a la desnaturalización térmica. Por el contrario, en esta misma condición la consolidación estructural experimentada por las variantes abreviadas origina formas con mayor resistencia a la desnaturalización por temperatura. Este efecto se pone especialmente de manifiesto para $\Delta 98\Delta$. En presencia de 10 % v/v TFE, se observa que las tres proteínas adoptan valores similares de T_m , contrario a lo observado para los valores de T_m medidos en ausencia de cosolvente.

Posteriormente, se evaluó la estabilidad de estas proteínas por métodos químicos. Para el desafío con urea (Figura 4.36), se puede apreciar que en presencia del cosolvente la estabilidad de las variantes abreviadas aumenta significativamente, mientras que el valor para la proteína de longitud completa permanece sin cambios. Frente al desafío con cloruro de guanidinio (GdmCl, Figura 4.37) la estabilidad de $\Delta 98\Delta$ disminuye, mientras que el valor para $\Delta 78\Delta$ aumenta. En presencia de este caótropro, la proteína de longitud completa evidencia un significativo descenso del valor de $\Delta G_{H_2O}^0$. Debe destacarse que se pueden obtener diferentes valores de $\Delta G_{H_2O}^0$ cuando se emplean diferentes agentes desnaturalizantes ya que moléculas como el GdmCl, cuyas soluciones alcanzan alta fuerza iónica, debilitan significativamente los puentes salinos en proteínas, mientras que otros, agentes como la urea (sin carga) tienen un efecto menor sobre las interacciones iónicas [Greenfield, 1999]. Aún pesar de estas diferencias, se observa que en presencia de TFE los valores de C_m de las tres proteínas tienden a parecerse entre sí (Figura 5.6).

En definitiva, la no coincidencia de los valores de $\Delta G^0_{H_2O}$ y la menor magnitud en los valores de m respecto de lo esperable para proteínas de ese peso molecular, son indicios de que un modelo de dos estados sería insuficiente para explicar toda la evidencia experimental.

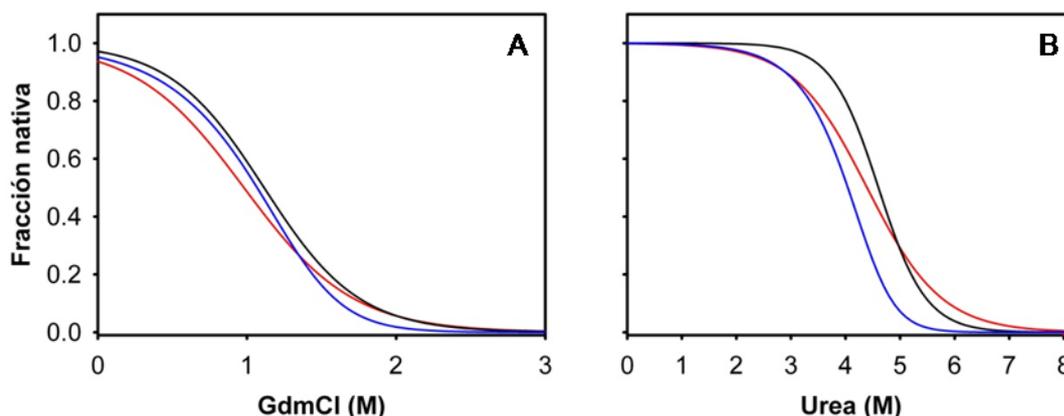


Figura 5.6. Fracción nativa en función de la concentración de desnaturalizante GdmCl (A) y urea (B) para IFABP, $\Delta 98A$ y $\Delta 78A$ en 10 % v/v TFE.

En resumen, la evidencia acumulada y aquí expuesta es compatible con la noción de que los cambios estructurales en las tres proteínas provocados por concentraciones subagregantes de TFE (hasta 10 % v/v) asemejan las curvas de estabilidad entre sí (Figura 5.6). Un fenómeno que puede encontrar correlato con el previamente mencionado fenómeno de coalescencia conformacional. Aun así, la estabilidad medida en presencia del caótropro no es *per se* un parámetro suficiente para establecer una correspondencia clara con la propensión a la agregación.

El enfoque experimental aquí planteado contribuye con nuevos datos de relevancia para la comprensión de los primeros cambios conformacionales conducentes a la formación del núcleo de agregación. La visión del proceso se enriquece a partir del panorama provisto por el conjunto de las técnicas ensayadas. En este escenario, el TFE a baja concentración promovería cambios conformacionales similares a los conducentes a la formación de especies propensas a la agregación.

SECCIÓN 3: EVALUACIÓN DE LOS PRIMEROS EVENTOS DEL PROCESO DE AGREGACIÓN

Por último, avanzamos en intentar esclarecer los primeros eventos que surgen de exponer las proteínas a 25 % v/v TFE. En las Figuras 4.39 y 4.41 podemos apreciar claramente que los espectros obtenidos inmediatamente tras el agregado de 25 % v/v TFE resultan similares a los obtenidos en condiciones de equilibrio tras la exposición de las proteínas a la concentración subagregante estudiada previamente (10 % v/v) (Figura 5.7). Esto conduce a pensar que el cambio estructural observado a ese porcentaje de TFE mimetizaría aquél necesario para desencadenar el proceso de formación de fibras amiloides. Dicho de otro modo, las especies formadas a esa concentración de cosolvente podrían ser similares a las especies propensas a la agregación (P^*).

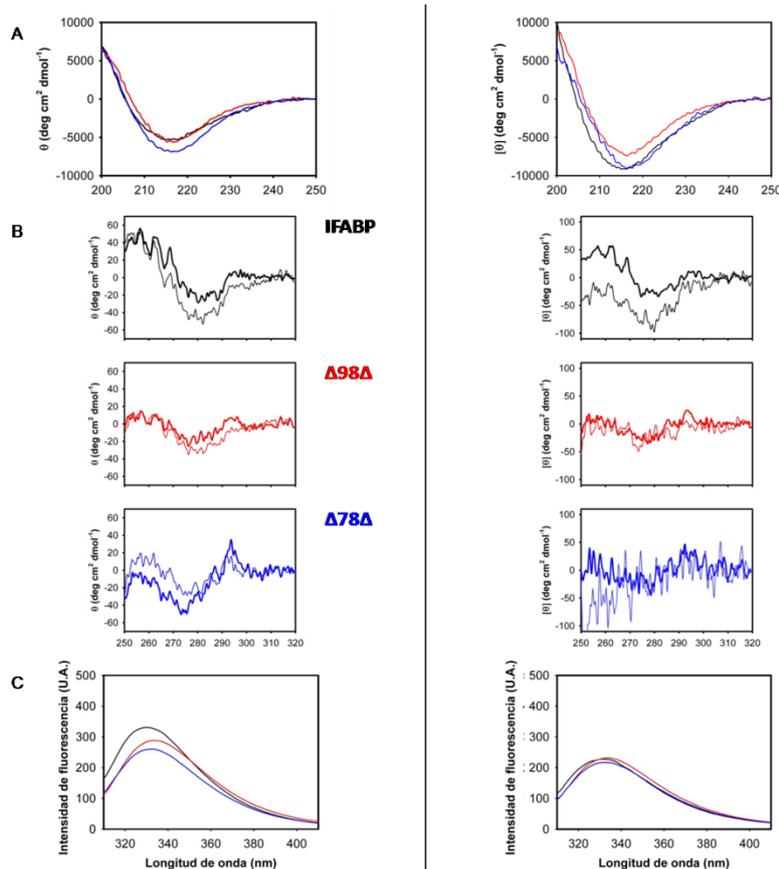


Figura 5.7. Comparación de los cambios conformacionales ocurridos para IFABP, $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$ en presencia de 10 % v/v TFE (*izquierda*) e inmediatamente después de agregar 25 % v/v TFE (*derecha*). Se muestran espectros CD en la región UV lejana (A), CD en la región cercana (B) y de emisión de fluorescencia intrínseca (C).

En (B) se muestran los espectros de las proteínas a 0 % v/v TFE para mejor interpretación del gráfico.

Los embudos de plegado permiten una interpretación pictórica sobre los cambios que le sucederían a las proteínas al pasar a un medio conteniendo TFE. De manera sencilla, los paisajes en forma de embudo para las tres proteínas se asemejarían más entre sí tras el agregado de TFE. Tal como se muestra en la Figura 5.8, existiría una disminución del ancho de los embudos - explicado por una disminución de la entropía conformacional- al tiempo que una reducción en la profundidad (menor energía libre) para IFABP mientras que las variantes abreviadas aumentarían en profundidad. Así, los embudos presentarían menores diferencias en energía libre entre el estado nativo y el desnaturalizado. Puede especularse que las especies transitorias formadas al exponer las proteínas a 25 % v/v TFE –colectivamente denominadas P^* - podrían estar representadas por embudos de plegado similares a los propuestos para 10 % v/v TFE. En este escenario, las diferencias observadas en la velocidad de agregación podrían entenderse a partir de las barreras cinéticas de activación hacia la fibra, que encuentra un nuevo punto de partida, diferente de aquel en medio acuoso. Claramente, la transición conformacional rápida y reversible entre 0 y 10 % v/v TFE involucra barreras de baja magnitud, mientras que los pasos subsiguientes irreversibles conducentes a la fibra podrían estar gobernados por barreras de magnitud mucho mayor. Hace falta contar con más evidencia experimental para definir acabadamente un panorama desde un punto de vista termodinámico por el que pueda entenderse la sucesión de eventos conducentes a la fibrilación.

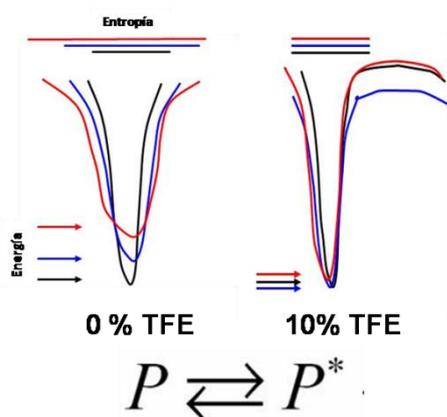


Figura 5.8. Representación de los embudos de plegado para las tres proteínas: IFABP, $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$. Se muestran dos embudos de plegado para cada proteína: del lado izquierdo se representan los embudos para las proteínas a 0 % v/v TFE y del lado derecho la evolución de los mismos a 10 % v/v TFE.

BIBLIOGRAFÍA

Chattopadhyay, K., Zhong, S., Yeh, S. R., Rousseau, D. L., y Frieden, C. (2002). The intestinal fatty acid binding protein: the role of turns in fast and slow folding processes. *Biochemistry*, 41(12), 4040-4047.

Chen, Y., Liu, B., y Barkley, M. D. (1995). Trifluoroethanol quenches indole fluorescence by excited-state proton transfer. *Journal of the American Chemical Society*, 117(20), 5608-5609.

Chiti, F., y Dobson, C. M. (2009). Amyloid formation by globular proteins under native conditions. *Nature chemical biology*, 5(1), 15-22.

Chiti, F., y Dobson, C. M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.*, 75, 333-366.

Clérico, E. M., Peisajovich, S. G., Ceolín, M., Ghiringhelli, P. D., y Ermácora, M. R. (2000). Engineering a compact non-native state of intestinal fatty acid-binding protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1476(2), 203-218.

Curto, L. M., Caramelo, J. J., Franchini, G. R., y Delfino, J. M. (2009). $\Delta 98\Delta$, a minimalist model of antiparallel β -sheet proteins based on intestinal fatty acid binding protein. *Protein Science*, 18(4), 735-746.

Curto, L. M., Caramelo, J. J., y Delfino, J. M. (2005). $\Delta 98\Delta$, a functional all- β -sheet abridged form of intestinal fatty acid binding protein. *Biochemistry*, 44(42), 13847-13857.

Flyvbjerg, H., Jobs, E., y Leibler, S. (1996). Kinetics of self-assembling microtubules: an "inverse problem" in biochemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(12), 5975-5979.

Franchini, G. R., Curto, L. M., Caramelo, J. J., y Delfino, J. M. (2009). Dissection of a β -barrel motif leads to a functional dimer: The case of the intestinal fatty acid binding protein. *Protein Science*, 18(12), 2592-2602.

Greenfield, N. J. (1999). Applications of circular dichroism in protein and peptide analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 18(4), 236-244.

Hackl, E. V. (2014). Limited proteolysis of natively unfolded protein 4E-BP1 in the presence of trifluoroethanol. *Biopolymers*, 101(6), 591-602.

Hodsdon, M. E., y Frieden, C. (2001). Intestinal fatty acid binding protein: the folding mechanism as determined by NMR studies. *Biochemistry*, 40(3), 732-742.

Hodsdon, M. E., Ponder, J. W., y Cistola, D. P. (1996). The NMR solution structure of intestinal fatty acid-binding protein complexed with palmitate: application of a novel distance geometry algorithm. *Journal of molecular biology*, 264(3), 585-602.

Khurana, R., Uversky, V. N., Nielsen, L., y Fink, A. L. (2001). Is Congo red an amyloid-specific dye?. *Journal of Biological Chemistry*, 276(25), 22715-22721.

Kim, K., y Frieden, C. (1998). Turn scanning by site-directed mutagenesis: Application to the protein folding problem using the intestinal fatty acid binding protein. *Protein science*, 7(8), 1821-1828.

Kyte, J., y Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology*, 157(1), 105-132.

Knowles, T. P., White, D. A., Abate, A. R., Agresti, J. J., Cohen, S. I., Sperling, R. A., ... y Weitz, D. A. (2011). Observation of spatial propagation of amyloid assembly from single nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(36), 14746-14751.

Knowles, T. P., Waudby, C. A., Devlin, G. L., Cohen, S. I., Aguzzi, A., Vendruscolo, M., ... y Dobson, C. M. (2009). An analytical solution to the kinetics of breakable filament assembly. *Science*, 326(5959), 1533-1537.

Lehrman, S. R., Tuls, J. L., y Lund, M. (1990). Peptide. alpha-helicity in aqueous trifluoroethanol: correlations with predicted. alpha-helicity and the secondary structure of the corresponding regions of bovine growth hormone. *Biochemistry*, 29(23), 5590-5596.

Ma, B., y Nussinov, R. (2006). Simulations as analytical tools to understand protein aggregation and predict amyloid conformation. *Current opinion in chemical biology*, 10(5), 445-452.

Monti, M., di Bard, B. L. G., Calloni, G., Chiti, F., Amoresano, A., Ramponi, G., & Pucci, P. (2004). The regions of the sequence most exposed to the solvent within the amyloidogenic state of a protein initiate the aggregation process. *Journal of molecular biology*, 336(1), 253-262.

Mukhopadhyay, K., y Basak, S. (1998). Conformation induction in melanotropic peptides by trifluoroethanol: fluorescence and circular dichroism study. *Biophysical chemistry*, 74(3), 175-186.

Orte, A., Birkett, N. R., Clarke, R. W., Devlin, G. L., Dobson, C. M., y Klenerman, D. (2008). Direct characterization of amyloidogenic oligomers by single-molecule fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(38), 14424-14429.

Pawar, A. P., Dubay, K. F., Zurdo, J., Chiti, F., Vendruscolo, M., y Dobson, C. M. (2005). Prediction of "aggregation-prone" and "aggregation-susceptible" regions in proteins associated with neurodegenerative diseases. *Journal of molecular biology*, 350(2), 379-392.

Povey, J. F., Smales, C. M., Hassard, S. J., y Howard, M. J. (2007). Comparison of the effects of 2, 2, 2-trifluoroethanol on peptide and protein structure and function. *Journal of structural biology*, 157(2), 329-338.

Rangwala, H., y Karypis, G. (Eds.). (2011). *Introduction to Protein Structure Prediction: Methods and Algorithms (Vol. 18)*. John Wiley Y Sons.

Ropson, I. J., Boyer, J. A., y Dalessio, P. M. (2006). A residual structure in unfolded intestinal fatty acid binding protein consists of amino acids that are neighbors in the native state. *Biochemistry*, 45(8), 2608-2617.

Silva, J. L., y Foguel, D. (2009). Hydration, cavities and volume in protein folding, aggregation and amyloid assembly. *Physical biology*, 6(1), 015002.

Thirumalai, D., Klimov, D. K., y Dima, R. I. (2003). Emerging ideas on the molecular basis of protein and peptide aggregation. *Current opinion in structural biology*, 13(2), 146-159.

Uversky, V. N., y Fink, A. L. (2004). Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1698(2), 131-153.

Watzky, M. A., y Finke, R. G. (1997). Transition metal nanocluster formation kinetic and mechanistic studies. A new mechanism when hydrogen is the reductant: slow, continuous nucleation and fast autocatalytic surface growth. *Journal of the American Chemical Society*, 119(43), 10382-10400.

Yeh, S. R., Ropson, I. J., y Rousseau, D. L. (2001). Hierarchical folding of intestinal fatty acid binding protein. *Biochemistry*, 40(14), 4205-4210.

Zacharias, M. (2010). *Protein-protein complexes: Analysis, modeling and drug design*. World Scientific.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En el trabajo aquí presentado hemos llevado a cabo la caracterización biofísica de la familia de proteínas de IFABP -desarrollada como modelo en nuestro laboratorio- frente a la influencia representada por el cosolvente TFE.

Como característica común, se evidencia un perfil de agregación similar, que alcanza un máximo a 25 % v/v TFE. La naturaleza amiloide de los agregados fue comprobada mediante ensayos de unión a colorantes (Tioflavina-T y Rojo Congo), birrefringencia de la luz polarizada y microscopía TEM. De acuerdo con el análisis de la cinética de agregación, se postuló un mecanismo simple (primario) de nucleación-elongación.

Al cabo, no existe una correlación directa entre la reducción de la estabilidad ($\Delta G^0_{\text{H}_2\text{O}}$: IFABP > $\Delta 78\Delta$ > $\Delta 98\Delta$) y la mayor propensión a la agregación inducida por TFE ($\Delta 78\Delta$ > IFABP \geq $\Delta 98\Delta$). Es notable que $\Delta 98\Delta$, a pesar de su menor estabilidad, ostenta una menor velocidad de agregación respecto de IFABP. Estas observaciones se contradicen a la noción establecida en literatura acerca de que perturbaciones de la estructura nativa -que generan especies con menor estabilidad conformacional- conducirían inevitablemente a una mayor tendencia a la agregación. Este hecho pone de manifiesto el papel secundario que tendría la medida de la energía libre asociada a la proteína nativa (*P*, disuelta en medio acuoso). Además, como las tres proteínas comparten un fragmento común con propensión intrínseca a la agregación, las variaciones observadas en la velocidad de agregación se podrían explicar a partir de las diferencias en la conformación de la proteína, factor que modularía la exposición/accesibilidad de este fragmento crítico.

De la observación detallada de los cambios conformacionales resultantes del desafío con TFE se revela que de 0 a 15 % v/v TFE el contenido de estructura secundaria aumenta para las variantes abreviadas mientras que permanece constante para IFABP. Resulta destacable la sorprendente coincidencia de los espectros de las tres proteínas a 10-15 % v/v TFE. Esta observación permite postular la coalescencia conformacional de estas estructuras en ensamblajes

alterados (cuasi nativos) similares. El efecto ejercido por el cosolvente podría ser explicado en parte por la inducción helicoidal en el segmento C-terminal de las variantes abreviadas que, de otro modo se predicen como sectores desordenados.

En línea con la propuesta acerca del efecto promotor de estructura ejercido por el TFE, al formarse estructuras helicoidales, este sector reduciría su movilidad y, por lo tanto, resultaría más protegido frente de la actividad de proteasas. Como consecuencia estructural global de la adición de cosolvente, se observa un efecto significativo de compactación y reducción de zonas hidrofóbicas expuestas para $\Delta 78\Delta$, siendo ambos efectos algo menores para $\Delta 98\Delta$. Al compactarse, la accesibilidad del solvente al núcleo en presencia de TFE se vería disminuida. Asimismo, la consolidación estructural de las variantes abreviadas origina formas con mayor resistencia a la desnaturalización por temperatura.

En contraposición con las variantes abreviadas, y a juzgar por los resultados de las técnicas espectroscópicas empleadas, la proteína madre sólo sufriría alteraciones estructurales menores en presencia de 10 % v/v TFE. Sin embargo, se observa un aumento de la exposición de zonas hidrofóbicas acompañado de una mayor sensibilidad a la proteólisis, demostrando que el TFE ejerce perturbaciones perjudiciales para la estructura.

Los nuevos datos disponibles nos permiten refinar el modelo estructural propuesto para las proteínas abreviadas: éstas podrían presentar una región común similar a la nativa “decorada” con un tramo C-terminal desordenado. A raíz de su mayor movilidad, se puede especular que este segmento podría dificultar la formación del núcleo dimérico (P_n) de $\Delta 98\Delta$. En la variante más abreviada $\Delta 78\Delta$ -al ser más corto este segmento- esto no podría suceder y la proteína alcanzaría naturalmente el estado dimérico. A su vez, la menor velocidad de agregación con respecto a IFABP y $\Delta 98\Delta$ podría explicarse por el movimiento aleatorio de este segmento que posiblemente retrasara la formación del núcleo de agregación (P_0). Conjuntamente la inducción helicoidal podría contribuir a retardar este fenómeno.

Es importante destacar que aún bajo la influencia de este cosolvente, las proteínas siguen siendo funcionales, pues persiste la capacidad de unión de

ácidos grasos. De esta manera, se puede concluir que el desplazamiento del equilibrio conformacional causado por el cosolvente en esta concentración se limitaría al ensamble nativo de las proteínas.

En cuanto a la estabilidad en presencia del cosolvente, se observó una mayor similitud en las curvas de estabilidad a 10 % v/v TFE en presencia de ambos agentes desnaturalizantes (urea y cloruro de guanidinio), evidenciado por el parámetro de concentración media medida para la transición en las tres proteínas.

Por último, del estudio preliminar de los cambios conformacionales tempranos ocurridos tras el agregado de 25 % v/v TFE se postula que el cambio estructural alcanzado a 10 % v/v TFE mimetizaría aquél necesario para desencadenar plenamente el proceso de formación de fibras amiloides. Dicho de otro modo, las especies formadas a esa concentración de cosolvente, muy probablemente podrían guardar semejanza con las especies propensas a la agregación (P^*).

El enfoque experimental aquí planteado contribuye con nuevos datos que juzgamos relevantes para la comprensión de los cambios conformacionales iniciales conducentes a la formación del núcleo de agregación. En este escenario, el entorno químico provisto por una baja concentración de TFE resulta una opción válida para promover cambios conformacionales similares a los que conducen a la formación de especies propensas a la agregación.

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

Frente a los resultados aquí expuestos se abren nuevos interrogantes acerca de cuáles serían los factores determinantes de la propensión o evasión del fenómeno de agregación proteica. Para intentar alcanzar nuevas respuestas es que planteamos los próximos objetivos de nuestro trabajo:

- Como ya se mencionó, actualmente se están realizando experimentos en colaboración basados en las técnicas de stopped flow con detección por fluorescencia y CD a fin de ampliar la visión sobre la estructura de los intermediarios involucrados en el proceso de agregación. Es un hecho conocido que en muchos casos los experimentos cinéticos revelan claramente la presencia de especies intermediarias apenas visibles o invisibles en el equilibrio.
- Por otro lado, con el propósito de comprender más cabalmente los hechos que subyacen los cambios conformacionales observados, se está ensayando el efecto varios aditivos químicos sobre la conformación y la estabilidad (urea, cloruro de guanidinio, etanol, sulfato de sodio y N-óxido de trimetilamina, entre otros). Algunos de los aditivos seleccionados ya se utilizan ampliamente en baja concentración para mejorar la eficiencia del plegado y evitar la agregación.
- Tras analizar con programas específicos (AMYLPRED 2, [Tsolis y col., 2013]) la estructura primaria de IFABP, se predijo que el péptido de ~14 aminoácidos (correspondiente al sector 58-64/71 de IFABP) podría ser el responsable principal de la propensión a la agregación de estas proteínas. Nuestro objetivo aquí sería utilizar dicho péptido sintético aislado para evaluar su tendencia a la agregación. Aquí surgiría la posibilidad de modificar la propia secuencia y/o el contexto de las secuencias flanqueantes (reduciendo o aumentando su longitud, introduciendo sustituciones en posiciones específicas, etc.) y analizar cómo esos cambios impactan sobre la tendencia a la agregación. Finalmente, podrían producirse quimeras de las tres proteínas

recombinantes completas introduciéndoles las modificaciones del caso en la secuencia o en la vecindad del péptido para ensayarlas, nuevamente, en su estructura, estabilidad y propensión a la agregación.

- Dado que postulamos que la conformación jugaría un rol crítico en la propensión a la agregación, hemos iniciado experimentos destinados a la caracterización de la estructura tridimensional de $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$ por NMR o cristalografía de rayos X. Dadas las previsibles dificultades para la cristalización de especies móviles se estima con mayor probabilidad que será posible obtener resultados a partir de espectros bidimensionales de NMR.
- Complementariamente, a partir de la construcción de modelos atómicos y simulaciones por dinámica molecular y/o modelos de grano grueso (coarse grain) de estas variantes, podrá lograrse una visión mecanística más realista sobre la evolución temporal de estas estructuras enfrentadas al cosolvente TFE.
- Finalmente, destacamos que una variante abreviada de menor longitud ya ha sido identificada (denominada $\Delta 58\Delta$, que también conserva el péptido central IDVVFELGVDFAYS, resultados no publicados). Esta proteína aún no ha sido caracterizada estructuralmente. De ser posible, intentaremos producirla en forma recombinante o, eventualmente, optaremos por su síntesis química. De lograr obtenerla en cantidad adecuada, también la caracterizaremos en medio acuoso y luego la desafiaremos con TFE para evaluar su tendencia a la agregación.

BIBLIOGRAFÍA

Tsolis, A. C., Papandreou, N. C., Iconomidou, V. A., y Hamodrakas, S. J. (2013). A consensus method for the prediction of 'aggregation-prone' peptides in globular proteins. PloS one, 8(1), e54175.

RESUMEN

RESUMEN

El auto-ensamblado de proteínas en fibras amiloides que se depositan en ciertos tejidos está relacionado con numerosos trastornos severos agrupados bajo la denominación de amiloidosis. Los agregados se caracterizan por una organización estructural en hoja β . A pesar de la relevancia médica de estas enfermedades, se sabe poco sobre el proceso de agregación proteica en sí mismo.

En este sentido, en nuestro laboratorio, realizamos estudios biofísicos tendientes a comprender el plegado de proteínas β usando como modelo la proteína que une ácidos grasos de intestino de rata (IFABP). Ésta posee una estructura de barril β formado por dos hojas ortogonales de cinco hebras cada una. El enfoque utilizado fue el de abreviar sistemáticamente la proteína mediante proteólisis controlada en la medida en que se obtuvieran construcciones estables bien plegadas. Así, se produjeron $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$ (correspondientes al segmento 29–126 y 29-106 de IFABP, respectivamente), obtenidas luego de forma recombinante. Brevemente, $\Delta 98\Delta$ es monomérica, conserva el *core* hidrofóbico compacto de IFABP y presentaría una periferia laxa que le confiere una estructura levemente expandida, rindiendo una construcción con menor estabilidad conformacional. $\Delta 78\Delta$ resulta soluble, estable y forma un dímero levemente expandido que conserva la funcionalidad de la proteína original y presenta una estabilidad similar a la de IFABP. Por carecer del cierre del barril, estas variantes podrían presentar bordes libres y es justamente la evasión a la exposición de dichos bordes la principal estrategia descrita para evitar la agregación. Dado que todo polipéptido es plausible de generar fibras, se podría pensar que proteínas formadas mayoritariamente por estructura β presentarían una mayor propensión a agregar. De esta manera, nuestras proteínas nos permitirían evaluar comparativamente el efecto de la presencia/ausencia de distintos determinantes estructurales y/o la acción de ciertos agentes perturbadores de la conformación, en su impacto sobre la topología y la tendencia a la agregación. En este sentido, decidimos desafiar nuestros modelos con 2,2,2 trifluoroetanol (TFE). Nuestra primera propuesta

apuntó al estudio de la tendencia amiloidogénica de estas proteínas. Se analizaron las características morfológicas de los agregados amiloides y se realizó un estudio cinético detallado que dio cuenta de un mecanismo primario simple de nucleación-elongación. Demostramos que no existe una correlación directa entre la estabilidad ($\Delta G^0_{\text{H}_2\text{O}}$: IFABP> $\Delta 78\Delta$ > $\Delta 98\Delta$) y la propensión a la agregación inducida por TFE ($\Delta 78\Delta$ >IFABP \geq $\Delta 98\Delta$). Es notable que $\Delta 98\Delta$, a pesar de su menor estabilidad intrínseca ostenta la menor velocidad de agregación. Este hecho pone de manifiesto el papel secundario que tendría en estos casos el parámetro $\Delta G^0_{\text{H}_2\text{O}}$ asociado a la proteína nativa diluida en medio acuoso. Además, como las proteínas ensayadas comparten un fragmento común propenso a la agregación, las variaciones en la velocidad de agregación se podrían explicar a partir de las diferencias conformacionales, que modularían la exposición/accesibilidad de este sector de la proteína.

De la observación de los cambios conformacionales ocurridos a concentraciones subagregantes (< 15 % v/v TFE), se evidencia que el contenido de estructura secundaria aumenta para las variantes abreviadas y permanece constante para IFABP revelándose un proceso de coalescencia conformacional, evidenciado por la sorprendente coincidencia de los espectros de dicroísmo circular y fluorescencia de las 3 proteínas a 10 % v/v TFE. Como consecuencia estructural, se observa una compactación con mayor protección frente a la actividad de la proteasas para $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$, y además en este último caso una reducción de zonas hidrofóbicas expuestas. En consecuencia, la accesibilidad del solvente al núcleo en presencia de TFE se ve alterada. Asimismo, se evidencia una mayor resistencia a la desnaturalización por temperatura. En contraposición con las variantes abreviadas, IFABP sólo sufre alteraciones estructurales menores a 10 % v/v TFE. Sin embargo, se observa un aumento de la exposición de zonas hidrofóbicas acompañado de una mayor sensibilidad a la proteólisis, demostrando que el TFE ejerce perturbaciones perjudiciales para la estructura.

Los nuevos datos disponibles nos permiten refinar el modelo estructural propuesto para las proteínas abreviadas: éstas podrían presentar una región común similar a la nativa “decorada” con un tramo C-terminal desordenado (predicho también por herramientas computacionales). Por su presumiblemente

mayor movimiento, se puede especular que este segmento representaría un impedimento para la agregación (*entropic bristle*). En $\Delta 78\Delta$, al ser más corto este sector, no sucedería el fenómeno. El cosolvente TFE podría inducir estructura helicoidal en el segmento C-terminal -lo que contribuiría a explicar el aumento en el contenido de estructura secundaria- y sería un factor que ayudaría a retrasar la agregación.

Es importante destacar que bajo influencia de este cosolvente, las proteínas siguen siendo capaces de unir ácidos grasos. De esta manera, preservan funcionalidad, pues la baja concentración modificaría el equilibrio conformacional dentro del ensamble nativo de las proteínas.

En cuanto a la estabilidad en presencia del cosolvente, a 10 % v/v TFE se observó que los valores de concentración media de agente desnaturante de la transición plegado-desplegado se asemejan para las tres proteínas.

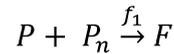
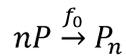
Por último, del estudio preliminar de los cambios conformacionales tempranos ocurridos tras el agregado de 25 % v/v TFE se deduce que el cambio estructural alcanzado a 10 % v/v TFE mimetizaría aquél necesario para desencadenar la agregación. El enfoque experimental aquí planteado contribuye con nuevos datos relevantes para la comprensión del mecanismo conducente a la formación del núcleo de agregación.

APÉNDICE

APÉNDICE SOBRE EL TRATAMIENTO CINÉTICO DE LA AGREGACIÓN

DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA

Considérese el siguiente esquema que describe el proceso de agregación de proteínas como dos pasos irreversibles. El primero describe la formación del núcleo (nucleación) y el segundo el crecimiento de las fibras (elongación).



donde n es el número de moléculas de proteína P que constituye el núcleo P_n y F representa la fibra (en nuestro sistema simplificado se considera colectivamente fibra a toda especie a partir de P_{n+1}).

Las ecuaciones diferenciales que definen el sistema son:

$$\text{I. } \frac{dP}{dt} = -nf_0P^n - f_1P_nP$$

$$\text{II. } \frac{dP_n}{dt} = f_0P^n - f_1P_nP$$

$$\text{III. } \frac{dF}{dt} = f_1P_nP$$

Siendo P_0 la concentración de proteína inicialmente en solución, la ecuación de conservación de la masa sería:

$$P_0 = P + nP_n + (n + 1)F$$

de modo que resulta:

$$0 = \frac{dP}{dt} + n \frac{dP_n}{dt} + (n + 1) \frac{dF}{dt}$$

Entonces:

$$\frac{dP}{dt} = -nf_0P^n - f_1P_nP$$

$$n \frac{dP_n}{dt} = n f_0 P^n - n f_1 P_n P$$

$$(n + 1) \frac{dF}{dt} = (n + 1) f_1 P_n P$$

Reemplazando:

$$0 = [-n f_0 P^n - f_1 P_n P] + [n f_0 P^n - n f_1 P_n P] + [(n + 1) f_1 P_n P]$$

$$0 = -n f_0 P^n + n f_0 P^n - (n + 1) f_1 P_n P + (n + 1) f_1 P_n P$$

$$0 = 0$$

CINÉTICA INICIAL DE AGREGACIÓN

Esta aproximación permite dilucidar (a) el número de pasos requeridos para formar el núcleo y (b) definir exactamente su estequiometría.

En la fase de latencia (*lag phase*) del proceso de agregación resultaría:

$$P \sim P_0;$$

$$P_n \sim 0;$$

$$F \sim 0$$

Así entonces, el sistema de ecuaciones descripto anteriormente se puede aproximar a:

$$I) \quad \frac{dP}{dt} \sim -nf_0P_0^n$$

$$\int_{P_0}^P dP \sim \int_0^t -nf_0P_0^n dt$$

$$P - P_0 \sim -nf_0P_0^n t$$

$$P \sim P_0 - nf_0P_0^n t$$

$$II) \quad \frac{dP_n}{dt} \sim f_0P_0^n$$

$$\int_0^{P_n} dP_n \sim \int_0^t f_0P_0^n dt$$

$$P_n \sim f_0P_0^n t$$

$$III) \quad \frac{dF}{dt} \sim f_1P_nP_0$$

$$\int_0^F dF \sim \int_0^t f_0f_1P_0^{n+1} t dt$$

$$F \sim f_0f_1P_0^{n+1} \frac{t^2}{2}$$

Si divido por F_∞

$$\frac{F}{F_\infty} \sim \frac{f_0f_1P_0^{n+1}}{2F_\infty} t^2$$

Cabe destacar que la señal medida de turbidez (A) es proporcional a F (la concentración de agregados fibrilares expresados en términos de concentración proteica).

Así $\frac{F}{F_\infty}$, resulta igual a $\frac{A}{A_{lim}}$, la evolución relativa de la turbidez.

Por otro lado, si el núcleo P_n no alcanzare una concentración muy alta, esto es, si $f_1 > f_0$, entonces $P_0 \sim P + F$, en la ecuación de conservación de masa.

Al dividir por P_0 :

$$\frac{P_0}{P_0} \sim \frac{P}{P_0} + \frac{F}{P_0}$$

y a tiempos finales ($t \rightarrow \infty$):

$$F \rightarrow F_\infty$$

$$P \rightarrow 0$$

(Ésta última condición queda demostrada experimentalmente en todos los sistemas proteicos ensayados).

Entonces:

$$1 \sim \frac{F_\infty}{P_0} \equiv P_0 \sim F_\infty.$$

De modo que resulta:

$$\frac{F}{F_\infty} \sim \frac{f_0 f_1 P_0^{n+1}}{2P_0} t^2 = \frac{f_0 f_1 P_0^n}{2} t^2$$

Aplicando logaritmos,

$$\log\left(\frac{F}{F_\infty}\right) \sim 2 \log t + \log cte$$

siendo $\frac{f_0 f_1 P_0^n}{2} = cte$

El valor de pendiente del gráfico de $\log\left(\frac{F}{F_\infty}\right)$ en función de $\log t$ resulta ser 2. Siendo que la pendiente de la recta equivale a $k + 2$, donde k es el número etapas intermediarias hasta ensamblarse el núcleo P_n [Flyvbjerg y col., 1996], hallar un valor de $k = 0$ significa que el ensamblado del núcleo P_n sucede en un único paso. (En todos los sistemas proteicos ensayados encontramos que $k = 0$).

Definiendo el tiempo de latencia (*lag time*, t_0) tal como lo describe Flyvbjerg y col., [1996] es decir, aquel en que $\frac{F}{F_\infty}$ alcanza un valor máximo de 0.1 (10 % del valor final), entonces:

$$0.1 \sim \frac{f_0 f_1 P_0^n}{2} t_0^2$$

Reordenando:

$$t_0 \sim \left(\frac{0.2}{f_0 f_1 P_0^n}\right)^{\frac{1}{2}} = \left(\frac{0.2}{f_0 f_1}\right)^{\frac{1}{2}} \left(\frac{1}{P_0^{\frac{n}{2}}}\right)$$

siendo $\left(\frac{0.2}{f_0 f_1}\right)^{\frac{1}{2}} = cte$

De modo que:

$$t_0 \sim cte P_0^{-\frac{n}{2}} \equiv t_0 \sim cte F_\infty^{-\frac{n}{2}}$$

Aplicando logaritmos resulta:

$$\log t_0 \sim \left(-\frac{n}{2}\right) \log F_\infty + \log cte$$

La pendiente de este gráfico contiene información acerca de la estequiometría del núcleo (n). Los valores obtenidos para nuestras proteínas fueron: ~ 1 para IFABP y $\Delta 98\Delta$ y $\sim 1/2$ para $\Delta 78\Delta$. Es decir que para las primeras, el núcleo dimérico se organizaría a partir del monómero P a través de una transición ($n = 2$), mientras que para $\Delta 78\Delta$ la transición sería unimolecular (del tipo $n = 1$). Recuérdese que este último caso, la variante es naturalmente dimérica, de modo que se trataría de la transición desde dímero nativo hacia un núcleo dimérico activado, competente para el fenómeno de agregación.

ESCALADO DOBLE

Un dado esquema cinético es escalable si se puede reducir a un único conjunto de ecuaciones diferenciales una vez que se escalan las variables concentración y tiempo. Si esto es posible, significa que todas las curvas responden a un mismo mecanismo, es decir, el número de pasos cinéticos (etapas) es el mismo y las constantes cinéticas f_0 y f_1 toman los mismos valores.

Las variables escaladas (denotadas con el símbolo $\hat{}$) se definen de la siguiente manera:

$$\frac{P}{P_0} = \hat{P}$$

$$\frac{P_n}{\mu} = \hat{P}_n$$

$$\frac{F}{F_\infty} = \hat{F}$$

$$\frac{t}{t_c} = \hat{t}$$

t_c es un tiempo característico de cada cinética (puede corresponder a t_0 o $t_{1/2}$). Nótese que en todos los casos, los denominadores representan constantes del sistema.

$$\frac{dP}{dt} = \frac{P_0 d\hat{P}}{t_c d\hat{t}} = \frac{P_0}{t_c} \frac{d\hat{P}}{d\hat{t}}$$

$$\frac{dP_n}{dt} = \frac{\mu d\hat{P}_n}{t_c d\hat{t}} = \frac{\mu}{t_c} \frac{d\hat{P}_n}{d\hat{t}}$$

$$\frac{dF}{dt} = \frac{P_0 d\hat{F}}{t_c d\hat{t}} = \frac{P_0}{t_c} \frac{d\hat{F}}{d\hat{t}}$$

$$P^n = \hat{P}^n P_0^n$$

$$P_n = \hat{P}_n \mu$$

De este modo:

$$\frac{P_0}{t_c} \frac{d\hat{P}}{d\hat{t}} = -n f_0 P_0^n \hat{P}^n - f_1 \mu \hat{P}_n P_0 \hat{P}$$

$$\frac{\mu}{t_c} \frac{d\hat{P}_n}{d\hat{t}} = f_0 P_0^n \hat{P}^n - f_1 \mu \hat{P}_n P_0 \hat{P}$$

$$\frac{P_0}{t_c} \frac{d\hat{F}}{d\hat{t}} = f_1 \mu \hat{P}_n P_0 \hat{P}$$

- I) $\frac{d\hat{P}}{d\hat{t}} = -n [f_0 P_0^{n-1} t_c] \hat{P}^n - [f_1 \mu t_c] \hat{P}_n \hat{P}$
- II) $\frac{d\hat{P}_n}{d\hat{t}} = \left[\frac{f_0 P_0^n t_c}{\mu} \right] \hat{P}^n - [f_1 P_0 t_c] \hat{P}_n \hat{P}$
- III) $\frac{d\hat{F}}{d\hat{t}} = [f_1 \mu t_c] \hat{P}_n \hat{P}$

Para que todos los factores entre corchetes sean iguales a la unidad, esto es, para que el sistema sea escalable, deben cumplirse ciertas condiciones.

Si $f_1 \mu t_c = 1$ y $f_1 P_0 t_c = 1$ resulta: $\mu = P_0$

De modo que $\frac{f_0 P_0^n t_c}{\mu} = f_0 P_0^{n-1} t_c = 1$

Entonces deberá cumplirse simultáneamente que: $t_c = \frac{1}{f_1 P_0}$ y $\frac{1}{f_0 P_0^{n-1}}$

multiplicando miembro a miembro estas ecuaciones resulta:

$$t_c^2 = \frac{1}{f_0 f_1 P_0^n}$$

$$t_c = \frac{\left(\frac{1}{f_0 f_1} \right)^{\frac{1}{2}}}{P_0^{\frac{n}{2}}}$$

Reagrupando constantes resulta que t_c cumple con la siguiente relación:

$$t_c = \varphi P_0^{-\gamma}$$

donde $\varphi = \left(\frac{1}{f_0 f_1}\right)^{\frac{1}{2}}$ y $\gamma = n/2$

Recuérdese, que por lo visto anteriormente, t_0 cumple con esta relación. De modo que t_0 es un tiempo característico.

BIBLIOGRAFÍA

Flyvbjerg, H., Jobs, E., y Leibler, S. (1996). Kinetics of self-assembling microtubules: an "inverse problem" in biochemistry. Proceedings of the National Academy of Sciences, 93(12), 5975-5979.

“Life is like riding a bike, to keep your balance you must keep on moving.”

Albert Einstein

