

Tesis Doctoral

DISEÑO, SÍNTESIS Y ESTRUCTURA DE DOMINIOS
HELICOIDALES
INFLUENCIA DE LA INTRODUCCIÓN DE AMINOÁCIDOS D

Carmen Giovana Granados Ramírez



Departamento de Química Orgánica
Facultad de Química
Universidad de Barcelona
Barcelona, 2007

CAPÍTULO 3
*Síntesis, caracterización estructural y evaluación de la interacción con
inmunoglobulina G de nuevos análogos del dominio B de la proteína A
de Staphylococcus aureus*

3. Síntesis, caracterización estructural y evaluación de la interacción con inmunoglobulina G de nuevos análogos del dominio B de la proteína A de *Staphylococcus aureus*

3.1. Introducción

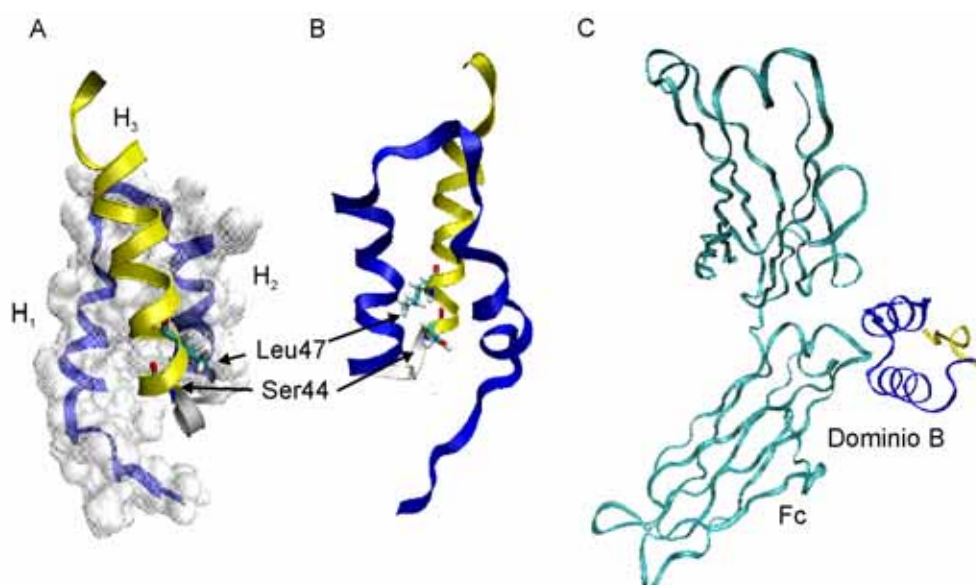
El dominio B es uno de los cinco dominios homólogos de la proteína A de *Staphylococcus aureus*^{1,2}. Esta proteína de la superficie del *S. aureus* interviene en el mecanismo de evasión del sistema inmune por parte de la bacteria³. La característica principal de esta proteína es la gran afinidad que posee por el fragmento cristalizante (Fc) de inmunoglobulinas⁴⁻⁶. La región de la proteína involucrada en esta interacción posee 5 dominios homólogos denominados E, D, A, B y C en este orden desde la región N-terminal⁷.

La estructura del dominio B determinada por RMN contiene un haz de tres hélices antiparalelas⁸. Las tres regiones helicoidales se encuentran ubicadas entre los residuos de Gln12-His21, Glu27-Asp39 y Ser44-Ala59. Aunque la estructura de las dos primeras hélices se determinó inicialmente por cristalografía de rayos X en el complejo del dominio con Fc de Inmunoglobulina, el segmento entre Ala49-Ala57 se encontraba en forma extendida dentro del cristal⁹. No obstante, los datos estructurales obtenidos a partir de RMN, han demostrado que la hélice C-terminal (H₃) existe en el complejo con Fc^{10,11}. La región de la H₃ se encuentra en la cara opuesta al complejo y sólo los residuos pertenecientes a la primera y segunda hélices (H_{1,2}) son responsables de la unión a Fc. Los residuos entre Gln12, Gln11, Phe16, Tyr17, Leu20, His21 de la primera hélice (H₁) y los residuos Arg30, Asn31, Ile34, Gln35, Leu37 y Lys38 de la segunda hélice (H₂) comprenden la superficie de unión a Fc¹²(Figura 1).

Aunque la región de H₃ no tiene contactos directos con Fc, esta región desempeña un papel crucial para el correcto plegamiento del dominio B. La interacción entre Fc y el dominio B depende de la estructura helicoidal de las regiones correspondientes a las dos primeras hélices, la presencia de la tercera hélice promueve la formación de un haz de tres hélices estable. Análogos del dominio B con secuencias truncadas en la región C-terminal han demostrado tener una actividad limitada frente a la unión con IgG humana, así la reducción de los últimos 10 residuos ocasiona una disminución de la constante de afinidad de hasta tres órdenes de magnitud¹³, pasando de 10⁷ M⁻¹ a 10⁴ M⁻¹. Por otra parte, de acuerdo con resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio, el péptido con la secuencia

correspondiente a la secuencia H₁₋₂ presenta una disminución notable de la helicidad respecto al dominio B así como una menor estabilidad térmica¹⁴. Adicionalmente, los péptidos correspondientes a la región H₁₋₂ y la región H₃ en disolución se encuentran desestructurados, pero al ser mezclados se observa un aumento en la helicidad del sistema, indicando la formación de un complejo no covalente¹⁵. La interacción entre estos péptidos y el cambio conformacional involucrado se aprovechó para diseñar y analizar una químioteca OBOC de análogos de H₃, donde se tiene un péptido diferente por cada unidad de resina. Del análisis de la químioteca fue posible identificar péptidos capaces de unirse al fragmento H₁₋₂^{16,17}. Estos análogos de H₃ se seleccionaron después de un cribado de la químioteca tras la incubación con el péptido H₁₋₂ e inmunoglobulina de conejo marcada con una sonda fluorescente. Dos péptidos análogos de H₃ se encontraron en mayor cantidad, ambos poseían la mutación de serina 44 por fenilalanina y sólo diferían en la naturaleza de la mutación en el residuo de leucina 47. El mutante H_{3FANK} poseía un residuo de lisina y el mutante H_{3FANV} tenía un residuo de valina en la posición 47 (Tabla 1).

Figura 1. Representación tipo cintas del dominio B a partir de la estructura del PDB 1BDD⁸ usando el programa VMD¹⁸. El fragmento H₁₋₂ se muestra en azul y la región de H₃ en amarillo (A, B), en la región H₁₋₂ también se representan los radios de van de Waals (A). Las posiciones en las cuales se realizaron las mutaciones se señalan con flechas (A, B). En el apartado C se muestra la representación del complejo entre el fragmento cristalizable y el dominio B determinado por cristalografía de Rayos X (PDB 1FC1)⁹.




A partir de la observación cualitativa de la asociación entre los fragmentos H₁₋₂ con H₃ o sus análogos, se plantearon los objetivos desarrollados en este capítulo:

El objetivo general se dirigió hacia el análisis los efectos sobre la estructura, estabilidad y actividad de las mutaciones realizadas en el núcleo hidrofóbico de los análogos del dominio B en los residuos Ser44 y Leu 47, desde dos diferentes estrategias. Por un lado, desde el punto de vista de los dominios en forma covalente; y por otro, desde la aproximación de los complejos no covalentes formados entre el péptido con la secuencia de la hélice C-terminal con el fragmento N-terminal que contiene la secuencia de las dos primeras hélices. Para lograr este objetivo, el proyecto se subdividió en los siguientes objetivos específicos:

- En primer lugar sintetizar químicamente el dominio B y sus dos análogos, de forma covalente y no covalente, con las mutaciones Ser44Phe/Leu47Lys y Ser44Phe/Leu47Val (Tabla 1).
- Realizar un estudio comparativo de los complejos no covalentes H₁₋₂/H₃ y análogos desde el punto de vista conformacional y de interacción frente al reconocimiento por parte de la inmunoglobulina.
- Por ultimo, determinar también comparativamente los efectos de los análogos en el núcleo hidrofóbico de los dominios completos desde el punto de vista estructural y de interacción con la inmunoglobulina G.

Tabla 1. Secuencias de los péptidos y dominios sintetizados

Péptido	Secuencia
H _{3n}	Ac-D ⁴⁰ PSQS ⁴⁴ ANL ⁴⁷ LAEAKKLNDAQAPK ⁶¹ -NH ₂
H _{3FANK}	Ac-D ⁴⁰ PSQF ⁴⁴ ANK ⁴⁷ LAEAKKLNDAQAPK ⁶¹ -NH ₂
H _{3FANV}	Ac-D ⁴⁰ PSQF ⁴⁴ ANV ⁴⁷ LAEAKKLNDAQAPK ⁶¹ -NH ₂
H _{3a}	Ac-A ⁴⁰ QKQA ⁴⁴ SPD ⁴⁷ ALEKNLPKADNASL ⁶¹ -NH ₂
H ₁₋₂	Ac-A ¹ PKADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNNEEQRNGFIQSLK ³⁹ -NH ₂
CxH ₁₋₂	Ac-CAhxA ¹ PKADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNNEEQRNGFIQSLK ³⁹ -NH ₂
Dominio B	Ac-A ¹ PKADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNNEEQRNGFIQSLKDDPSQS ⁴⁴ ANL ⁴⁷ LAEAKKLNDAQAPK ⁶¹ -NH ₂
Dominio FANK	Ac-A ¹ PKADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNNEEQRNGFIQSLKDDPSQF ⁴⁴ ANK ⁴⁷ LAEAKKLNDAQAPK ⁶¹ -NH ₂
Dominio FANV	Ac-A ¹ PKADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNNEEQRNGFIQSLKDDPSQF ⁴⁴ ANV ⁴⁷ LAEAKKLNDAQAPK ⁶¹ -NH ₂
	
	<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> Región H₁₋₂ Región H₃ </div>

3.2. Síntesis de los péptidos H_{3n}, H_{3a}, H_{3FANK}, H_{3FANV} y H₁₋₂

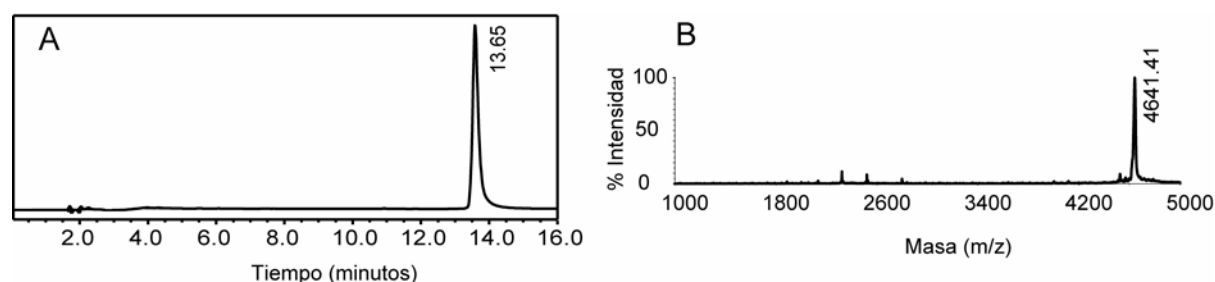
Los péptidos correspondientes a la región N-terminal (H₁₋₂) y los péptidos derivados de la región C-terminal del dominio B (H_{3n}, H_{3a}, H_{3FANK}, H_{3FANV}) se sintetizaron sobre 137 mg de resina Rink amida (0.7 mmol/g, escala de trabajo de 0.1 mmol) por química Fmoc/tBu. La

incorporación de los aminoácidos se llevo a cabo usando el procedimiento estándar de activación con TBTU/DIEA. Los péptidos libres se escindieron de la resina después del tratamiento con una mezcla de TFA/H₂O/TIS/fenol (80:15:5:5 v/v/v/w) por 1h. El TFA se eliminó por evaporación y los péptidos se aislaron por precipitación con éter dietílico. Los péptidos se purificaron por HPLC en fase reversa C18 y se caracterizaron con HPLC en fase reversa a escala analítica, análisis de aminoácidos y espectrometría de masas MALDI-TOF. El péptido de 39 residuos correspondiente al fragmento H₁₋₂ se sintetizó automáticamente en condiciones similares a los péptidos anteriores, en este caso se redujo la funcionalización hasta 0.3 mmol/g de resina (ver 6.2). Todos los péptidos se obtuvieron como especies mayoritarias con purzas superiores al 60% de acuerdo al perfil obtenido por RP-HPLC. Igualmente las masas moleculares coinciden con lo esperado (Tabla 2). Los productos fueron purificados por RP-HPLC semipreparativo hasta obtener purzas superiores al 97% para poder ser caracterizados y usados en ensayos de actividad (Figura 2).

Tabla 2. Rendimiento de los péptidos sintetizados con la masa esperada y masa encontrada. Tiempo de retención (T_r) de cada péptido usando un gradiente lineal de 0-100 % de ACN en 15 min con 0.036% de TFA

Péptido	Rendimiento (%)	T _r (min)	Masa esperada (M+H) ⁺	Masa encontrada (M+H) ⁺
H _{3n}	23	6.2	2350.2	2349.2
H _{3a}	29	5.8	2350.2	2350.4
H _{3FANK}	39	5.9	2425.3	2425.6
H _{3FANV}	26	6.8	2396.3	2396.2
H ₁₋₂	16	7.0	4642.1	4641.4

Figura 2. Cromatograma de RP-HPLC (A) y espectro de masas MALDI-TOF del péptido H₁₋₂ (B). El cromatograma se obtuvo usando un gradiente lineal de 0-40 % de ACN con 0.036% de TFA en 15 min



3.3. Síntesis del dominio natural y sus dominios análogos

3.3.1. Síntesis por química Boc del dominio B natural

El dominio B completo que abarca las regiones de las tres hélices posee en total 61 residuos. Previamente en nuestro laboratorio se había sintetizado químicamente esta proteína empleando diferentes estrategias de síntesis que incluían química Fmoc/tBu y Boc/Bn. Los mejores resultados se habían obtenido con química Boc/Bn¹⁴ aunque se obtuvieron perfiles cromatográficos complejos y de difícil purificación. Los diferentes resultados obtenidos al comparar estas dos estrategias se deben principalmente a que las condiciones ácidas de la desprotección del grupo Boc permiten reducir las interacciones inespecíficas entre cadenas generadas al aumentar la cadena peptídica en crecimiento¹⁹⁻²¹. Teniendo este conocimiento previo se decidió como primer intento realizar la síntesis del dominio B por esta química.

La síntesis se realizó sobre resina *p*-MBHA (0.7 mmoles/g de resina, 0.1 mmol) incorporando automáticamente cada uno de los residuos (ver 6.3). Los aminoácidos se incorporaron como ésteres activos de HOBt generados por reacción con DCC y HOBt en DMF. Para aumentar la eficiencia del acoplamiento se realizó un segundo ciclo para hacer reaccionar los sitios activos que bajo las condiciones anteriores no reaccionaron. En este ciclo se utilizó un exceso de DIEA (3.8 equivalentes) para neutralizar grupos amino libres protonados y se adicionó un 15 % de DMSO para mejorar la solvatación de la peptidil resina²². Después del acoplamiento la peptidil resina se sometió a un ciclo de acetilación con anhídrido acético para bloquear los grupos amino que aun no hubieran reaccionado. Al finalizar la última desprotección la resina se trasladó a una jeringa de polipropileno con filtro para ser acetilada manualmente (ver 6.2.3.). Finalmente las cadenas laterales fueron desprotegidas y el péptido desanclado de la resina por tratamiento con HF/*m*-cresol^{23,24}.

El producto crudo obtenido presentaba un perfil cromatográfico y espectro de masas complejo que mostraba la presencia de gran cantidad de impurezas (Figura 3). El producto crudo obtenido se separó en diferentes fracciones por RP-HPLC, las cuales fueron posteriormente analizadas por espectrometría de masas MALDI-TOF. Se observó que la mayoría de impurezas correspondían a secuencias truncadas de menor masa molecular a la esperada. El producto esperado se obtuvo con un rendimiento muy bajo, cercano al 1% de lo esperado. De acuerdo con los perfiles de masas encontrados se podían localizar tres regiones en las cuales la incorporación del aminoácido había sido incompleta. Estas

regiones se encontraban entre los residuos 9-14, 21-32 y 41-47 (Tabla 3).

Figura 3. Caracterización del producto crudo obtenido de la síntesis del dominio B nativo usando química Boc/Bzl. Cromatograma de RP-HPLC obtenido con un gradiente de 5-40% de ACN con 0.036% de TFA en 15min. (A) y espectro de masas MALDI-TOF del producto (B). La masa molecular esperada se encuentra en la fracción que aparece a un tiempo de retención de 10.9 min

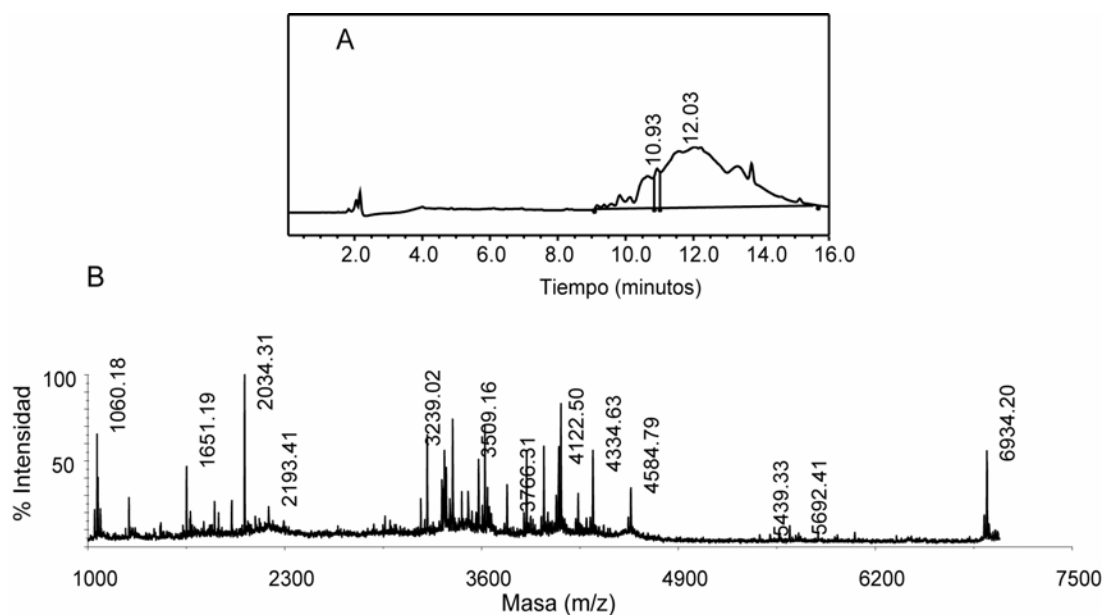


Tabla 3. Masas moleculares de cada uno de los posibles fragmentos truncados en la síntesis del dominio B nativo. En gris se destacan las masas moleculares encontradas experimentalmente en el espectro MALDI-TOF del producto

Residuo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Acetilo	A	P	K	A	D	N	K	F	N	K	E	Q	Q	N	A	F	Y	E	I	L	H
Acoplamiento	61	60	59	58	57	56	55	54	53	52	51	50	49	48	47	46	45	44	43	42	41
Fragmentos acetilados	6980	6862	6765	6637	6566	6451	6337	6209	6062	5948	5820	5691	5563	5435	5321	5250	5103	4940	4811	4697	4584
Fragmentos	6937	6819	6722	6594	6523	6408	6294	6166	6019	5905	5777	5648	5520	5392	5278	5207	5060	4897	4768	4654	4541
Residuo	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
Acetilo	L	P	N	L	N	E	E	Q	R	N	G	F	I	Q	S	L	K	D	D	P	S
Acoplamiento	40	39	38	37	36	35	34	33	32	31	30	29	28	27	26	25	24	23	22	21	20
Fragmentos acetilados	4447	4334	4237	4123	4010	3896	3767	3638	3510	3354	3240	3183	3036	2923	2794	2707	2594	2466	2351	2236	2139
Fragmentos	4404	4291	4194	4080	3967	3853	3724	3595	3467	3311	3197	3140	2993	2880	2751	2664	2551	2423	2308	2193	2096
Residuo	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61		
Acetilo	Q	S	A	N	L	L	A	E	A	K	K	L	N	D	A	Q	A	P	K		
Acoplamiento	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1		
Fragmentos acetilados	2052	1924	1837	1766	1652	1539	1426	1355	1226	1155	1027	898	785	671	556	485	357	286	189		
Fragmentos	2009	1881	1794	1723	1609	1496	1383	1312	1183	1112	984	855	742	628	513	442	314	243	146		

La mayoría de las impurezas encontradas corresponden a fragmentos peptídicos acetilados, esto mostró que la incorporación de estos aminoácidos no se había completado. La zona de secuencias truncadas entre los residuos 21-32 es particularmente importante ya que estas masas moleculares se observaron en gran parte de las fracciones después de la purificación

y presentaban señales intensas en el espectro de masas. La dificultad de la síntesis en esta región redujo en gran parte el rendimiento final de la síntesis.

3.3.2. Síntesis por química Fmoc del dominio B natural

La dificultad de purificación del producto obtenido siguiendo la estrategia Boc hizo necesario cambiar la metodología de síntesis. Se decidió usar química Fmoc/tBu^{25,26} cambiando el protocolo estándar de síntesis²⁷. Dos factores podían haber afectado la eficiencia global de la síntesis anterior, por un lado la formación de estructuras complejas por interacciones entre las cadenas peptídicas largas que dificultan la reacción de acoplamiento de los aminoácidos^{28,29} y por otro la eficiencia de la desprotección del grupo amino terminal después de cada acoplamiento³⁰.

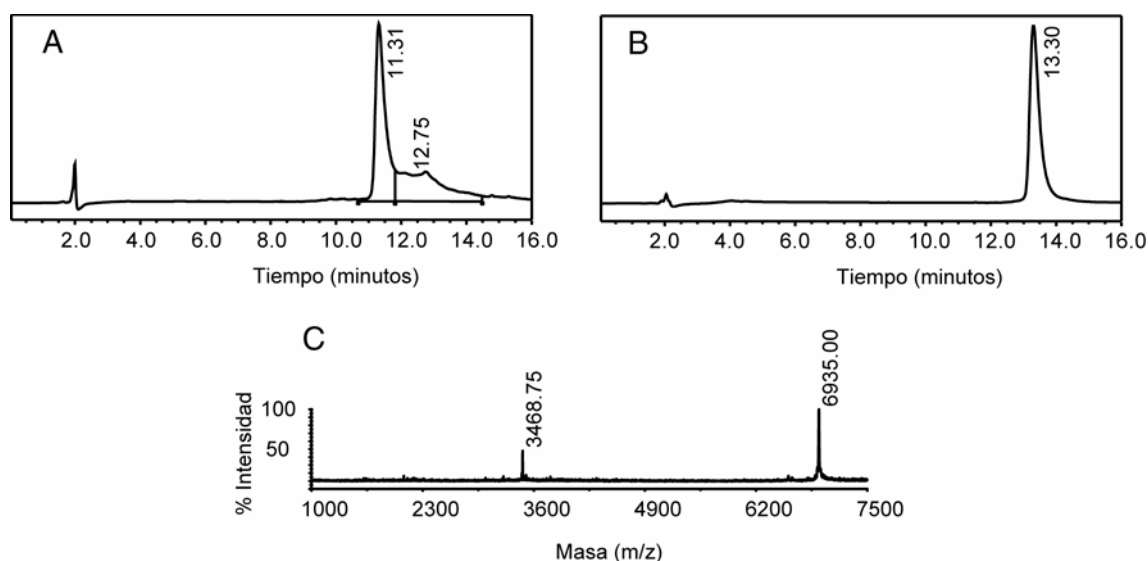
Con el fin de llevar al mínimo las interacciones entre cadenas se redujo la funcionalización de la resina hasta 0.2 mmol/ g de resina. Para ello se partió de resina funcionalizada con el espaciador *p*-MBHA (0.7 mmol/g de resina, 0,245 mmoles) y se acoplaron 0,1 mmol Fmoc-Gly-OH preactivados con TBTU/HOBt/DIEA 1:1:1.5 durante toda la noche con el fin de asegurar la incorporación completa del residuo. Es importante notar que en este paso de síntesis, la solución de reactivos se adicionó muy lentamente agitando continuamente la resina por medio de una corriente de nitrógeno, para obtener una distribución homogénea de sitios activos sobre la superficie de la resina. Posteriormente se acetilaron los grupos amino libres y se incorporó el espaciador bifuncional Rink. Sobre este soporte sólido se incorporaron los aminoácidos de la secuencia preactivados con TBTU/HOBt/DIEA 1:1:1.5 siguiendo el protocolo de activación estándar (ver 6.2).

En el caso de la desprotección del grupo amino terminal con piperidina en DMF, a medida que crece la cadena se hace más difícil la eliminación del grupo Fmoc³¹. Para aumentar la eficiencia de la desprotección se usó una disolución de piperina al 22 % en DMF y se le adicionó 0.07% de triton X-100. Las propiedades como detergente del tritón X-100 hacen que las cadenas polipeptídicas se separen evitando interacciones inespecíficas entre cadenas y así facilitar la eliminación del grupo protector^{32,33}.

Después de la desprotección del último residuo el grupo amino terminal se acetiló con anhídrido acético. La peptidil resina se trató con TFA/H₂O/TIS/EDT (94:5:1:1 v/v) para eliminar los grupos protectores de las cadenas laterales y escindir el péptido de la resina. El péptido obtenido fue analizado por RP-HPLC analítico y espectrometría de masas MALDI-TOF (Figura 4). La especie mayoritaria en el cromatograma, con un 60% del área respecto

al total de señales, poseía la masa molecular esperada. El dominio purificado por HPLC semipreparativo se obtuvo con un grado de pureza mayor al 98 %, apto para ser usado en los experimentos posteriores, y con un rendimiento final de síntesis del 13 %.

Figura 4. Cromatogramas RP-HPLC y espectros de masas MALDI-TOF del producto crudo y purificado de la síntesis del dominio B nativo por química Fmoc/tBu. Cromatograma del producto crudo obtenido de las síntesis usando un gradiente de 5-40% ACN en 15min. (A). Cromatograma del dominio B purificado usando un gradiente 0-35% de ACN (B) y el espectro de masas MALDI-TOF (C)



3.3.3. Síntesis de los dominios análogos

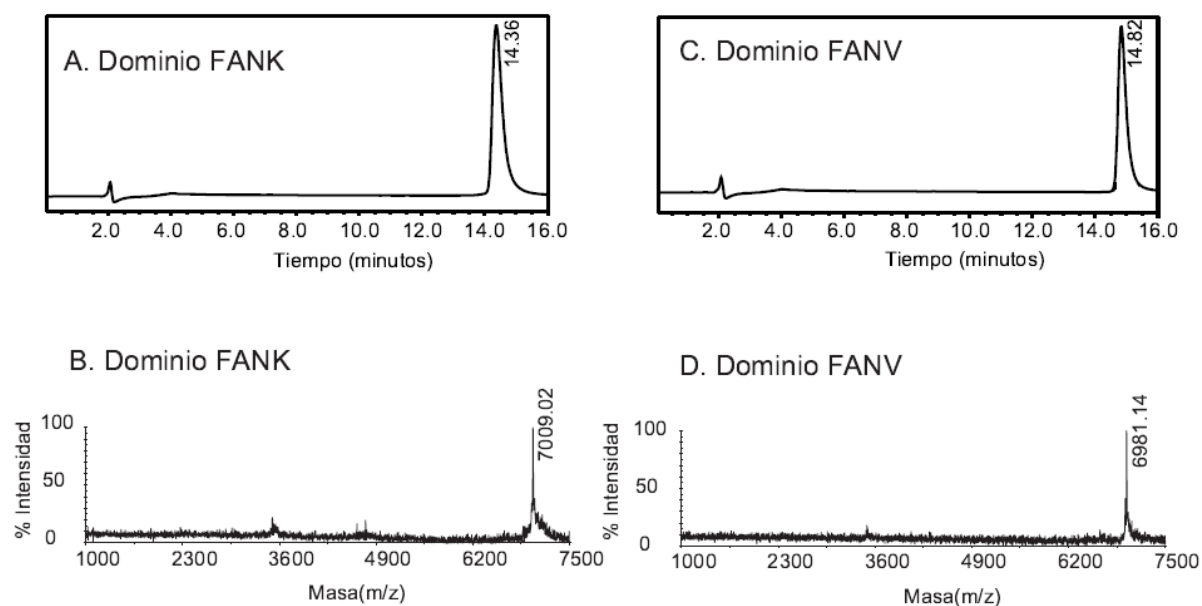
El éxito de la síntesis del dominio natural permitió establecer las condiciones óptimas para la síntesis de los dos análogos con las mutaciones en los residuos 44 y 47. El dominio FANK corresponde a la proteína con una mutación de serina por fenilalanina en la posición 44 y leucina por lisina en la posición 47. Mientras que el dominio FANV posee un residuo de fenilalanina en la posición 44 y de valina en la posición 47 (Tabla 1). Como previamente se ha descrito, las principales características de las síntesis fueron la reducción de la funcionalización de la resina hasta 0.018 -0.2 mmoles/g de resina, la adición de tritón x-100 a la mezcla de eliminación del grupo Fmoc y la utilización de TBTU/HOBt como sistema de activación. Los dominios se obtuvieron con rendimientos similares a la síntesis del dominio B. La señal mayoritaria en los cromatogramas (> 60 %) correspondía a la masa molecular esperada. Después de la purificación se lograron obtener los productos una pureza mayor al 98 % con un rendimiento final de síntesis y purificación del 14 % (Figura 5, Tabla 4). Mediante estas condiciones de síntesis se pretendía superar las limitantes encontradas en la síntesis de péptidos largos, esto es eliminación de impedimentos estéricos que facilitarían

interacciones entre cadenas y bajos rendimientos en el paso de eliminación del grupo Fmoc.

Tabla 4. Rendimiento de los dominios sintetizados con la masa teórica y masa encontrada

Péptido	Rendimiento (%)	Masa esperada (M+H) ⁺	Masa encontrada (M+H) ⁺
Dominio B	13	6936.7	6935.0
Dominio FANK	14	7007.6	7009.0
Dominio FANV	14	6978.6	6981.1

Figura 5. Cromatograma RP-HPLC obtenido con un gradiente de 0-35% de ACN en 15 min. y el espectro de masas MALDI-TOF del dominio FANK (A,B). Cromatograma obtenido con un gradiente de 0-35% de ACN en 15 min. y espectro de masas MALDI-TOF del dominio FANV (C,D)



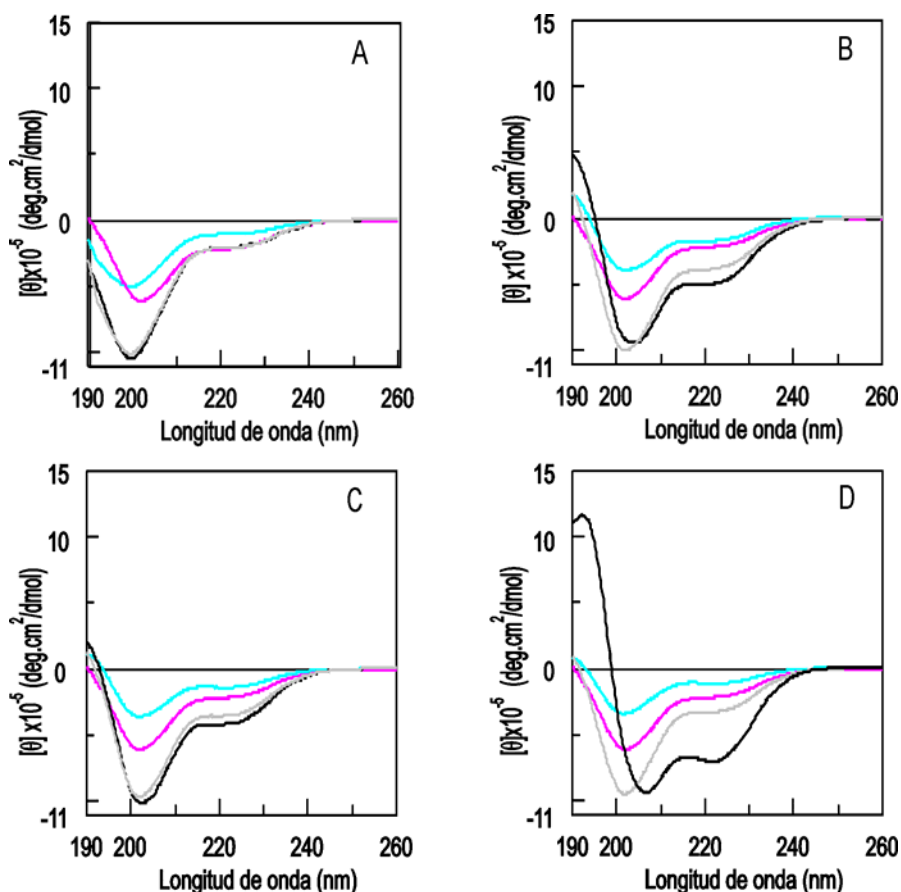
3.4. Dominios no covalentes

3.4.1. Análisis conformacional por dicroísmo circular

El análisis de las bandas del espectro de dicroísmo circular de péptidos y proteínas permite obtener información acerca de la estructura secundaria de estas especies³⁴. La estructura de hélice α genera un espectro de dicroísmo circular característico, con un máximo positivo a 190 nm, y dos mínimos negativos a 208 nm y 222 nm³⁵.

El dominio B nativo adopta una estructura principalmente helicoidal. La proteína es un haz de tres hélices antiparalelas⁹. El fragmento que abarca las H₁ y H₂ por sí sólo no es capaz de adoptar una estructura determinada^{36,37}. La región que corresponde a la H_{3n} es necesaria para la formación y mantenimiento de una estructura estable¹⁶. Este hecho ya se había observado en nuestro laboratorio, mezclas de péptidos con las secuencias correspondientes a los fragmentos de H₁₋₂ y H_{3n} forman complejos no covalentes en experimentos de dicroísmo circular^{14,15}.

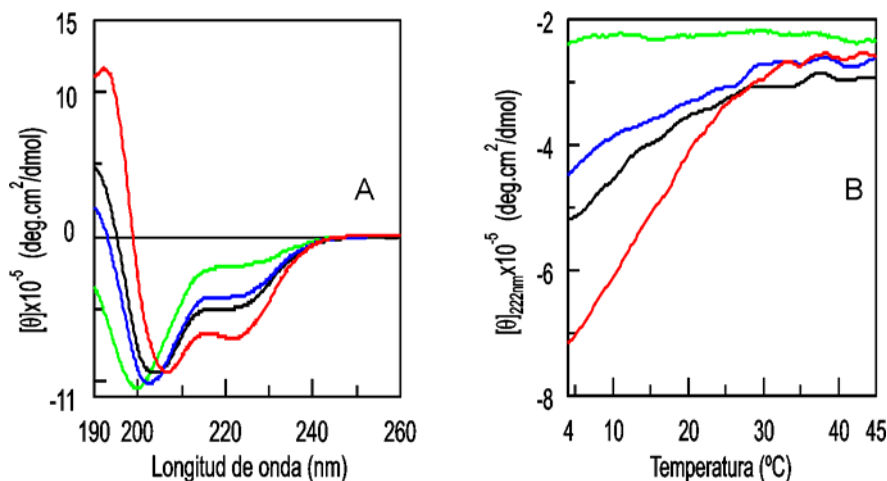
Figura 6. Espectros de dicroísmo circular de los péptidos individuales y de las mezclas equimolares de los péptidos H_{3n}, H_{3a}, H_{3FANK}, H_{3FANV} con H₁₋₂. Cada cuadro muestra el conjunto de espectros de los sistema H₁₋₂/ H_{3n} (A), H₁₋₂/ H_{3a} (B), H₁₋₂/ H_{3FANK} (C), H₁₋₂/ H_{3FANV} (D). Los espectros fueron obtenidos de las disoluciones a 40 µM de los péptidos en tampón fosfato 10 mM , NaCl 100 mM a pH 7.4 a 4°C. Código de colores: Péptidos H_{3n}, H_{3a}, H_{3FANK}, H_{3FANV} en azul claro, H₁₋₂ en violeta, la suma aritmética de los espectros de los péptidos y H₁₋₂ en gris y las mezclas equimolares de los péptidos y H₁₋₂ en negro



Para confirmar que los péptidos análogos formaban complejos con el fragmento N-terminal

del dominio B, H_{1-2}/H_{3x}^a , similares al formado con el péptido H_{3n} , se obtuvieron los espectros de dicroísmo circular de los péptidos individuales (H_{3n} , H_{3FANK} , H_{3FANV} , H_{3a}) y en mezclas equimolares con H_{1-2} a $40 \mu\text{M}$ en tampón fosfato a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ¹⁶. El espectro de H_{1-2}/H_{3n} fue usado como control positivo de la interacción y la mezcla H_{1-2}/H_{3a} se usó como control negativo. Se observó que todos los péptidos individuales se encontraban desestructurados en estas condiciones. Sin embargo, los espectros de dicroísmo circular de las mezclas mostraban un aumento en la intensidad de la banda a 222 nm respecto al espectro obtenido de la suma aritmética de los péptidos individuales (Figura 6). Según lo esperado, el espectro de la H_{1-2}/H_{3a} mezcla conservaba el perfil característico de estructuras desordenadas. Este resultado parecía indicar la formación de complejos no covalentes de los análogos H_{3FANK} , H_{3FANV} con H_{1-2} . Al comparar la intensidad de la banda a 222 nm de las diferentes mezclas se observó que seguían el siguiente orden $H_{1-2}/H_{3FANV} > H_{1-2}/H_{3n} > H_{1-2}/H_{3FANK} >> H_{1-2}/H_{3a}$. Esto mostraba que la modificación Ser44Phe y Leu47Val estabilizaba la formación del complejo no covalente con mayor intensidad que la modificación Ser44Phe y Leu47Lys y que el sistema nativo.

Figura 7. A. Esquema comparativo de los espectros de dicroísmo circular de las mezclas equimolares de los sistemas H_{1-2}/H_{3n} (negro), H_{1-2}/H_{3a} (verde), H_{1-2}/H_{3FANK} (azul) y H_{1-2}/H_{3FANV} (rojo). B. Curvas de estabilidad térmica, variación de la elipticidad a 222 nm con la temperatura de cada una de las mezclas



La observación de la formación de complejos helicoidales entre H_{1-2} y los péptido H_{3n} , H_{3FANK} , H_{3FANV} llevó a verificar la estabilidad térmica de estos complejos. Para ello se

^a La nomenclatura H_{1-2}/H_{3x} indica la mezcla de los péptidos correspondientes en disolución. H_{1-2} es el péptido N-terminal del dominio B que contiene la secuencia de las hélices 1 y 2. H_{3x} corresponde al péptido con la secuencia natural de la hélice C-terminal del dominio o sus análogos.

obtuvieron curvas de variación de la elipticidad molar con la temperatura a 222 nm (Figura 7). En los sistemas H_{1-2}/H_{3n} , H_{1-2}/H_{3FANK} y H_{1-2}/H_{3FANV} a medida que aumentaba la temperatura la banda a 222 nm iba desapareciendo, manteniéndose constante después de 30 °C. La elipticidad molar del sistema H_{1-2}/H_{3a} permaneció constante en todo el rango de temperaturas, indicando que no había asociación ni un cambio en la estructura de la mezcla. Esta diferencia permitió comprobar la formación de complejos no covalentes con estructura terciaria tanto en el sistema nativo como en los sistemas análogos. La forma de las curvas de los complejos demostró que el proceso de desnaturalización no era cooperativo para ninguno de los sistemas estudiados. En este caso aunque la formación del complejo es evidente, las interacciones péptido-péptido son débiles y gran parte de la estabilidad se encuentra limitada por interacciones con el disolvente³⁸⁻⁴⁰.

3.4.2. Estudios de interacción por resonancia de plasmon superficial

3.4.2.1. Interacción entre H_{1-2} y los péptidos

Puesto que los resultados obtenidos por dicroísmo circular mostraron que los péptidos análogos de H_{3n} eran capaces de interactuar con H_{1-2} , se decidió estudiar la unión con H_{1-2} por medio de RPS. Para esto el péptido análogo de H_{1-2} con la secuencia N-terminal Cys-Ahx se inmovilizó quimiosselectivamente a un sensor CM5 por medio de un enlace disulfuro^{26,41}.

Inicialmente se estudió la interacción del péptido CxH_{1-2} con los péptidos H_{3n} , H_{3FANK} y H_{3FANV} , usando H_{3a} como control negativo. Disoluciones de los péptidos a diferentes concentraciones se inyectaron sobre la superficie del sensor con diferentes grados de inmovilización (154, 500, 1000 RU, unidades de respuesta), en tampón HBS-EP pH 7.4 a 25 °C (ver 2.8). Después de eliminar la repuesta obtenida de la referencia se observó que la repuesta relativa obtenida al inyectar, H_{3n} , H_{3FANK} y H_{3FANV} , aumentaba al incrementar la concentración. Sin embargo, el perfil de los sensogramas era rectangular, los datos adquiridos no mostraron una curva en la fase de asociación y una curva de decaimiento en la fase de disociación (Figura 8). La respuesta obtenida al variar la concentración de ligando en sistema control H_{1-2}/H_{3a} permaneció constante, lo que indicaba que estos dos péptidos no interactuaban. El aumento de la respuesta relativa con la concentración demostró que había unión entre los péptidos (H_{3n} , H_{3FANK} y H_{3FANV}) y el fragmento H_{1-2} anclado a la superficie del sensor.

Aunque las velocidades de asociación y disociación sean muy rápidas para ser medidas, la curva de concentración versus la repuesta en el equilibrio permite obtener la constante de afinidad (K_D) cuando se alcanza la saturación⁴². A pesar de utilizar un rango amplio de concentraciones (de mM a μ M), sólo en el sistema H_{1-2}/H_{3FANV} se logró llegar a la saturación (Figura 9). En el caso de las curvas para los sistemas H_{1-2}/H_{3n} y H_{1-2}/H_{3FANK} se observó que la variación de la respuesta incluso a 3 mM no se alcanzaba la saturación completa. Por encima de esta concentración no se obtenía una disolución homogénea y por esta razón no se realizaron medidas a mayor concentración.

Figura 8. Sensogramas obtenidos al inyectar diferentes concentraciones (0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 1.5 μ M) de H_{3FANV} (A) y H_{3a} (B) sobre una superficie funcionalizada con 154 RU de CxH_{1-2}

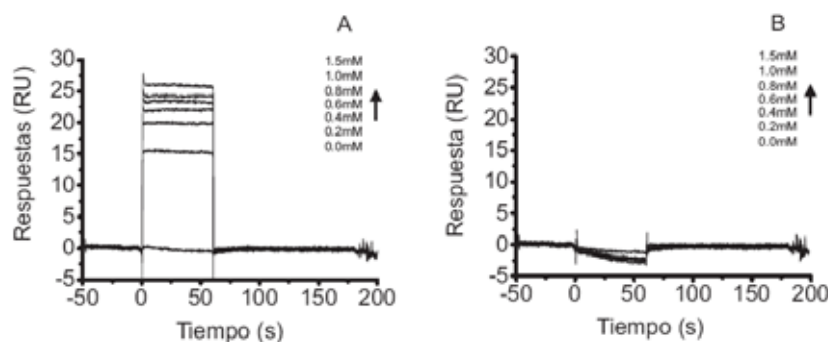


Tabla 5. Constantes de disociación, K_D , calculadas a partir de las curvas de saturación de los sistemas H_{1-2}/H_{3n} y análogos

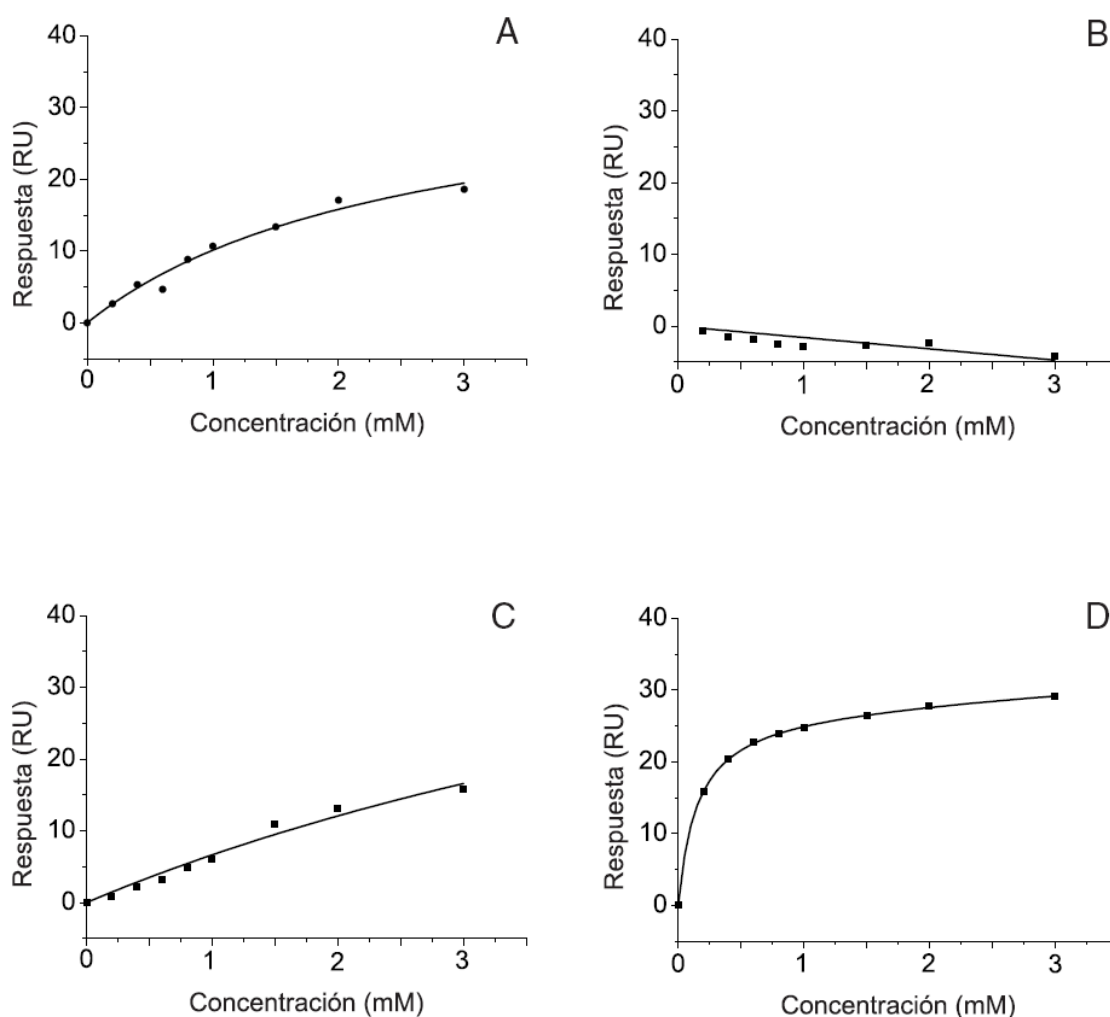
Sistema	K_D (M)	R^2
H_{1-2}/H_{3n}	2.41×10^{-3} ^a	0.977
H_{1-2}/H_{3FANK}	5.72×10^{-3} ^a	0.980
H_{1-2}/H_{3FANV}	1.96×10^{-4}	0.998

^a Se calcularon las K_D de los tres sistemas, pero sólo la correspondiente al sistema H_{1-2}/H_{3FANK} tiene significado cuantitativo.

Los datos se ajustaron de acuerdo al modelo de “la ley de acción de masas” en el equilibrio. En los sistemas H_{1-2}/H_{3n} y H_{1-2}/H_{3FANK} , las curvas no llegaron a la saturación, así que los valores de K_D obtenidos para estos sistemas se calcularon sólo para tener una idea cualitativa de su magnitud, la cual es mayor a 2.5 mM. La curva de saturación del sistema H_{1-2}/H_{3FANV} permitió calcular un valor más preciso de la constante K_D , 1.96×10^{-4} M (Tabla 5). Este valor es de al menos un orden de magnitud superior al del calculado aproximadamente para los complejos entre H_{3n} o H_{3FANK} y el fragmento H_{1-2} . Las modificaciones de carácter hidrofóbico en el péptido H_{3FANV} hacen que la interacción en complejo formado con H_{1-2} sea

de mayor afinidad. Este resultado se correlaciona con lo obtenido del análisis de los espectros de dicroísmo circular, en donde este complejo mostró el mayor incremento en la helicidad.

Figura 9. Curvas de RPS de la interacción entre el fragmento H₁₋₂ con H_{3n} y análogos. Curvas de unión entre H₁₋₂ y H_{3n} (A), H₁₋₂ y H_{3FANK} (C), H₁₋₂ y H_{3FANV} (D) y el control negativo de interacción con H_{3a} (B). El valor de la respuesta en el equilibrio (en RU) se encuentra representado frente a la concentración de péptido inyectado



3.4.2.2. Interacción de los complejos H₁₋₂/péptido con IgG

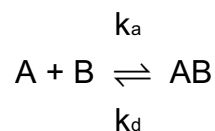
El hecho de que las curvas de unión de los péptidos, H_{3n}, H_{3FANK} y H_{3FANV}, a H₁₋₂ no llegaran a la saturación impidió verificar si esta interacción era específica. Por ello se decidió simular

sobre el sensor la interacción entre complejos de H₁₋₂/péptido con inmunoglobulina. Para comprobar si la interacción era selectiva se reprodujo sobre el sensor el ensayo que previamente se había usado para analizar la químioteca de análogos de H_{3n} estudiada anteriormente en nuestro laboratorio¹⁶, para ello se realizaron co-inyecciones de péptido con IgG de conejo a diferentes concentraciones (Figura 10).

La interacción de los complejos péptido/H₁₋₂ con IgG de conejo se estudió por RPS uniendo covalentemente el péptido CxH₁₋₂ a la superficie de un sensor CM5 por medio de un enlace disulfuro (Figura 10). Inicialmente se observó que la IgG era capaz de interactuar con el CxH₁₋₂ anclado al sensor, con una constante de afinidad de 2,70x10⁶ M⁻¹ (Figura 11). Según se observó anteriormente los péptidos (H_{3n}, H_{3FANK}, H_{3FANV}) interactuaban con H₁₋₂ siguiendo un cinética de asociación y disociación rápida, por lo cual no era posible seguir la cinética por RPS (3.4.2.1). Sin embargo, al coinyectar péptido (H_{3n}, H_{3FANK}, H_{3FANV}) con IgG la respuesta aumentaba respecto a la encontrada al inyectar sólo inmunoglobulina. Esto indicaba que había un cambio en la interacción de la IgG con CxH₁₋₂ cuando H_{3n} o sus análogos se encontraban en la disolución.

Para estudiar el efecto de la coinyección de péptido con IgG se hicieron varias inyecciones a diferentes concentraciones de IgG con una cantidad constante de péptido, en tampón HBS-EP pH 7.4 a 25 °C. La concentración de péptido usada fue de 2.5 uM, la cual se escogió porque no mostraba una respuesta detectable al interactuar con la superficie CxH₁₋₂ (Figura 8). En estas condiciones, la respuesta observada correspondería sólo al cambio de masa producido por la interacción con IgG. En cada sensograma se adquirieron los datos correspondientes a la asociación de IgG al complejo, la disociación de IgG en presencia de péptido y de la disociación de IgG en ausencia de péptido.

Los datos cinéticos se ajustaron de acuerdo al modelo de Langmuir de interacción 1:1 para calcular la constante de afinidad y las constantes cinéticas (Tabla 6). Este modelo describe la unión 1:1 entre el ligando y el analito, y es equivalente a la isoterma de Langmuir para adsorción en una superficie^{43,44}.

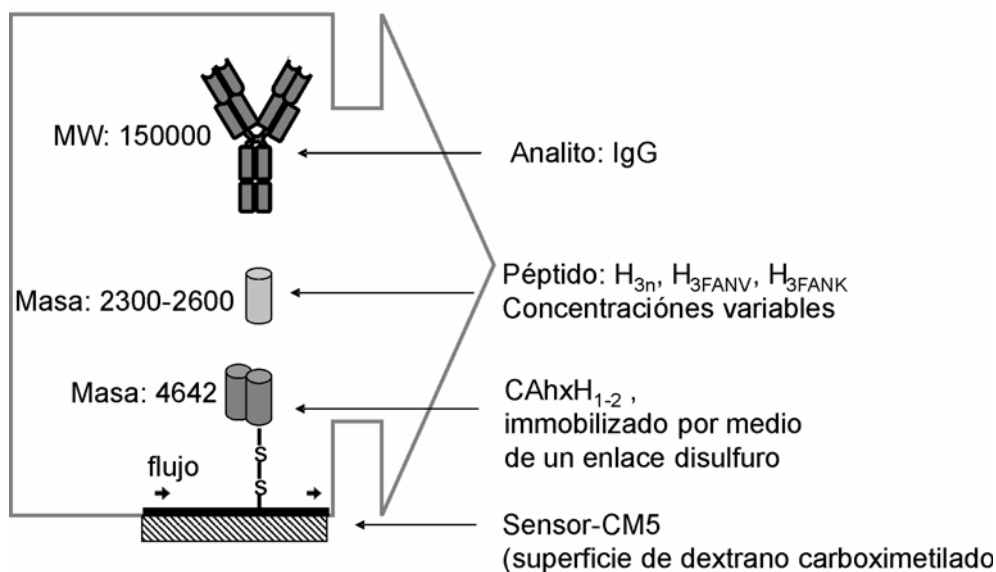


El grado de semejanza entre los datos experimentales y los datos obtenidos después del ajuste al modelo de de Langmuir se compararon mediante el valor estadístico χ^2 . En el caso de la interacción con CxH₁₋₂ los datos se ajustaron al modelo con un χ^2 de 1.78 mientras que los sistemas H₁₋₂/H_{3n} y H₁₋₂/H_{3FANK} se ajustaron con un χ^2 de 6.23 y 8.65. Estos valores están dentro del rango aceptable para aplicar este modelo, el cual debe ser inferior a 10. No

obstante, en el caso de la interacción de IgG con el sistema H_{1-2}/H_{3FANV} el χ^2 de este ajuste es de 26.8. Esta diferencia puede atribuirse a que en la interacción entre H_{1-2}/H_{3FANV} interviene un cambio conformacional mayor al producido en los otros dos complejos.

Las interacciones no específicas debido a efectos del sensor en si mismo, tales como transporte de masa o impedimentos estéricos, pueden afectar la respuesta obtenida y aumentar la complejidad de la interacción. No obstante, la influencia de estos parámetros se consideró y eliminó en el diseño experimental. Los efectos estéricos sobre la superficie se redujeron al usar un grado bajo de inmovilización de CxH_{1-2} . Efectos producidos por transporte de masas no fueron observados al aumentar el flujo. Por ultimo, el ligando se unió a la superficie por medio de un enlace disulfuro para evitar heterogeneidad en la superficie por diferentes orientaciones del ligando^{45,46}.

Figura 10. Descripción esquemática del experimento de unión de IgG a los complejos entre péptido y CxH_{1-2} inmovilizado sobre un sensor.



Los resultados obtenidos de la interacción entre los complejos no covalentes H_{1-2}/H_{3x} con IgG permiten divisar un cambio conformacional adicional sobre la superficie. Este comportamiento está relacionado con la información previamente obtenida por dicroísmo circular, en donde se observó que las mezclas equimolares H_{1-2} /péptido mostraban mayor helicidad que los péptidos individuales. No es evidente que un cambio conformacional, al no estar asociado a un cambio de masa, produzca a su vez un cambio en la respuesta de RPS. Sin embargo, el efecto de un cambio conformacional puede observarse indirectamente, la formación de especies secundarias pueden alterar el equilibrio entre el complejo y el analito libre. Esta variación puede cambiar la cantidad de masa sobre la superficie y por lo tanto la

respuesta obtenida⁴².

Figura 11. Curvas de RPS de la interacción entre IgG y los complejos péptido/H₁₋₂. Los sensoграмas mostrados corresponden a las cinética de asociación y disociación de IgG con H₁₋₂ (A), H₁₋₂/H_{3n} (B), H₁₋₂/ H_{3FANK} (C), H₁₋₂/H_{3FANV} (D)

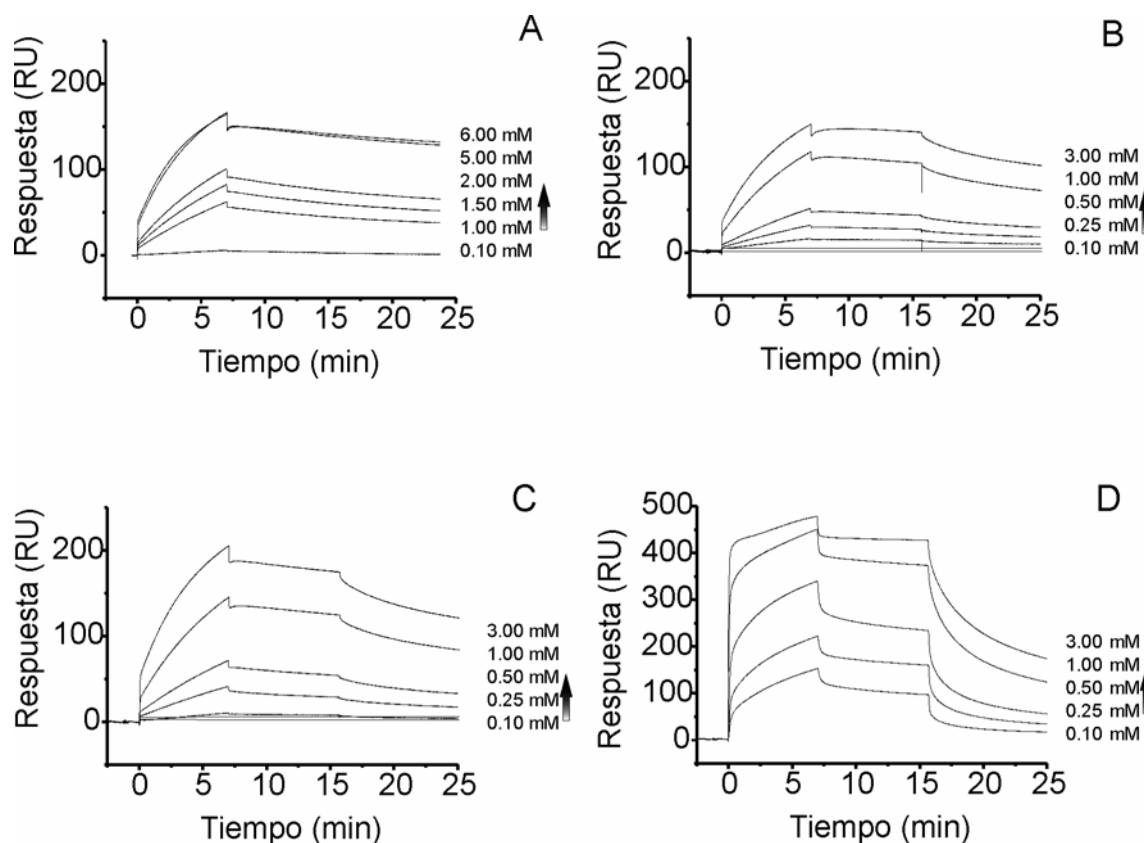


Tabla 6. Constantes de afinidad y cinéticas de la unión de IgG^b a H₁₋₂ y complejos no covalentes con H_{3n}, H_{3FANK} Y H_{3FANV}. Las constantes se determinaron usando un modelo de unión 1:1

Complejos	k_{as}^* (1/Ms)	k_{dis}^* (1/s)	K_A^* (1/M)	K_D^* (M)	χ^2
H ₁₋₂	1.13×10^3	4.19×10^{-4}	2.70×10^6	3.70×10^{-7}	1.78
H _{3n} /H ₁₋₂	2.16×10^3	5.24×10^{-4}	4.12×10^6	2.43×10^{-7}	6.23
H _{3FANK} /H ₁₋₂	1.80×10^3	5.49×10^{-4}	3.29×10^6	3.04×10^{-7}	8.65
H _{3FANV} /H ₁₋₂	8.30×10^4	2.21×10^{-3}	4.39×10^7	2.81×10^{-8}	26.8

En resumen, la adición de los péptidos (H_{3n}, H_{3FANV} y H_{3FANK}) a la disolución de IgG aumentó la afinidad de CxH₁₋₂ por la IgG y este efecto es considerablemente mayor en caso de la

^b k_{as}^* , k_{dis}^* , K_A^* y K_D^* deben ser consideradas como constantes aparentes debido a que se usó como analito la IgG de conejo y no sólo el fragmento Fc.

adición de H_{3FANV}. El complejo formado por H₁₋₂/H_{3FANV} tiene una K_A de al menos un orden de magnitud superior a la de los otros dos complejos. Este aumento en la afinidad está relacionado con el aumento de la velocidad de asociación con la IgG, lo cual está reflejado en un aumento de la constante de asociación, k_{as}, en casi dos órdenes de magnitud. Curiosamente también se observó un aumento en la k_{dis}, lo que está relacionado con una disociación más rápida. Aunque la velocidad de disociación sea mayor, la velocidad de asociación hace que K_A de IgG por el sistema H₁₋₂/H_{3FANV} sea de igual magnitud o incluso mayor que las constantes obtenidas con sólo H₁₋₂ o el sistema H₁₋₂/H_{3n}.

La constante de disociación, k_{dis2}, del complejo al dejar de inyectar tanto IgG como péptido se calculó considerando que la disminución de la respuesta seguía un decaimiento exponencial (Tabla 7). Durante la fase de disociación la variación de la respuesta (R) en el tiempo (t) depende de la constante cinética de disociación,

$$\frac{dR}{dt} = -k_{dis2}R$$

Integrando esta ecuación se obtiene la siguiente expresión:

$$R = R_0 e^{-k_{dis2}t} + c$$

Donde R₀ es una constante que corresponde a la respuesta al inicio de la disociación y c una constante con la respuesta a tiempo infinito.

Tabla 7. Constantes de disociación de IgG de CxH₁₋₂ en ausencia de péptido, k_{dis2}, considerando que la respuesta tiene un decaimiento exponencial

Sistema	k _{dis2} (1/s)	χ ²
H _{3n} /H ₁₋₂	2.92X10-3	0.101
H _{3FANK} /H ₁₋₂	3.08X10-3	0.157
H _{3FANV} /H ₁₋₂	5.78X10-3	7.93

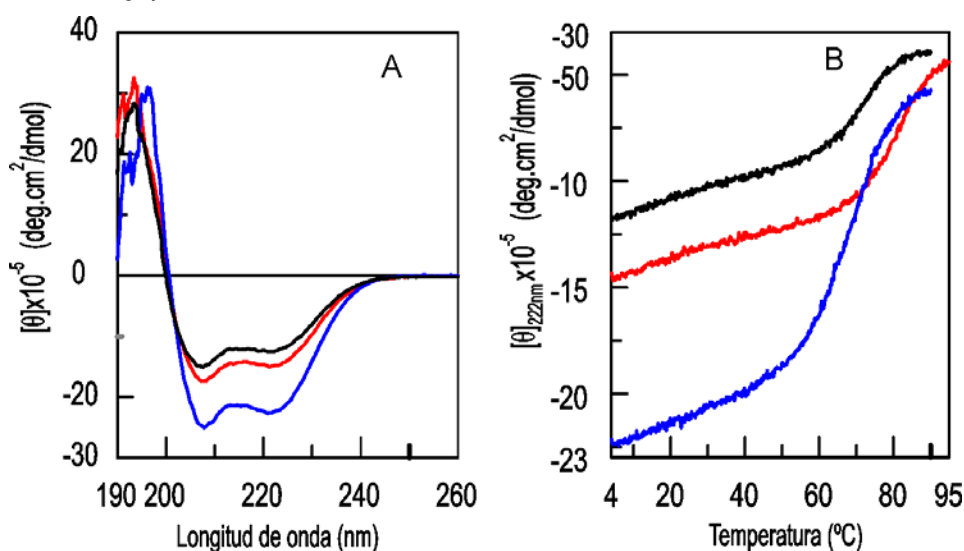
En general, se observó que estas constantes de disociación eran mayores que las halladas para la disociación de IgG de la superficie con el péptido CxH₁₋₂ inmovilizado. La disociación de IgG en estas condiciones es similar para los tres complejos y sólo ligeramente mayor para el sistema con H_{3FANV}. La disminución de respuesta al eliminar el péptido ratifica que la formación del complejo entre H₁₋₂ y el péptido H_{3n} o análogos afecta la unión con la IgG.

3.5. Dominios natural y análogos

3.5.1. Análisis conformacional por dicroísmo circular

Según los resultados obtenidos del estudio por dicroísmo circular y de resonancia de plasmon superficial, los análogos H_{3FANK} y H_{3FANV} forman complejos no covalentes con H_{1-2} que inducen un cambio conformacional general en el complejo que se refleja en un aumento de la helicidad del sistema. Esto motivó el análisis de los efectos de estas análogos en la estructura y actividad de los dominios completos, el dominio B natural, el dominio con las mutaciones Ser44Phe Leu47Lys (dominio FANK) y el dominio con las mutaciones Ser44Phe Leu47Val (dominio FANV).

Figura 12. A. Espectros de dicroísmo circular de el dominio B nativo (negro), dominio FANK (azul) y el dominio FANV (rojo). Los espectros se obtuvieron de las disoluciones a 40 μ M de los péptidos en tampón fosfato 10 mM , NaCl 100 mM a pH 7.4 a 4°C B. Curvas de estabilidad térmica, variación de la elipticidad a 222 nm con la temperatura de los dominio B nativo (Tm: 72.2°C, curva en negro), dominio FANK (Tm: 70.2 °C, curva en azul) y el dominio FANV (Tm: 81.1 °C, curva en rojo)



Los espectros de dicroísmo circular de los análogos y el dominio natural se obtuvieron en condiciones iguales a las usadas en los complejos no covalentes (40 μ M de proteína en tampón fosfato 10mM con NaCl 100 mM a pH 7.4 a 4 °C). Los espectros mostraron las bandas características de estructura de hélice α con una banda positiva a 190 nm y dos bandas negativas a 208 y 222 nm (Figura 12). Lo que reveló que los análogos eran capaces

de plegarse generando una estructura estable similar a la del dominio natural. Además, se observó un aumento de la helicidad de los dominios análogos respecto al natural. Aunque el dominio FANV era sólo ligeramente más helical, el dominio FANK mostró un aumento notable en la intensidad de los dos mínimos a 208 y 222 nm (Tabla 8).

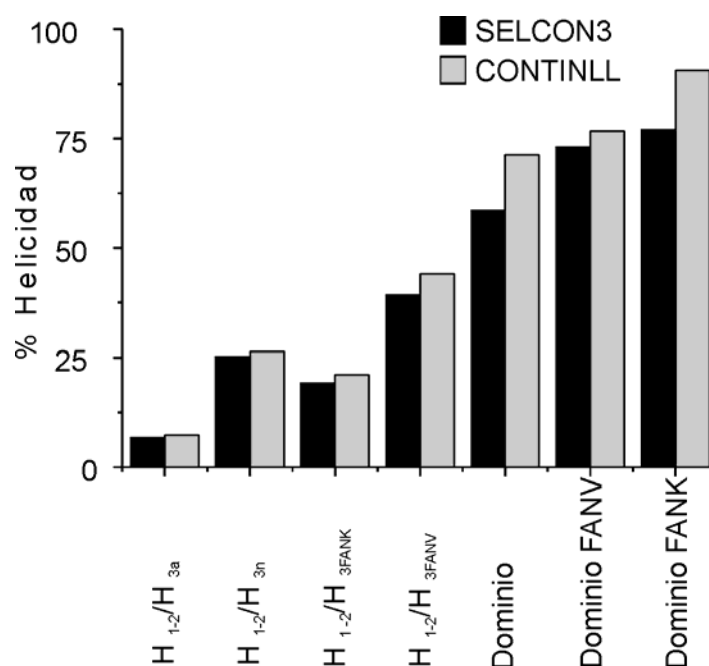
Tabla 8. Estimación de estructura secundaria de los complejos y los dominios a partir de los espectros de dicroísmo circular. El cálculo se realizó utilizando los algoritmos CONTILL y SELCON3

Muestra	Programa	% Hélice α	% Hoja β	% Giro β	% Desordenada
H ₁₋₂ /H _{3a}	SELCON3	6.7	12.7	8.9	70.6
H ₁₋₂ /H _{3a}	CONTINLL	7.3	9.7	8.5	74.5
H ₁₋₂ /H _{3n}	SELCON3	25.2	13.4	15.7	45.1
H ₁₋₂ /H _{3n}	CONTINLL	26.3	10.3	15.3	48.2
H ₁₋₂ /H _{3FANK}	SELCON3	19.2	15.9	13.9	51.4
H ₁₋₂ /H _{3FANK}	CONTINLL	21.1	7.3	11.9	59.8
H ₁₋₂ /H _{3FANV}	SELCON3	39.2	8.5	23.4	27.6
H ₁₋₂ /H _{3FANV}	CONTINLL	44	6.7	22.5	27
Dominio B	SELCON3	58.6	3.2	17.4	23.3
Dominio B	CONTINLL	71.2	6.4	19.9	2.4
Dominio FANK	SELCON3	77	-1.5	11.4	14.7
Dominio FANK	CONTINLL	90.6	0.2	8.5	0.7
Dominio FANV	SELCON3	73	-1.1	12	18.7
Dominio FANV	CONTINLL	76.7	3.4	13.5	6.4

La estimación de la estructura secundaria de los dominios se realizó a partir de los datos de dicroísmo circular usando los métodos CONTINLL y SELCON del programa CDPro⁴⁷. Los datos del espectro de dicroísmo circular se ajustaron usando una base de espectros de 48 proteínas de estructuras conocidas³⁴. Los dos algoritmos proporcionaron una estimación de estructura secundaria similar entre si. En general, se observó que la estructura de hélice α predominaba sobre los otros elementos estructurales. Al comparar la helicidad de los complejos con la de los dominios se encontró que la unión covalente entre la H₂ y H₃ estabilizó la estructura tridimensional lo que se ve reflejado en el aumento de la helicidad (Figura 13). Los dominios análogos presentan mayor porcentaje de helicidad que el dominio natural. Aunque esta diferencia es más significativa en el caso del dominio FANK. Sin embargo, en el caso de los complejos no covalentes el complejo H₁₋₂/H_{3FANV} posee mayor contribución de estructura de hélice α que el complejo nativo y el análogo H₁₋₂/H_{3FANK}. Esta diferencia entre los complejos no covalentes y los dominios esta asociada en gran parte con el residuo de lisina modificado en la posición 44 del dominio FANK. En el complejo H₁₋

$_2/H_{3FANK}$ los dos fragmentos pépticos se encuentran libres en disolución, por lo que la cadena lateral de la lisina 47 puede estar interaccionando tanto con el sistema peptídico como con el disolvente. Aunque, la cadena de metilenos de la lisina favorece las interacciones hidrofóbicas entre los dos péptidos, el grupo amino protonado de la cadena lateral esta interaccionando competitivamente con el medio acuoso y el péptido. Si bien se observó un aumento en la helicidad del complejo entre H_{1-2}/H_{3FANK} , este era inferior al del complejo H_{1-2}/H_{3n} . Por otra parte, en el dominio mutante FANK las H_2 y H_3 están unidas covalentemente, esta restricción aumenta la probabilidad de que la cadena lateral residuo de Lys47 participe en las interacciones con H_{1-2} que favorecen la organización de la estructura del dominio⁴⁸.

Figura 13. Estimación del porcentaje de hélicidad de los dominios y complejos de acuerdo al ajuste realizado mediante los algoritmos CONTINLL y SELCON3



Las curvas de estabilidad térmica de los dominios se obtuvieron a partir de la variación de la elipticidad a 222 nm con la temperatura (Figura 12B). Al contrario de los dominios no covalentes, las curvas de fusión mostraron que los dominios se despliegan en un proceso que tiene dos estados separados por una rápida transición, lo que produce un gráfico de forma sigmoidea. Esto indicaba que la desnaturalización térmica de los dominios era un proceso cooperativo. Al calcular el punto medio para hallar la temperatura de fusión se encontró que dominio FANK tiene una temperatura de fusión similar la nativo mientras que el dominio FANV tiene una fusión a temperatura más alta. Un grado mayor de estructuración no siempre esta asociado a una mayor estabilidad térmica⁴⁹. En este caso, la energía

necesaria para romper las interacciones en el núcleo hidrofóbico es diferente si la mutación introducida es un residuo hidrofóbico, que excluya el agua, o un residuo polar, que pueda establecer enlaces de hidrógeno. También es importante tener en cuenta el tamaño de los residuos y la flexibilidad del sitio de interacción⁵⁰, la mutación Ser44Phe involucra un cambio importante en el tamaño de la cadena lateral y sin embargo no se pierde la estructura compacta del dominio. Por otra parte, las mutaciones en el residuo Leu47 ejercen influencias ligeramente diferentes en la estructura del dominio, si bien la mutación Leu47Lys participa en la formación de una estructura bien plegada altamente helicoidal, la mutación Leu47Val le confiere estabilidad térmica al dominio.

3.5.2. Resonancia de plasmon superficial

3.5.2.1. Unión de IgG al dominio B y análogos

La unión de los dominios a IgG se estudió de dos maneras. En un primer acercamiento, se analizó la unión entre IgG de conejo y los dominios inmovilizados sobre el sensor, con el fin de verificar si eran reconocidos y comparar cualitativamente la actividad entre ellos (Figura 14). Como segunda estrategia se estudió la unión entre Fc humano inmovilizado sobre el sensor con los diferentes dominios, en este caso se quería comparar la interacción de los tres dominios con el sitio específico de reconocimiento con la inmunoglobulina. Este último estudio será discutido en el próximo apartado.

Previamente se verificó que tanto H₁₋₂ como los complejos de H₁₋₂ y H₃ o análogos son capaces de interactuar con IgG de conejo e incluso aumentar la respuesta respecto al reconocimiento de H₁₋₂. En este experimento se analizó el efecto de las mutaciones en la interacción entre los dominios análogos y la IgG. Cada uno de los dominios se inmovilizó sobre un sensor CM5 por medio de un enlace amida (Figura 15, 6.8.6.4). Uno de los cuatro canales del sensor se dejó como referencia control, para sustraer las interacciones inespecíficas de la respuesta total. Puesto que en este caso la masa del analito en solución es bastante superior (150 kDa / 6.9 kDa) a la del ligando inmovilizado el cambio de masa era suficientemente grande para ser detectado.

Las cinéticas de asociación y disociación se obtuvieron al inyectar disoluciones de IgG en un rango amplio de concentraciones (10, 50, 100, 200 y 300 nM), en tampón HBS-EP pH 7.4 a 25 °C. Los datos se ajustaron a un modelo de interacción 1:1 usando el modelo de Langmuir. Las constantes de velocidad de asociación y disociación calculadas para la

interacción entre el dominio B y IgG estaban de acuerdo con los referenciado anteriormente en la literatura^{13,51}. La observación de los diferentes sensogramas mostró cualitativamente que la disociación de IgG de los dominios análogos era mayor que la del dominio B (Figura 16).

Figura 14. Descripción esquemática del experimento de unión de IgG al dominio B o análogos inmovilizados sobre un sensor CM5

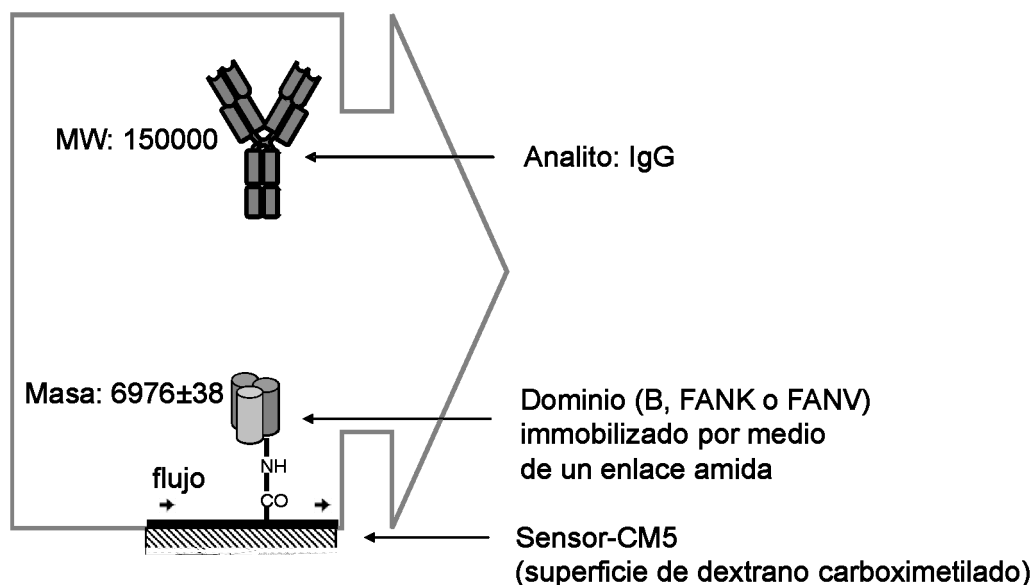


Figura 15. Secuencia de reacciones realizadas para la funcionalización de ligandos mediante acoplamiento para la formación de enlaces amida

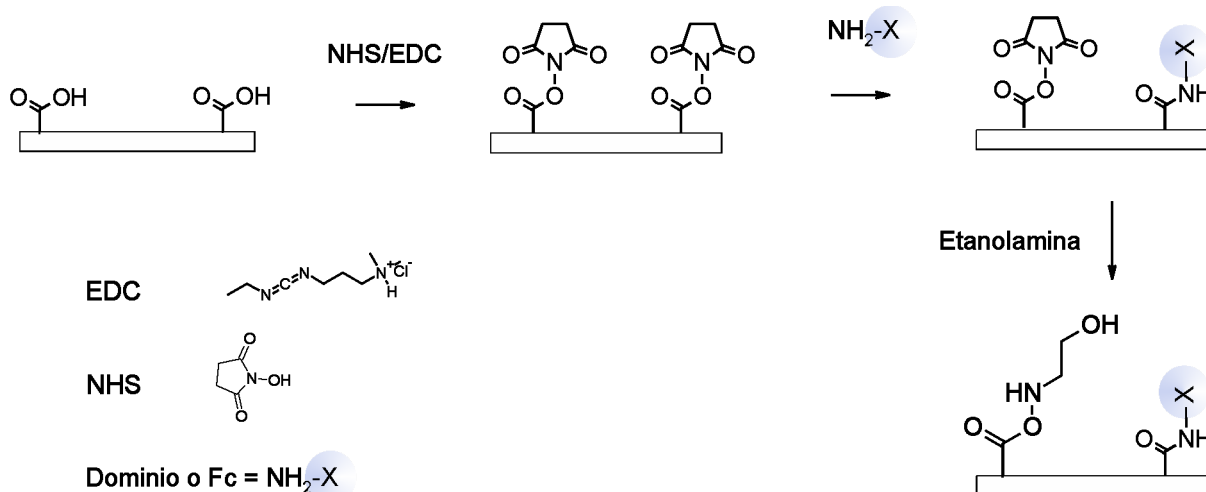
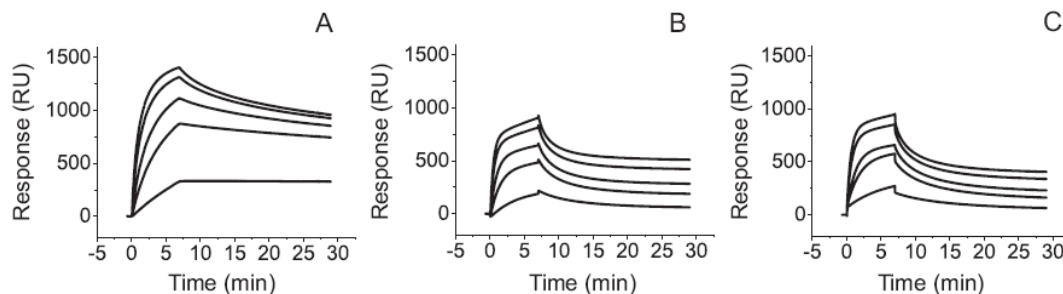


Figura 16. Sensogramas de las cinéticas de unión de IgG al dominio B y análogos al inyectar disoluciones de IgG en un rango amplio de concentraciones (10, 50, 100, 200 y 300 nM). A. Unión de IgG al dominio B. B. Unión de IgG al dominio FANK. C. Unión de IgG al dominio FANV



Las constantes obtenidas mostraron que efectivamente la constante cinética de disociación de los análogos era cerca de tres veces mayor que la del dominio natural la cual es de 1.37×10^{-3} 1/s. Entre tanto, la constante cinética de asociación de los análogos era mayor que la obtenida para el dominio B (Tabla 9). Sin embargo, las diferencias cinéticas no se reflejaban en grandes cambios en la constante en el equilibrio K_D , la cual es similar en orden de magnitud para los tres dominios. Comparando las K_D de los tres dominios se observa que de mayor a menor sigue esta secuencia dominio B \leq dominio FANK < dominio FANV.

Tabla 9. Constantes de afinidad y cinéticas de la unión de IgG con el dominio B, dominio FANK y dominio FANV. Las constantes se determinaron usando un modelo de unión 1:1

	k_{as} (1/Ms)	k_{dis} (1/s)	K_A (1/M)	K_D (M)	χ^2
Dominio B	5.40×10^4	1.37×10^{-3}	3.93×10^7	2.55×10^{-8}	25,9
Dominio FANK	1.31×10^5	3.42×10^{-3}	3.84×10^7	2.61×10^{-8}	12,6
Dominio FANV	8.96×10^4	2.90×10^{-3}	3.09×10^7	3.24×10^{-8}	19,6

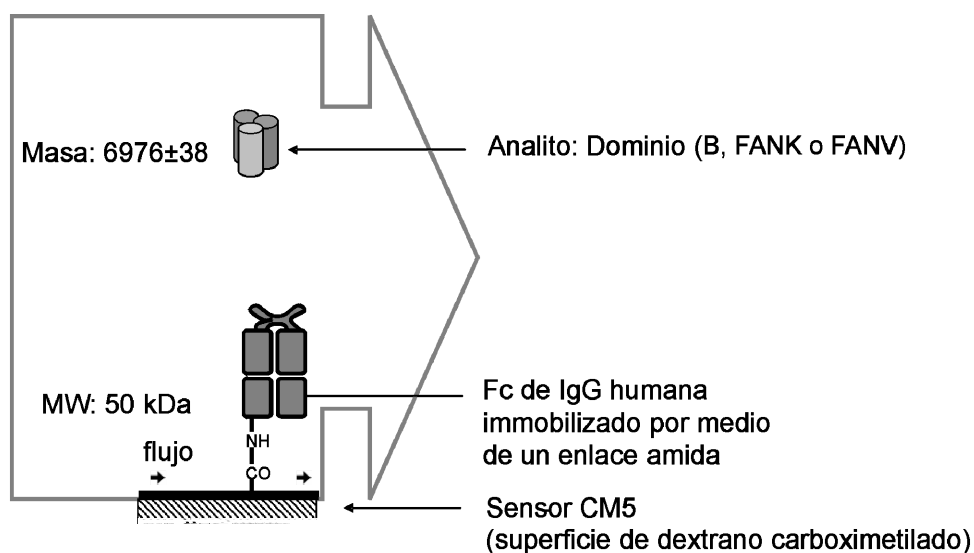
En la interacción del dominio B con el Fc sólo intervienen las H_1 y H_2 de acuerdo a los datos estructurales previamente conocidos del complejo¹⁰. Aunque los análogos están localizados en la región de H_3 , estas influyen indirectamente sobre la interacción con IgG al estar localizadas en el núcleo hidrofóbico del dominio. Los dominios análogos tienen una afinidad por IgG de un orden de magnitud mayor que el fragmento H_{1-2} , pero sólo ligeramente inferior a la del dominio natural. No obstante, se encontró que los dominios análogos se asocian más rápidamente, al tiempo que se disocian con mayor velocidad de la IgG que el dominio B. Según esto las análogos Ser44 y Leu 47 alteran la interacción con IgG a pesar de no estar directamente involucradas en la unión. Esto muestra que los residuos involucrados en las interacciones del núcleo hidrofóbico también modulan a larga distancia las interacciones de los residuos de la interfase de interacción con IgG (Figura 1).

Al comparar la unión entre los dominios y la IgG con la interacción entre los complejos no covalentes y IgG se observaron considerables diferencias. Mientras la afinidad de los complejos no covalentes H_{1-2}/H_{3n} y H_{1-2}/H_{3FANK} es inferior a la de los dominios, la afinidad con el complejo H_{1-2}/H_{3FANV} es de magnitud similar a la del dominio B natural. Esto parece estar relacionado con mayor helicidad es este complejo (Figura 6), lo cual influye positivamente en la interacción con IgG. Sin embargo, la adición de estas secuencias a la región C-terminal del fragmento H_{1-2} , en los dominios completos, restringe la libertad conformacional de los residuos involucrados en la interacción. La cercanía espacial de las hélices hace que las posibilidades conformacionales de la interacción con la región que comprende H_{1-2} sean diferentes con respecto a las que puedan existir en el complejo no covalente.

3.5.2.2. Unión de Fc humano al dominio B y análogos

La primera función conocida del dominio B de la proteína del A de *Staphylococcus aureus* fue la interacción de alta afinidad con el Fc de IgG⁵². Con el fin de verificar los resultados anteriores se decidió analizar la unión de los dominios con Fc, para esto se unió covalentemente Fc humano a un sensor CM5 (Figura 17).

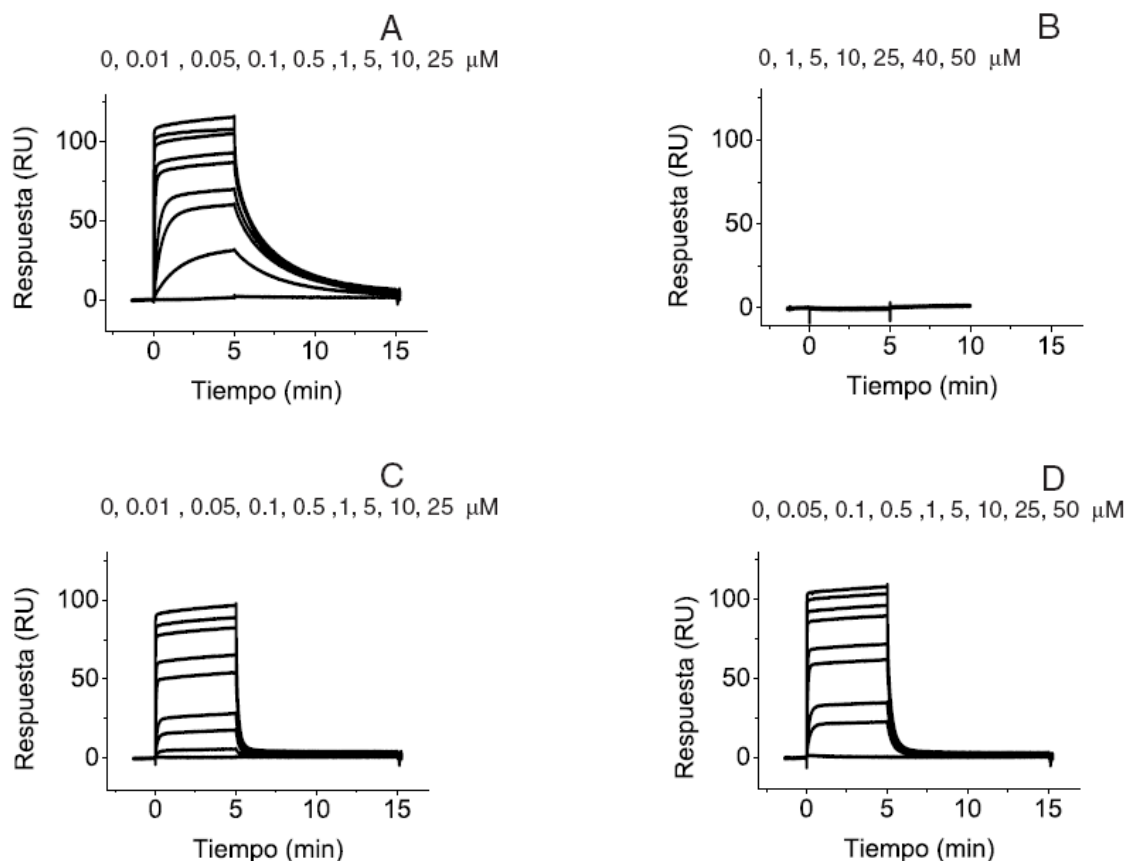
Figura 17. Descripción esquemática del experimento de unión los dominio B o análogos al fragmento cristalizante de IgG humano inmovilizado sobre un sensor CM5



La interacción de Fc con el dominio B es altamente dependiente de la conformación³⁶. El aumento de la helicidad del sistema específicamente en las regiones H_1 y H_2 esta directamente relacionado con la afinidad entre el Fc y el dominio B. Esto se ha confirmado

previamente en esta tesis, así como también en trabajos anteriores de nuestro laboratorio¹⁴⁻¹⁶. Por esta razón se prefirió analizar esta interacción usando como analitos el dominio B o sus análogos en disolución e inmovilizar Fc humano sobre la superficie del sensor.

Figura 18. Sensogramas de las cinéticas de unión de Fc humano a dominio B (A), péptido H₁₋₂ (B), dominio FANK (C) y domino FANV (D)



Los sensogramas de la interacción de Fc con el dominio B, sus análogos y H₁₋₂ se obtuvieron a diferentes diluciones en un rango de concentraciones entre 0.01 μM a 25 μM , en tampón HBS-EP pH 7.4 a 25 $^{\circ}\text{C}$. Tanto el dominio B como los análogos presentaron sensogramas con una fase de asociación y una de disociación que variaba con la concentración (Figura 18). Por otro lado, observó que la respuesta permaneció invariante al inyectar H₁₋₂ a diferentes concentraciones. Sorprendentemente, como ya se indicó en el apartado anterior se detectó interacción con IgG cuando H₁₋₂ se encontraba unido a la superficie. Teniendo en cuenta que los sistemas analizados son diferentes, puesto que en este caso sólo se evaluó la interacción con Fc humano, H₁₋₂ podría tener una estructura diferente si esta en disolución o inmovilizado sobre el sensor, lo que influiría sobre la respuesta obtenida.

Las constantes cinéticas y en el equilibrio se calcularon usando el modelo de Langmuir considerando una unión 1:1. La disociación de los dominios análogos es más rápida que la del dominio natural, este resultado era similar a lo observado con la interacción con IgG de conejo. En este caso, la constante cinética de disociación es 5 o 7 veces mayor que la del dominio natural (Tabla 10). Por otro lado, la constante de asociación de los análogos es menor que la obtenida para el dominio B natural, las diferencias en la velocidad de formación y disociación del complejo con Fc hacen que la K_D de los análogos sea inferior a la del dominio B.

Los dos experimentos de unión de los dominios a IgG mostraron que la afinidad se ve afectada por las mutaciones realizadas en los análogos. Este hecho se manifestó también en la disminución de la constante de asociación y el aumento de la constante de disociación entre los dominios análogos y Fc. Esto repercutió en una leve disminución de la afinidad de los dominios mutados con IgG de conejo, que es más pronunciada en el caso de la interacción con Fc Humana, con respecto a la afinidad por el dominio natural.

Tabla 10. Constantes de afinidad y cinéticas de la unión de Fc humano con el dominio B, dominio FANK y dominio FANV. Las constantes se calcularon empleando un modelo de unión 1:1

	k_{as} (1/Ms)	k_{dis} (1/s)	K_D (M)	K_A (1/M)	χ^2 (RU ²)
Dominio B	6.65×10^5	1.09×10^{-2}	1.64×10^{-8}	6.09×10^7	3.35
Dominio FANV	3.09×10^5	5.01×10^{-2}	1.62×10^{-7}	6.17×10^6	4.07
Dominio FANK	3.70×10^5	7.90×10^{-2}	2.14×10^{-7}	4.68×10^6	4.04

3.6. Determinación de la estructura secundaria de los dominios por resonancia magnética nuclear

Hasta este punto la estructura de los dominios se ha estudiado globalmente por medio de espectrofotopolarimetría de dicroísmo circular. Esto ha permitido observar las diferencias en estructura secundaria entre los tres dominios. Para obtener información estructural detallada de cada uno de los residuos decidimos analizar los tres dominios por RMN

La RMN junto a la difracción de rayos X son los métodos que permiten la determinación estructural de biomoléculas con resolución a nivel atómico. La característica particular de la RMN es que en general las medidas son realizadas en disolución, esto permite reproducir el medio acuoso en el que se encuentra de la biomolécula. Esta técnica además de la

información acerca de la composición de aminoácidos y de cómo los residuos están organizados en la secuencia, permite determinar la estructura o las tendencias conformacionales de la biomolécula⁵³. Los espectros de ^1H RMN monodimensionales de péptidos y proteínas dan información acerca del desplazamiento químico y el acoplamiento spin-spin de la estructura fina de las resonancias en el espectro. Sin embargo, la cantidad de señales encontradas y el solapamiento, el cual aumenta con el número de residuos, hace extremadamente difícil la asignación de los desplazamientos químicos de cada uno de los átomos constituyentes. La aplicación de técnicas de espectroscopia bi- o multidimensionales dimensional hace posible distribuir esta información en uno o más planos, lo que permite separar y extraer información adicional, como conectividades escalares entre átomos unidos por enlaces químicos o cercanos en el espacio⁵⁴.

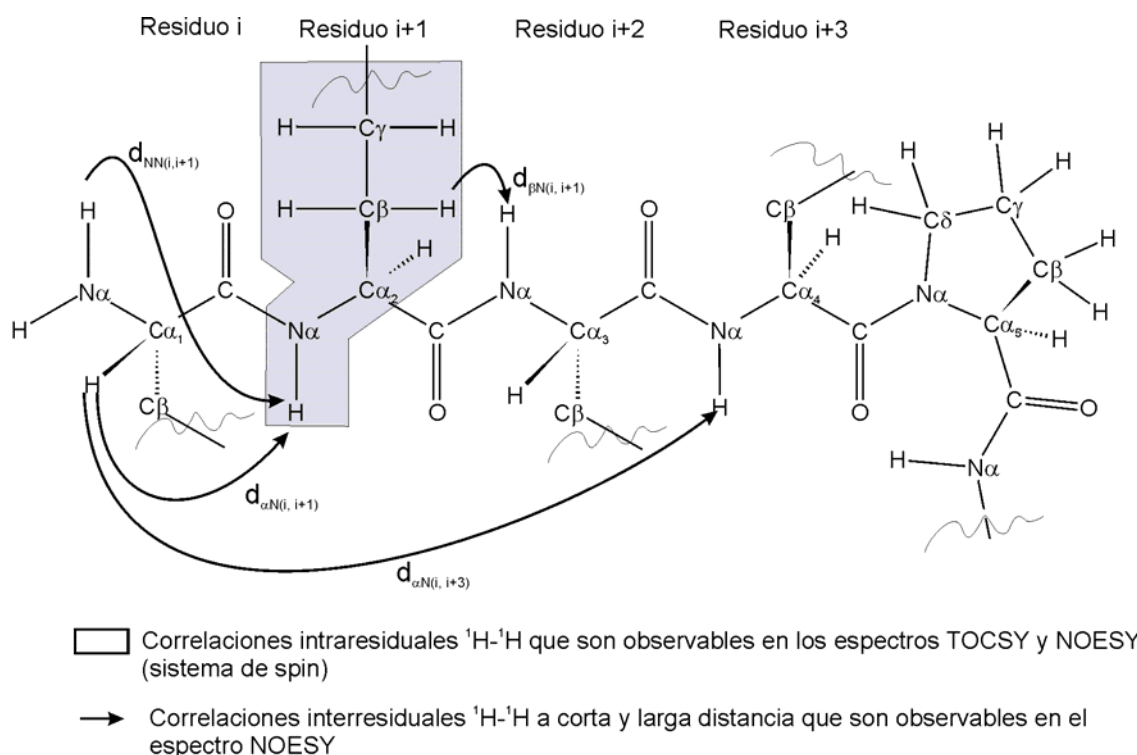
La asignación de los desplazamientos químicos de los protones presentes en péptidos y proteínas de tamaño pequeño (<15 KDa) puede ser obtenida a partir de experimentos bidimensionales de correlación homonuclear ^1H - ^1H . Los experimentos TOCSY y NOESY permiten extraer este tipo de información. En el experimento TOCSY (espectroscopia de correlación total) se obtienen señales de correlación entre todos los protones que están asociados en una secuencia de transferencia mediante la existencia de un acoplamiento escalar protón-protón. Cada residuo tiene un patrón de acoplamientos protón-protón característico que se denomina sistema de spin^{55,56}. En el experimento bidimensional NOESY (Espectroscopia de efecto nuclear Overhauser) cada señal fuera de la diagonal establece una correlación entre dos protones, no necesariamente acoplados escalaramente, que están separados en el espacio por una distancia inferior a 5\AA ⁵⁴.

El procedimiento que permite conseguir la asignación secuencial de los residuos de un péptido o proteína, inicialmente propuesto por Wüthrich y colaboradores⁵⁴ esta basado en la información obtenida de las correlaciones secuenciales en espectro NOESY. La estrategia de asignación se basa en dos tipos de información que se obtiene paralelamente al analizar los espectros TOCSY y NOESY⁵⁷. Por un lado, las correlaciones entre los protones de cada residuo, o sistema de spin, son identificadas en el espectro TOCSY. Paralelamente, la asignación secuencial de cada sistema se obtiene por observación de las correlaciones espaciales entre protones de residuos consecutivos, suministradas por los NOEs (Figura 19). A partir de las señales encontradas en el espectro NOESY se pueden definir las siguientes correlaciones espaciales o distancias: las distancias secuenciales, las distancias de rango medio y las distancias de gran rango. Las distancias secuenciales existen entre protones de residuos consecutivos ($d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$, $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ y $d_{\beta\text{N}}(i, i+1)$). Las distancias de rango medio existen entre protones de residuos no secuenciales en un segmento de no más

de cinco residuos consecutivos. Y las interacciones gran rango existen entre protones de residuos separados como mínimo por seis residuos. El proceso de asignación comienza por residuos que tienen sistemas de espines distintivos y que tengan la posibilidad de estar unidos secuencialmente.

Con el fin de estudiar las consecuencias estructurales de las mutaciones se obtuvieron los correspondientes experimentos TOCSY y NOESY del dominio B y sus análogos. La asignación, el análisis conformacional, las conectividades a corta y a larga distancia se llevaron a cabo a partir del análisis de los desplazamientos químicos y los NOEs de correlación.

Figura 19. Segmento de péptido mostrando las correlaciones observables en un espectro TOCSY o sistema de spin (líneas) y las correlaciones a corta y larga distancia observables en un espectro NOESY (flechas)

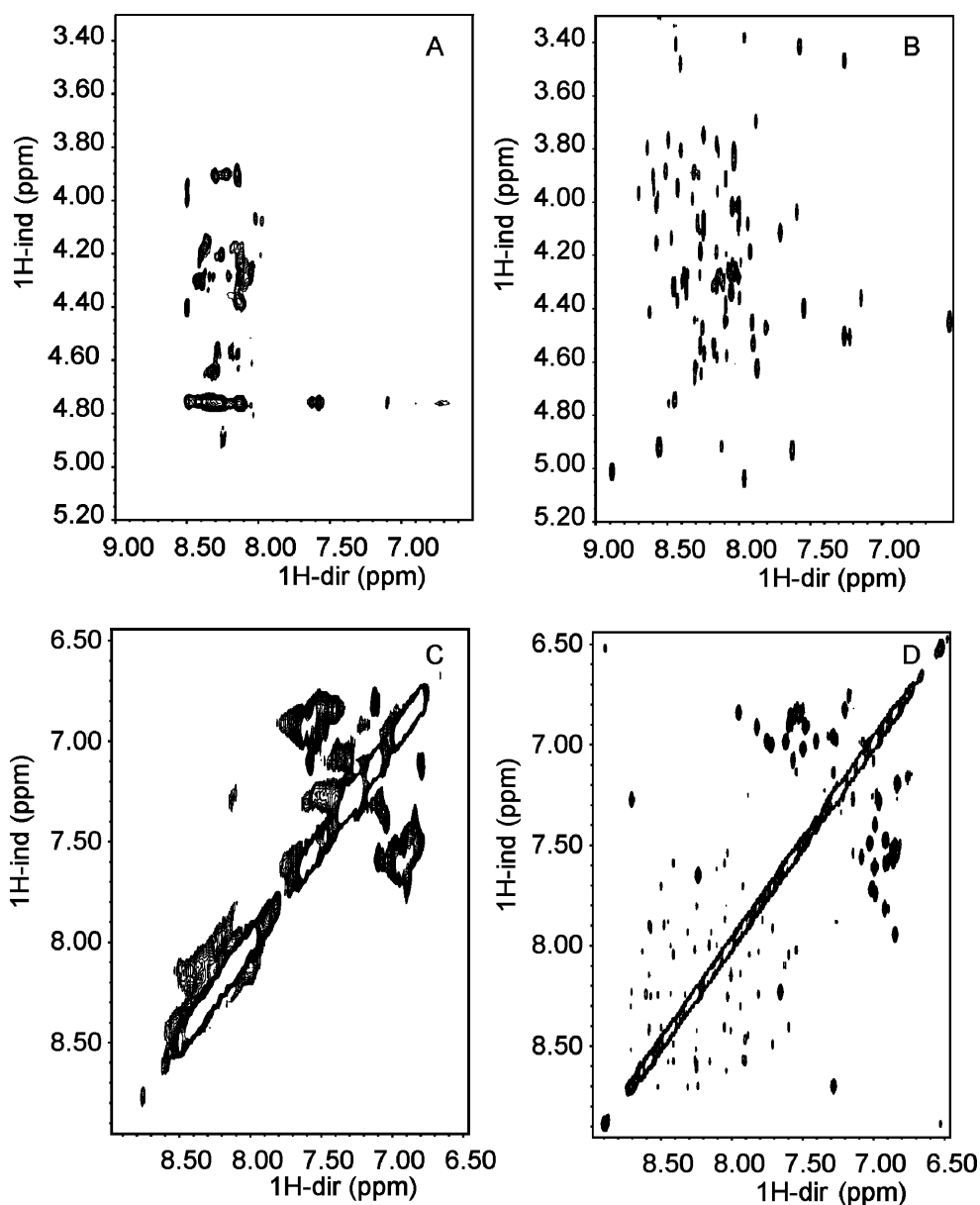


3.6.1. Estudio por RMN del dominio B

Los espectros TOCSY y NOESY del dominio B, en forma covalente y no covalente, se obtuvieron a partir de una disolución de proteína 1 mM en tampón de fosfato a pH 5.8 (ver 6.8.5.). Los espectros bidimensionales mostraron características que establecen que la

proteína esta bien plegada. En primer lugar se observó una buena dispersión de desplazamientos químicos en el espectro TOCSY en la región H^N-H^α . En segundo lugar, en el espectro NOESY mostró una gran cantidad de señales de correlación, especialmente en la región de protones amida H^N-H^N (Figura 20).

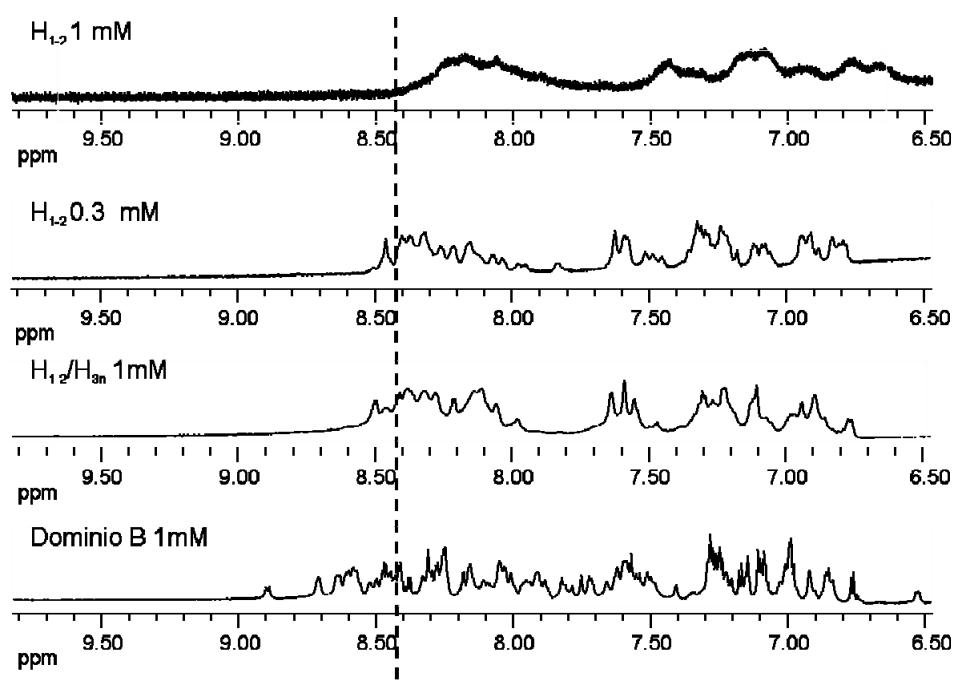
Figura 20. Espectros de RMN del complejo no covalente y el dominio B nativo en tampón fosfatos 10 mM y 10% D_2O a pH 5.8 a 30 °C. A. Espectro TOCSY de la mezcla equimolar H_{1-2}/H_{3n} . B. Espectro TOCSY del dominio B. C. Espectro NOESY de la mezcla equimolar H_{1-2}/H_{3n} . D. Espectro NOESY del dominio B



Estas propiedades son especialmente evidentes al comparar los espectros del dominio B

con los de la mezcla equimolar de los péptidos H_{1-2}/H_{3n} . Este último conjunto de espectros mostró una elevada aglomeración de señales en la región de H^N-H^α . Además, en la región de protones amida en el espectro NOESY no se observaron señales claras y dispersas como las encontradas en el espectro del dominio natural (Figura 20). Este comportamiento indicó que no había una estructura única. Más aún, al intentar obtener espectros de RMN del fragmento H_{1-2} se observó que una disolución 1 mM previamente filtrado por $0.2 \mu\text{M}$ se transformó lentamente en gel en el transcurso de una hora. Esto aparecía reflejado en la diferencia de la relación señal/ruido observada en los espectros de protón monodimensionales de H_{1-2} a 1 mM y 0.3 mM (Figura 21). Al disminuir la concentración se evitó la formación de gel aumentando la resolución e incluso desplazando la señal a campo bajo. Por otra parte, la adición de H_{3n} a la suspensión de H_{1-2} en relación equimolar, a una concentración de 1 mM, produjo una disolución que se mantuvo homogénea aún después de 24 h. Lo mismo se observó en la disolución del dominio B, la cual permaneció estable por varios días. Esta serie de observaciones corroboraron la importancia de H_{3n} para estabilizar la estructura del dominio B, la introducción de esta secuencia genera cambios en la dispersión de señales en la región amida del espectro del complejo no covalente H_{1-2}/H_{3n} , que son más importantes en el caso del dominio B, donde los dos fragmentos están unidos covalente.

Figura 21. Espectros monodimensionales de ^1H de H_{1-2} 1 mM, de H_{1-2} 0.3 mM, H_{1-2}/H_{3n} y dominio B en tampón fosfato 10 mM y 10% D_2O , pH 5.8 a 30 °C



3.6.2. Asignación de los espectros de los dominios B, FANV y FANK

Los tres dominios se analizaron por RMN con el fin de observar el efecto de las mutaciones en la región C-terminal. Los espectros TOCSY y NOESY de los dominios FANK y FANV muestran una dispersión de señales en la región H^N-H^α , donde se observa una zona central con una densidad alta de señales y una periferia con menos señales pero más dispersa que abarca un rango de desplazamientos químicos entre 6.5 a 8.9 ppm. Este comportamiento es similar a lo encontrado para el dominio natural. En la región de protones amida H^N-H^N también se observa una gran cantidad de señales dispersas que indican conectividades entre protones amidas de residuos vecinales, $d_{NN}(i, i+1)$, características de estructura de hélice α (Figura 22).

Las señales de los espectros se asignaron de acuerdo al método convencional explicado anteriormente a partir de los espectros TOCSY y NOESY^{54,57}. La asignación del dominio B se basó en las conectividades $d_{\alpha N}(i, i+1)$, $d_{NN}(i, i+1)$ y $d_{\alpha N}(i, i+3)$ encontradas en espectro NOESY (Figura 23) de acuerdo a lo reportado por Torigoe *et al.*⁵⁸ y Gouda *et al.*⁶. Las intensidades relativas de cada señal se calcularon a partir de intensidad promedio de los NOEs intraresiduales de las conectividades $d_{N\beta(i,i)}$ de los residuos Ser36, Phe16 y Tyr17 como referencia interna. Las conectividades encontradas en los tres residuos son similares a las del dominio B. Las correlaciones $d_{\alpha N}(i, i+3)$ mostraban un perfil similar a las del dominio B natural, lo que confirmó el alto contenido helicoidal de los tres dominios, donde se pudieron diferenciar tres regiones helicoidales.

Ligeras diferencias en el número de conectividades y en la intensidad relativa de los NOEs se hallaron en las regiones C-terminales de H_1 y H_2 . Los NOEs secuenciales de H_1 de los dominios FANK y FANV son más intensos que los del dominio B. En esta misma región en dominio FANK tiene conectividades $d_{NN}(i, i+1)$ entre los residuos Lys7 y Asn9 no observadas en el dominio natural. En los dominios B y FANK puede observarse una serie de conectividades $d_{\alpha N}(i, i+3)$ entre los residuos Gln12 a His21, mientras que en el dominio FANK estos NOEs abarcan los residuos Gln13-His22. La región previa a la Gln12 presentó pocas conectividades del tipo $d_{\alpha N}(i, i+3)$ en los tres dominios, aunque en el caso del dominio FANV se detectaron algunas señales de muy baja intensidad.

En la región de H_2 , las principales diferencias se presentaron en la zona C-terminal de la hélice. Mientras los dominios B y FANK tenían conectividades $d_{N\alpha}(i+3)$ entre los residuos 27-39, en el dominio FANV la serie de conectividades se encontraba entre los residuos 26-38, desplazada hacia la región amino terminal (Figura 24). Además, los NOEs secuenciales,

$d_{\text{Na}(i+1)}$ entre los residuos 37-40 no se observan en el espectro del dominio B, pero si en los otros dos dominios.

Figura 22. Espectros de RMN del dominio B y análogos adquiridos a 30 °C, pH 5.8 (Tampón fosfatos 10 mM, 10% de D₂O). A, C y E corresponden a la región H α -NH de los espectros TOCSY del dominio B, dominio FANK y dominio FANV, respectivamente, con un tiempo de mezcla de 65 ms. B, D, y F corresponden a la región de protones amida de los espectros NOESY del dominio B, dominio FANK y dominio FANV, respectivamente, con un tiempo de mezcla de 100 ms

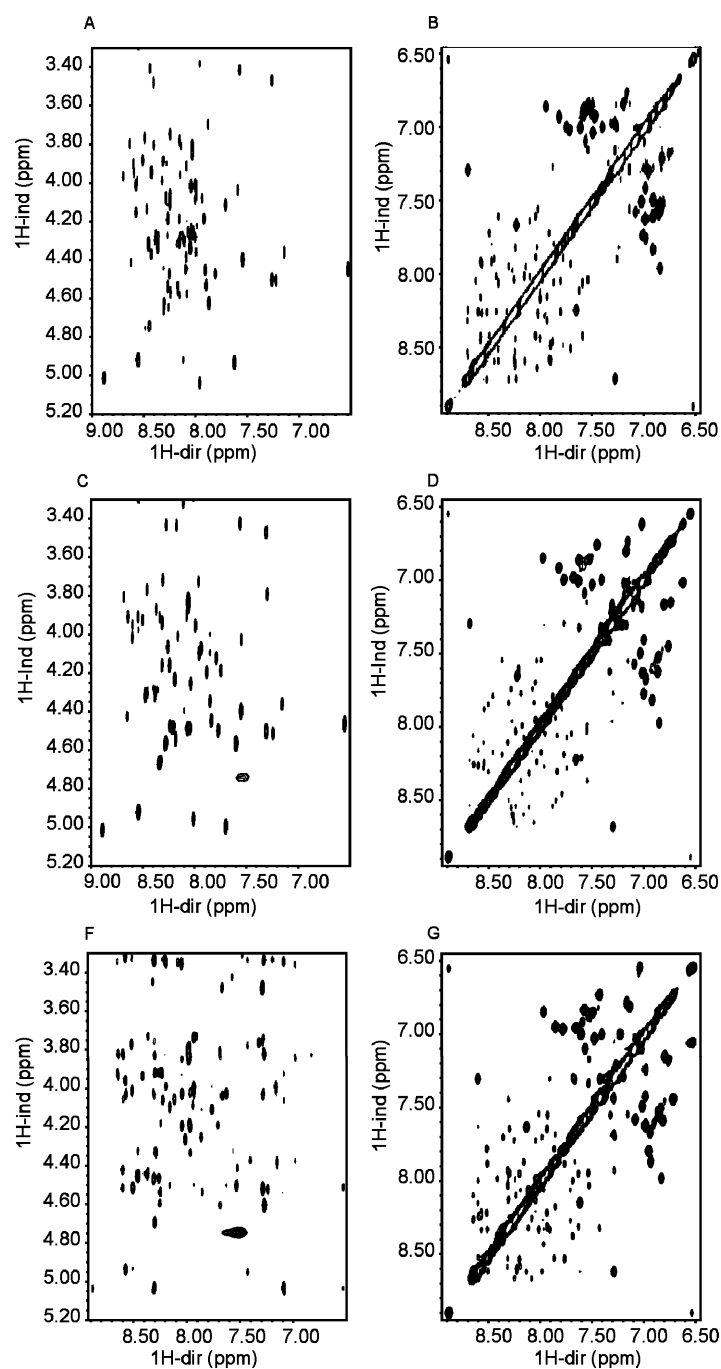


Figura 23. Resumen de los NOE de conectividades observados en el dominio B y mutantes. Cada conectividad esta representada por una línea continua que varía en el tamaño de acuerdo a la intensidad de la señal. Las líneas grises indican que estas conectividades se observaron solapadas con otras señales

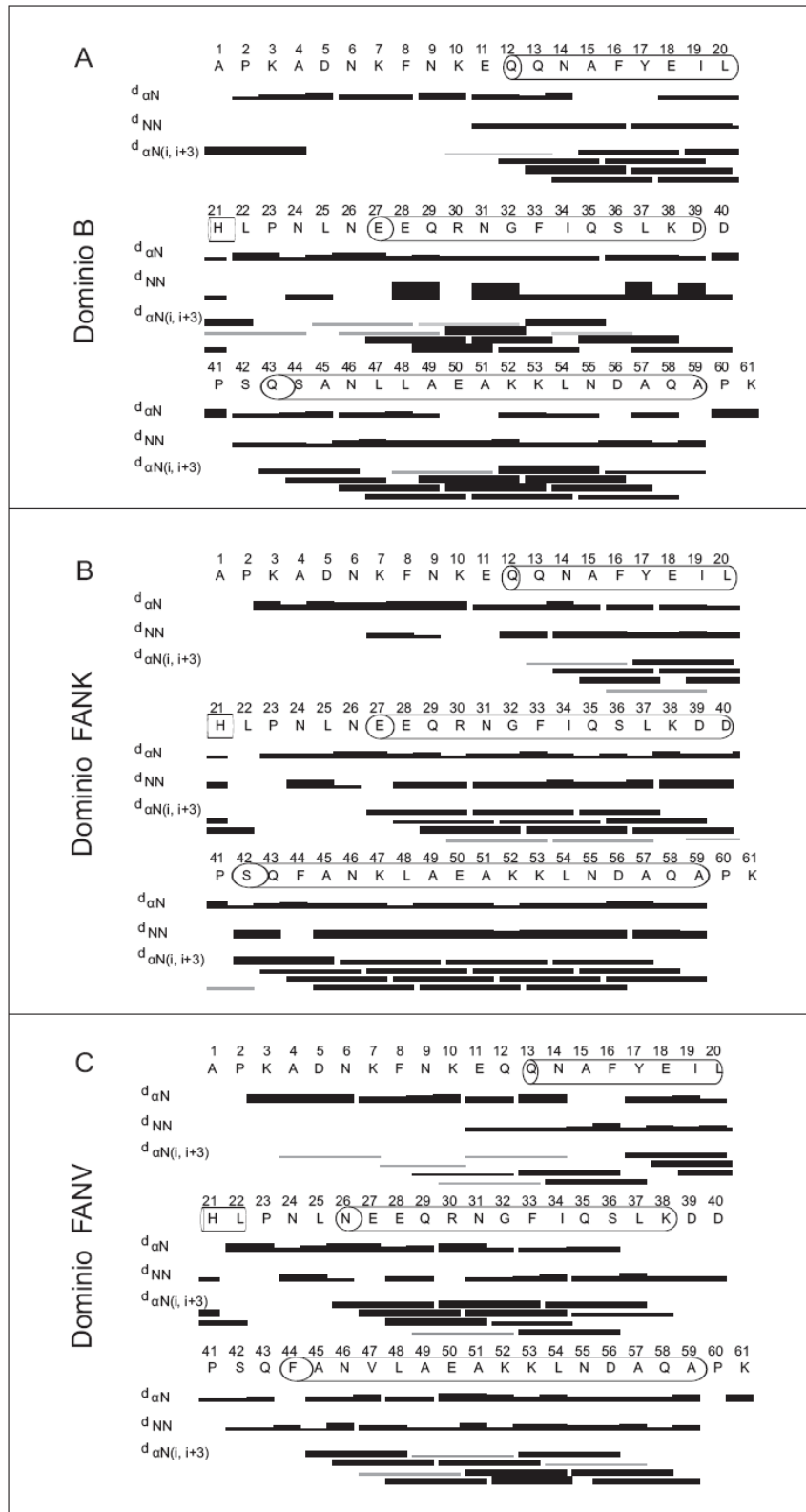
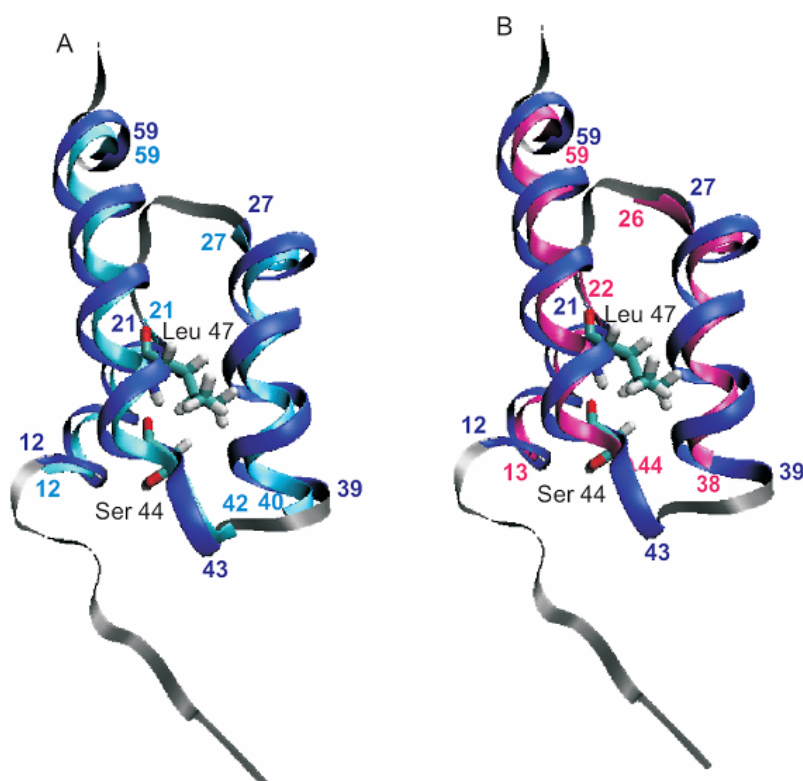


Figura 24. Representación de la estructura del dominio B donde se indica las regiones helicoidales de la proteína junto con los fragmentos que poseen conectividades entre protones del tipo $d\alpha_N$ ($i, i+3$) de los dominios análogos FANK (A) y FANV (B). Los residuos en que se realizaron las modificaciones, Ser 44 y Leu 47, se encuentran representados en formato de varillas (sticks). Las cintas de color azul muestran las regiones helicoidales del dominio B, las cintas de color azul claro indican las zonas helicoidales del dominio FANK (A), las cintas de color magenta indican las zonas helicoidales del dominio FANV (B). Los números señalan las posiciones de inicio y terminación de las hélices.



Las principales diferencias se observaron en la porción N-terminal de la hélice H_3 . En el dominio B se encontraron conectividades del tipo $dN\alpha$ ($i+3$) en la región que comprende los residuos 43-59, mientras que en el dominio FANK se localizaron entre los residuos 42-59 y en el dominio FANV entre los residuos 45-59 (Figura 24). Aunque los datos obtenidos indicaron que las mutaciones no afectaban globalmente la estructura helicoidal del dominio, si se observaron algunas diferencias en la interacción de H_3 con H_2 y H_1 . La mutación Leu47Lys, en la cual se cambió un residuo hidrofóbico por uno polar, estabilizó la región H_3 del dominio FANK, lo que mostró que no solamente las interacciones hidrofóbicas en el núcleo de un haz de tres hélices son necesarias para estabilizar la estructura. Algunas veces la introducción de residuos polares pueden eliminar la posibilidad de empaquetamientos desfavorables y así dirigir el plegamiento de la proteína hacia una estructura bien definida^{48,59}. Este fenómeno se ha descrito principalmente dentro del ámbito

del diseño de proteínas y se conoce bajo la expresión “diseño negativo”⁴⁴. El efecto de la mutación Leu47Lys es más evidente al comparar las conectividades de los protones del anillo aromático del residuo de Phe44 de ambos mutantes. En la zona de los protones aromáticos se observó que el dominio FANK tiene mayor número de conectividades que el dominio FANV, estas correlaciones se dan con los residuos Asn9, Glu11, Ala15 y Glu18 ubicados en la región de la primera hélice (Figura 25). Esto está de acuerdo con la estructura tridimensional de dominio B, donde se observa la cercanía espacial entre estos residuos y las posiciones mutadas⁸ (Figura 26). En el caso del mutante con Lys47, la interacción entre hélices puede estar favorecida tanto por la formación de enlaces de hidrógeno en el exterior del dominio, con el grupo amino de la lisina, como por las interacciones hidrofóbicas internas, con la cadena de metilenos de esta cadena lateral.

Figura 25. Conectividades de los protones aromáticos del residuo Phe44 de los dominios FANV (A) y FANK (B)

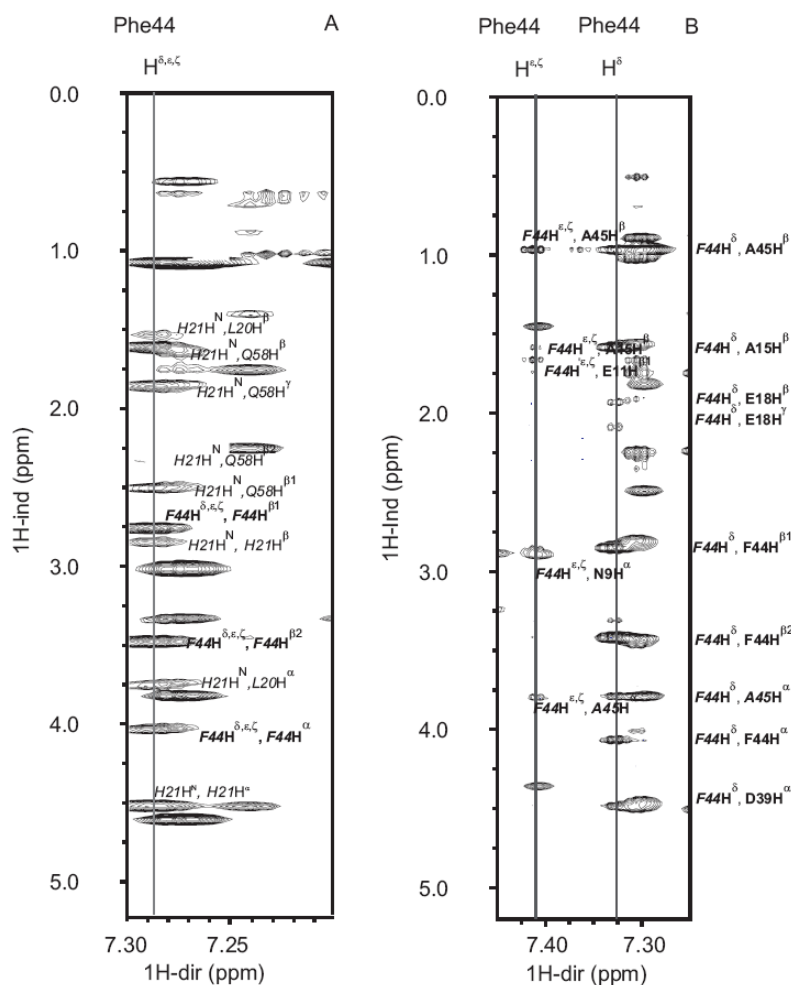
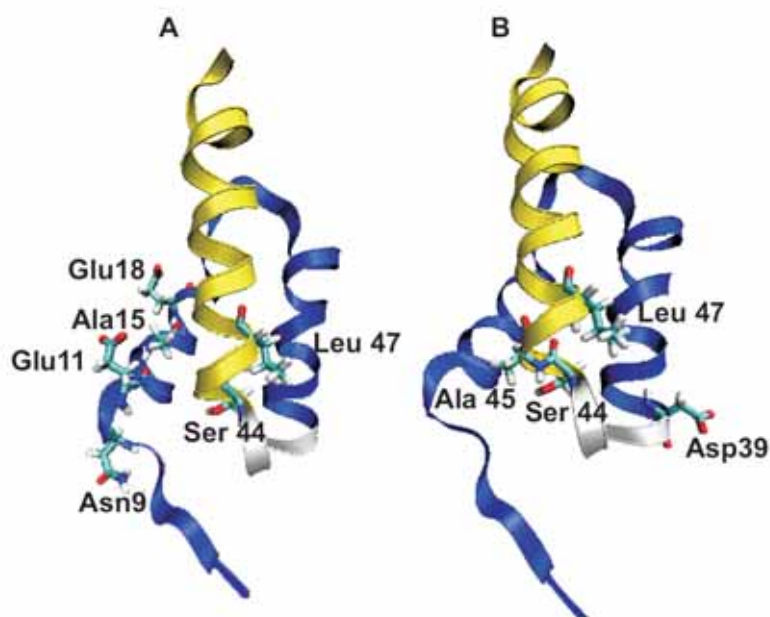


Figura 26. A. Representación tipo cintas de la estructura del dominio B indicando los residuos Ser44, Leu47 (posiciones mutadas) y los residuos de la región H₁ que muestran conectividades con los protones aromáticos de Phe44 del dominio FANK . B. También se muestran los residuos de H₂ y H₃ que tienen conectividades con los protones aromáticos de Phe44 del dominio FANK. Los esquemas se realizaron usando el programa VMD¹⁸ y el PDB 1BDD



3.6.3. Desviación del desplazamiento químico

Los desplazamientos químicos son altamente dependientes de la estructura secundaria de los péptidos o proteínas. El desplazamiento químico de un núcleo en un aminoácido depende de diferentes factores entre los cuales están los ángulos de torsión⁶⁰, el campo eléctrico^{60,61}, la exposición al solvente⁶². El efecto sobre el desplazamiento químico de los diferentes núcleos de la cadena principal (H^N, H^α, C^α, C^β, CO y N) son considerablemente diferentes si la molécula está plegada en hélice, en lámina β o como una estructura desordenada⁶³.

En el caso de los desplazamientos químicos de H^α hay una desviación hacia campo alto si está dentro de una región de hélice α y hacia campo bajo en una región de lámina β⁶⁴. Este comportamiento permite hacer una estimación cuantitativa de la estructura secundaria, a partir de la diferencia entre los desplazamientos químicos característicos de estructuras desordenadas y el desplazamiento químico del núcleo en estudio para cada residuo. Teniendo en cuenta también la forma como se da esta desviación en los H^α de residuos vecinos. Si la diferencia es positiva, mayor a 0.1 ppm y mínimo tres residuos consecutivos

tienen este comportamiento, se atribuir a una conformación de lámina β . Si mínimo cuatro residuos continuos tienen una desviación negativa y mayor a 0.1 ppm se puede tratar de una región de hélice α ⁶⁴. Los puntos de terminación de la hélice α o lámina β pueden reconocerse por la aparición de una desviación nula o de signo opuesto.

Las desviaciones se calcularon usando como referencia los desplazamientos químicos de estructuras desordenadas reportados por el Schwarzinger et al, que fueron obtenidos a partir de péptidos cortos en condiciones desnaturalizantes a pH 2.3 con 8 M de urea, 90% agua y 10% de D₂O⁶⁵. Como nuestros espectros se obtuvieron de disoluciones a pH 5.8, en el caso de los protones de residuos ácidos, como glutámico y aspártico, se usó como referencia el desplazamiento químico de las amidas correspondientes, para evitar el efecto de la presencia de la carga. Adicionalmente, el desplazamiento químico depende de la naturaleza de los residuos vecinos en la secuencia. Este efecto es particularmente importante si hay residuos de glicina, prolina o aromáticos cerca al núcleo de aminoácido en estudio. Para corregir este efecto cada uno de los desplazamientos de referencia se recalcularon teniendo en cuenta los factores de corrección adecuados⁶⁶ según la posición del átomo en la secuencia.

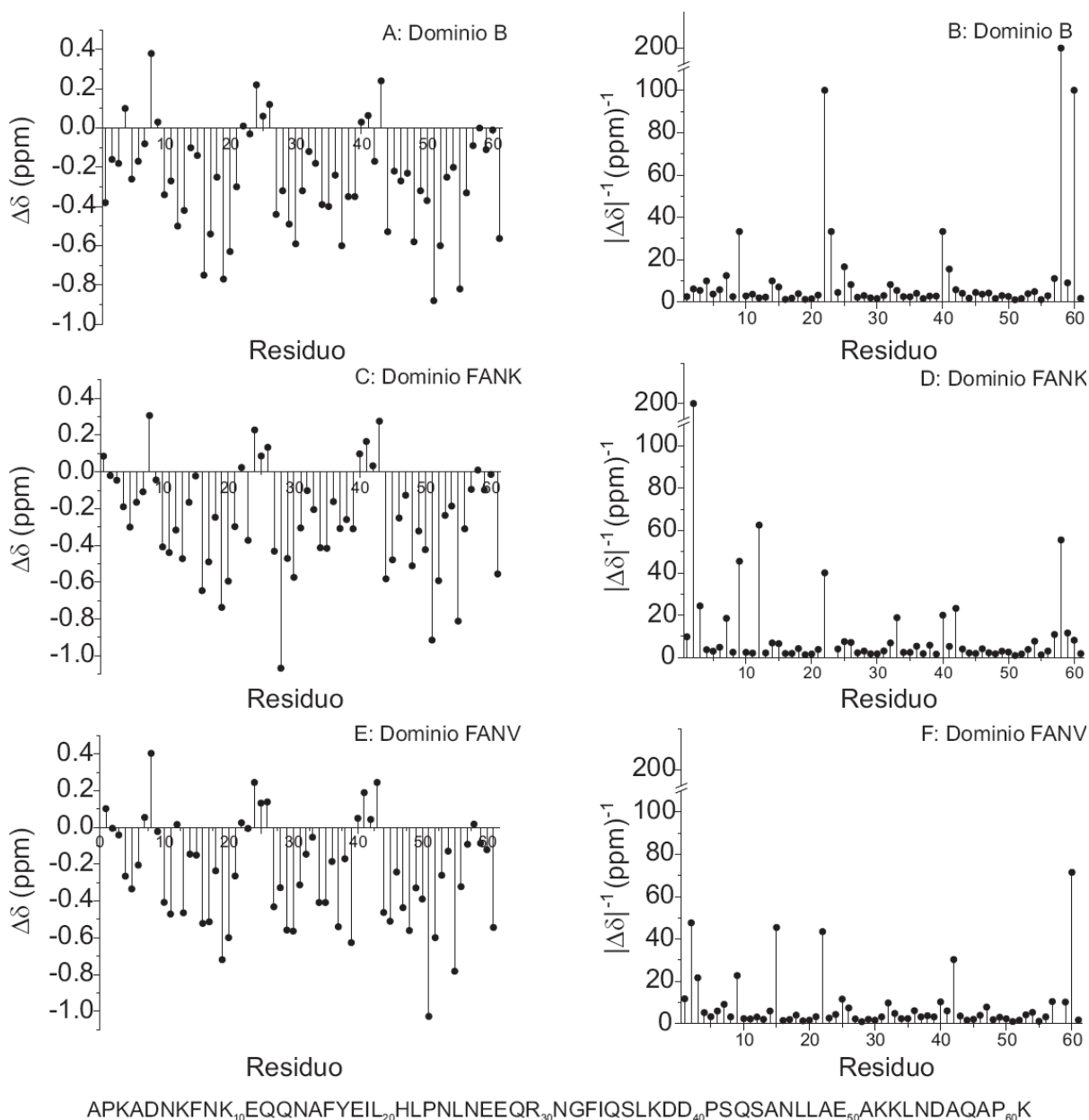
La desviación en el desplazamiento químico de cada uno de los H^α se calculó para los tres dominios. En general, tanto el dominio B como los análogos presentaron tres regiones helicoidales bien definidas que cuyo inicio y final están marcados por la presencia de un residuo de prolina (Figura 27). La prolina está frecuentemente presente en giros β debido a la restricción conformacional del anillo pirrólico⁶⁷. Estos resultados mostraron que los dominios análogos conservaron la estructura secundaria de la proteína nativa. Para observar mejor los residuos que tienen un menor desplazamiento respecto a la referencia se obtuvieron los inversos de los valores absolutos de las desviaciones de los desplazamientos químicos⁶⁸ (Figura 27). Los valores elevados indicaban una menor desviación del desplazamiento químico y podían indicar un mayor grado de orden. En este caso los dominios análogos presentaron por un lado valores mayores en la región N-terminal de H₁ y por otro, valores menores en las regiones entre H₁-H₂ y H₂-H₃. Esto podría indicar que la aunque los dominios análogos mantienen la estructura helical del dominio natural, las modificaciones afectan las interacciones internas con la región H₁.

3.6.4. Intercambio hidrógeno/deuterio

La velocidad de intercambio de protones con deuterio del disolvente proporciona información acerca de la accesibilidad y estabilidad estructural de los mismos sin perturbar el sistema.

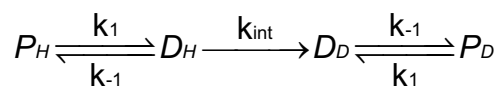
Los hidrógenos intercambiables en una proteína se encuentran unidos a oxígeno, azufre o nitrógeno en las cadenas laterales y de la cadena principal⁶⁹.

Figura 27. Desviación del desplazamiento químico ($\Delta\delta$) del dominio B nativo y análogos. A la izquierda se encuentran los gráficos de desviación del desplazamiento de cada uno de los residuos de la secuencia. A la derecha se representa el inverso de ($|\Delta\delta|^{-1}$) para observar qué señales se aproximan más los desplazamientos característicos de estructuras desordenadas



El intercambio de los hidrógenos amida que están involucrados en una estructura estable siguen en general una cinética de segundo orden, EX2, donde el replegamiento de la estructura (P) es mucho más rápido que la velocidad de intercambio químico intrínseco o en

una estructura desordenada (D)⁷⁰⁻⁷². Esto está resumido en el siguiente esquema:



Intercambio EX2 $k_{obs} = K_{eq}k_{int}$, si $k_{-1} \gg k_{int}$

Donde k_1 y k_{-1} son constantes cinéticas de la reacción de intercambio entre la estructura plegada y la desordenada, y k_{int} representa la constante de intercambio intrínseca de H/D en una estructura desordenada. K_{eq} es la constante de equilibrio de la reacción, $K_{eq} = k_{obs}/k_{int}$. Este modelo de intercambio es válido cuando la estructura es estable en un medio libre de agentes desnaturantes. En estas condiciones se calculó el factor de protección (P) como:

$$P = \frac{k_{int}}{k_{obs}}$$

La constante k_{int} , dependiente de la secuencia, se calculó de acuerdo al método de Bai et al.⁶⁹ La k_{obs} se obtuvo a partir del seguimiento de la desaparición de cada señal (I) en espectro TOCSY considerando que esta sufre un decaimiento exponencial en el tiempo (t),

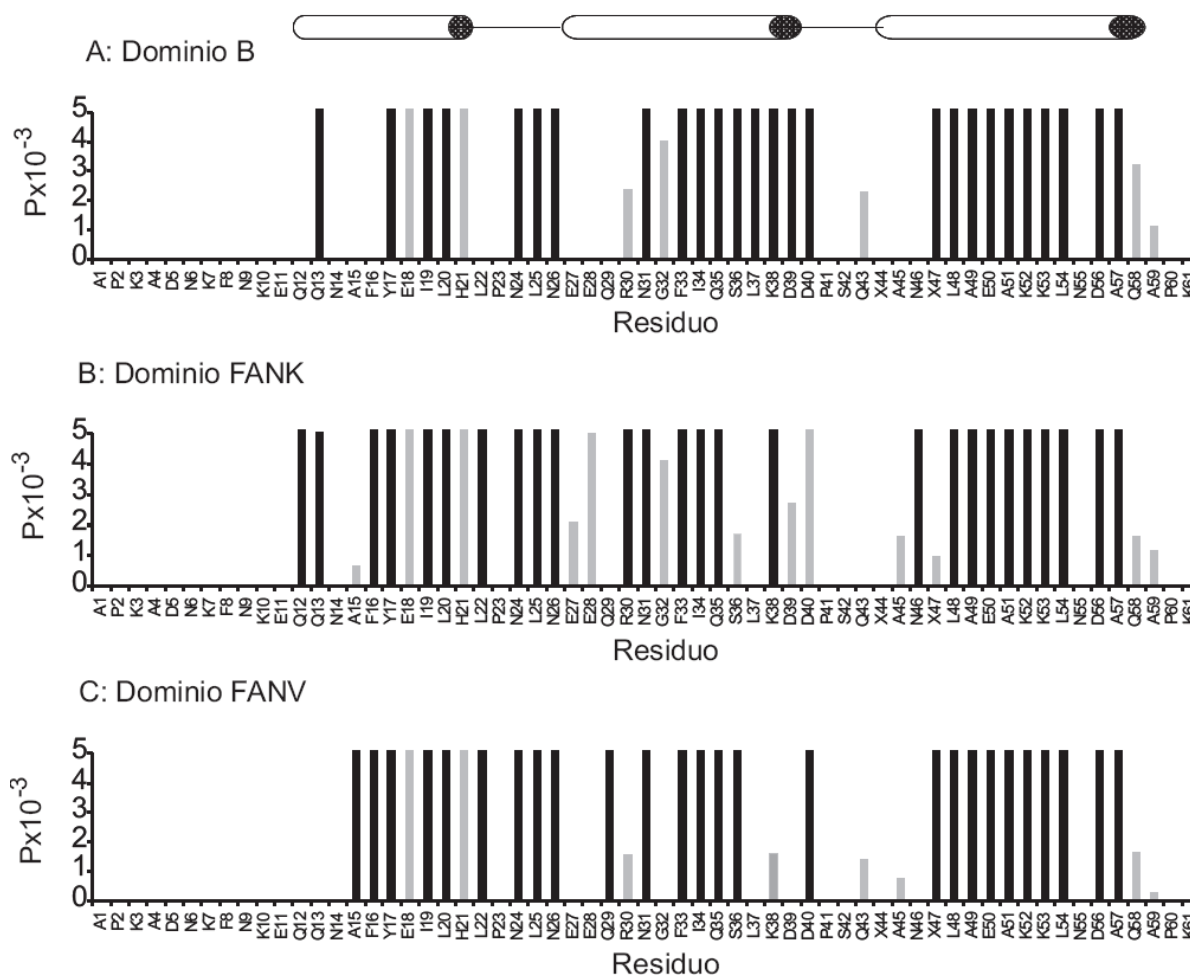
$$I = I_0 e^{-k_{obs}t} - c$$

Los experimentos TOCSY se adquirieron a 10 °C cada 60 min durante 42 horas y el primer espectro se obtuvo después de 45 min. En estas condiciones fue posible obtener los factores de protección en un rango entre 10^2 - 10^4 (Figura 28). Las zonas de las hélices que se encuentran más protegidas tienen $P > 3 \times 10^4$. Mientras que las zonas más expuestas al disolvente tienen $P < 1 \times 10^3$. La formación de un núcleo hidrofóbico donde se empaquetan las hélices protege los hidrógenos amida del intercambio, mientras las zonas intermedias entre las hélices quedan más expuestas al disolvente.

Los factores de protección altos de las zonas donde se encuentran las tres hélices indicaron que los dominios análogos conservaban la estructura nativa del dominio B sin llegar a ser un "molten globule" (glóbulo fundido)⁷³. Las señales de protón $H_{N\alpha}$ de los residuos entre las posiciones 1-12 no se observaron en la escala de tiempo de experimento realizado. En caso del dominio FANV este rango se prolongó hasta el residuo 14. En los dominios análogos, los factores de protección aumentaron en magnitud en la región del giro entre H_1 y H_2 , disminuyeron en la región C-terminal de H_2 , principalmente entre los residuos 36-39 y

volvieron a aumentar en la región N-terminal de H₃. Estas diferencias se relacionan con el perfil de conectividades y lo cambios en las desviaciones del desplazamiento químico discutidos previamente.

Figura 28. Factores de protección de los protones amida de la cadena principal del dominio B y análogos determinados a partir de los datos de intercambio H/D a 10 °C, pH 5.8 (en tampón fosfato 10 mM en D₂O). La ausencia de columnas indica que el protón amida de este residuo se intercambió durante el tiempo de preparación y adquisición del primer experimento (100 min). Las columnas negras indican que la señal de este protón no es totalmente intercambiable aún después de 42 horas de seguimiento. Las columnas grises indican los residuos que tienen factores de protección inferiores a 5×10^3 .



La estructura general de los dominios análogos es similar a la estructura del dominio B. Tres regiones helicoidales se pueden localizar de acuerdo al patrón de conectividades dadas por los NOEs, a las desviaciones en el desplazamiento químico y al perfil de protección frente al intercambio H/D. No obstante, las modificaciones en los residuos de Ser44 y Leu47 causan

variaciones importantes en las regiones que unen a H₁-H₂ y H₂-H₃. La mutación Ser44Phe ocasiona una estabilización local en H₃ y en la zona intermedia de H₁, pero en detrimento de las interacciones entre H₂ y H₃. Esto hace que las regiones C-terminal de H₂ y N-terminal de H₁ tengan mayor exposición al disolvente y por otro lado gran parte de H₁ y H₃ tengan mayor empaquetamiento.

La presencia de la mutación Leu44Lys en el dominio FANK aumenta las interacciones en el núcleo hidrofóbico respecto a la mutación Leu44Val en el dominio FANV. Esto se puede corroborar con los NOEs de correlación encontrados de los protones aromáticos de Phe44. Además esto también se refleja en el espectro de dicroísmo circular donde se observó en las mismas condiciones que este dominio tiene mayor helicidad (Figura 12). Este es un ejemplo de la función de los residuos polares involucrados en las interacciones en el núcleo hidrofóbico^{48,74}, las cuales un por lado participan en interacciones hidrofóbicas con gran parte de la cadena lateral y la carga al final interacciona dirigiendo la conformación hacia una estructura predominante.

3.7. Conclusiones

Desde el punto de vista sintético, se han encontrado las condiciones adecuadas para la obtención con buenos rendimientos del dominio B y sus análogos. Se obtuvieron productos con un grado de pureza del crudo mayor al 60% usando la estrategia de síntesis Fmoc/tBu, con una resina de baja funcionalización y al adicionar triton X-100, como agente surfactante, a la disolución de piperidina para la eliminación del grupo Fmoc.

Los péptidos análogos de la tercera hélice forman complejos no covalentes con el fragmento H₁₋₂, al igual que el péptido natural, que producen un aumento importante en la helicidad del sistema. Aunque los complejos formados son capaces de desplazar las bandas del espectro de dicroísmo hacia perfiles característicos de hélice α , estos tienen una baja estabilidad, como lo demuestran los experimentos de desnaturalización térmica. Sorprendentemente la helicidad de complejo H₁₋₂/H_{3FANV} es mayor que la del complejo formado por los péptidos con las secuencias naturales. La formación del complejo entre H₁₋₂ y los péptidos análogos de H₃ también se verificó por medio de resonancia de plasmon superficial. Aunque la unión entre H₁₋₂/H_{3FANV} es débil ($K_D : 1.96 \times 10^{-4}$) esta es mayor a la unión entre H₁₋₂/H_{3n}. Así, existe una correlación entre un aumento de la población de complejos estructurados y un mejor reconocimiento por parte de inmunoglobulina de conejo, observándose un aumento en la afinidad hasta de un orden de magnitud comparado con el complejo que proviene del

dominio natural.

Los dominios análogos con las mutaciones en la Ser44 y en la Leu47 conservan la estructura secundaria del dominio natural. El dominio FANK muestra una helicidad mayor al nativo y una estabilidad térmica similar. Por otro lado, el dominio FANV, es ligeramente menos helicoidal pero tiene mayor estabilidad térmica que el nativo.

El reconocimiento entre la inmunoglobulina o el fragmento cristalizante y los dominios FANK y FANV, comparados con el natural, se analizó mediante resonancia de plasmon superficial. Aunque las constantes cinéticas de asociación y disociación de unión a inmunoglobulina de conejo difieren de las del dominio B, la afinidad resultante es similar a la del natural. Por otro lado, la evaluación del reconocimiento por parte del fragmento cristalizante de inmunoglobulina humana muestra una afinidad reducida por los análogos respecto a la proteína nativa, debido a un aumento en la velocidad de disociación asociado con la disminución en la velocidad de asociación.

Los tres dominios se han caracterizado estructuralmente por espectroscopia de RMN. La estructura helicoidal del dominio B se conserva en los dos mutantes. A partir de las conectividades dadas por los NOEs y los perfiles de la desviación del desplazamiento químico se identificaron tres regiones helicoidales tanto en el dominio natural como en los dominios análogos. Los experimentos de H/D muestran que las principales diferencias en el empaquetamiento de las hélices se encuentran en las regiones que conectan las hélices H₁-H₂ y las hélices H₂-H₃. La mutación Ser44Phe afecta negativamente la interacción de H₃ con H₂ y favorece la interacción con H₁. Sin embargo, la mutación Leu47Lys en el dominio FANK modifica el empaquetamiento del núcleo hidrofóbico del haz de hélices aumentando la helicidad de este dominio con respecto al dominio FANV. Estas variaciones en el empaquetamiento del núcleo hidrofóbico en las cercanías de la región de interacción con Fc pueden estar asociadas al aumento de la velocidad de disociación de los dominios análogos de la inmunoglobulina.

Bibliografía

- (1) Sjodahl, J. Repetitive sequences in protein A from *Staphylococcus aureus*. Arrangement of five regions within the protein, four being highly homologous and Fc-binding. *Eur. J. Biochem.* **1977**, *73*, 343-351.
- (2) Langone, J. J. Protein A of *Staphylococcus aureus* and related immunoglobulin receptors produced by streptococci and pneumococci. *Adv. Immunol.* **1982**, *32*, 157-252.
- (3) Fournier, B.; Philpott, D. J. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin. Microbiol. Rev.* **2005**, *18*, 521-540.

- (4) Wright, C.; Willan, K. J.; Sjobahl, J.; Burton, D. R.; Dwek, R. A. The interaction of protein A and Fc fragment of rabbit immunoglobulin G as probed by complement-fixation and nuclear-magnetic-resonance studies. *Biochem. J.* **1977**, *167*, 661-668.
- (5) Jendeborg, L.; Nilsson, P.; Larsson, A.; Denker, P.; Uhlen, M. et al. Engineering of Fc(1) and Fc(3) from human immunoglobulin G to analyse subclass specificity for staphylococcal protein A. *J. Immunol. Methods* **1997**, *201*, 25-34.
- (6) Hober, S.; Nord, K.; Linhult, M. Protein A chromatography for antibody purification. *J. Chromatogr. B* **2007**, *848*, 40-47.
- (7) Sjobahl, J. Structural studies on the four repetitive Fc-binding regions in protein A from *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Biochem.* **1977**, *78*, 471-490.
- (8) Gouda, H.; Torigoe, H.; Saito, A.; Sato, M.; Arata, Y. et al. Three-dimensional solution structure of the B domain of staphylococcal protein A: Comparison of the solution and crystal structures. *Biochemistry* **1992**, *31*, 9665-9672.
- (9) Deisenhofer, J. Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution. *Biochemistry* **1981**, *20*, 2361-2370.
- (10) Gouda, H.; Shiraishi, M.; Takahashi, H.; Kato, K.; Torigoe, H. et al. NMR study of the interaction between the B Domain of Staphylococcal protein A and the Fc portion of immunoglobulin G. *Biochemistry* **1998**, *37*, 129-136.
- (11) Zheng, D.; Aramini, J. M.; Montelione, G. T. Validation of helical tilt angles in the solution NMR structure of the Z domain of Staphylococcal protein A by combined analysis of residual dipolar coupling and NOE data. *Protein Sci.* **2004**, *13*, 549-554.
- (12) Takahashi, H.; Nakanishi, T.; Kami, K.; Arata, Y.; Shimada, I. A novel NMR method for determining the interfaces of large protein-protein complexes. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 220-223.
- (13) Huston, J. S.; Cohen, C.; Maratea, D.; Fields, F.; Tai, M. S. et al. Multisite association by recombinant proteins can enhance binding selectivity. Preferential removal of immune complexes from serum by immobilized truncated FB analogues of the B domain from staphylococcal protein A. *Biophys. J.* **1992**, *82*, 105-109.
- (14) Sanchez, Y. M. Sobre la validesa del concepto retro-enatio en pèptids helicodals. In *Departamento de Química Orgánica*; Universidad de Barcelona: Barcelona, 1996; pp 168.
- (15) González, M. J. Uso de aminoácidos D en la síntesis de péptidos y proteínas. In *Departamento de Química Orgánica*; Universidad de Barcelona: Barcelona, 1999; pp 170.
- (16) Pastor, J. J. Una nueva estrategia de química combinatoria para el diseño y modificación de dominios proteicos. In *Departamento de Química Orgánica*; Universidad de Barcelona: Barcelona, 2004; pp 230.
- (17) Pastor, J. J.; Granados, G.; Carulla, N.; Rabanal, F.; Giralt, E. Redesign of protein domains using one-bead-onecompound combinatorial chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, en impresión.
- (18) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Molec. Graphics* **1996**, *14*, 33-38.
- (19) Schnolzer, M.; Alewood, P.; Jones, A.; Alewood, D.; Kent, S. B. In situ neutralization in Boc-chemistry solid phase peptide synthesis. Rapid, high yield assembly of difficult sequences. *Int. J. Pept. Protein. Res.* **1992**, *40*, 180-193.
- (20) Miranda, L. P.; Alewood, P. F. Accelerated chemical synthesis of peptides and small proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 1181-1186.
- (21) Bedford, J.; Hyde, C.; Johnson, T.; Jun Wen Owen, D.; Quibbel, M. et al. Amino-acid structure and difficult sequences in solid phase peptide synthesis. *Int. J. Peptide Prot. Res.* **1992**, *40*, 300-307.
- (22) Valente, A. P.; Almeida, F. C. L.; Nakaie, C. R.; Schreier, S.; Crusca, E. et al. Study of the effect of the peptide loading and solvent system in SPPS by HRMAS-NMR. *J. Pept. Sci.* **2005**, *11*, 556-563.

- (23) Jubilut, G. N.; Miranda, M. T.; Tominaga, M.; Okada, Y.; Miranda, A. et al. Resin Selection Based on the Lability of Peptidyl-Resin Linkage towards HF and TFA Steps: Dependence on the C-Terminal Amino Acid and Peptide Length. *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 1560-1563.
- (24) Stewart, J. M. Cleavage methods following Boc-based solid-phase peptide synthesis. *Methods Enzymol.* **1997**, *289*, 29-44.
- (25) Carpino, L. A.; Han, G. Y. The 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino protecting group. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404-3409.
- (26) Sheppard, R. The fluorenylmethoxycarbonyl group in solid phase synthesis. *J. Peptide Sci.* **2003**, *9*, 545-552.
- (27) Atherton, E.; Sheppard, R. C. *Solid phase peptide synthesis, a practical approach*; IRL Press at Oxford University Press: Oxford, 1989; 203.
- (28) Hyde, C.; Johnson, T.; Owen, D.; Quibell, M.; Sheppard, R. C. Some "difficult sequences" made easy. A study of interchain association in solid-phase peptide synthesis. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *43*, 431-440.
- (29) Tickler, A. K.; Clippingdale, A. B.; Wade, J. D. Amyloid as a "difficult sequence" in solid phase peptide synthesis. *Protein Pept. Lett.* **2004**, *11*, 377-384.
- (30) Fields, G. B. Methods for removing the Fmoc group. *Methods in Molecular Biology (Totowa, NJ, United States)* **1994**, *35*, 17-27.
- (31) Quibell, M.; Johnson, T. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. A Practical Approach*: Oxford, 2000; 115-136.
- (32) Pugh, K. C.; York, E. J.; Stewart, J. M. Effects of resin swelling and substitution on solid phase synthesis. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1992**, *40*, 208-213.
- (33) McNamara, J. F.; Lombardo, H.; Pillai, S. K.; Jensen, I.; Albericio, F. et al. An efficient solid-phase strategy for the construction of chemokines. *J. Peptide Sci.* **2000**, *6*, 512-518.
- (34) Greenfield, N. J. Analysis of circular dichroism data. *Methods Enzymol.* **2004**, *383*, 282-317.
- (35) Moffitt, W. The optical rotatory dispersion of simple polypeptides II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1956**, *42*, 736-746.
- (36) Braisted, A. C.; Wells, J. A. Minimizing a binding domain from protein A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1996**, *93*.
- (37) Nedwidek, M. N.; Hecht, M. H. Minimized protein structures: A little goes a long way. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 10010-10011.
- (38) Haack, T.; Sanchez, Y. M.; Gonzalez, M. J.; Giralt, E. Structural comparison in solution of a native and retro peptide derived from the third helix of Staphylococcus aureus protein A, domain B: retro peptides, a useful tool for the discrimination of helix stabilization factors dependent on the peptide chain orientation. *J. Pept. Sci* **1997**, *3*, 299-313.
- (39) Klotz, I. M. Solvent water and protein behavior: View through a retroscope. *Protein Sci.* **1993**, *2*, 1992-1999.
- (40) Klotz, I. M. *Ligand-receptor energetics: a guide for the perplexed*; John Wiley & Sons, inc.: New York, 1997; 161.
- (41) Lofås, S.; Johnsson, B.; Edstrom, A.; Hansson, A.; Lindquist, G. et al. Methods for site controlled coupling to carboxymethyl dextran surfaces in surface plasmon resonance sensors. *Biosens. Bioelectron.* **1995**, *10*, 813-822.
- (42) Karlsson, R.; Ståhlberg, R. Surface plasmon resonance detection and multispot sensing for direct monitoring of interactions involving low-molecular-weight analytes and for determination of low affinities. *Anal. Biochem.* **1995**, *228*, 274-280.
- (43) Karlsson, R.; Roos, H.; Fägerstam, L. G.; Persson, B. Kinetic and Concentration Analysis Using BIA Technology. *Methods* **1994**, *6*, 99-110.
- (44) Khalifa, M. B.; Choulier, L.; Lortat-Jacob, H.; Altschuh, D.; Vernet, T. BIACORE data processing: an evaluation of the global fitting procedure. *Anal. Biochem.* **2001**, *293*, 194-203.

- (45) Fägerstam, L. G.; Frostell-Karlsson, A.; Karlsson, R.; Persson, B.; Ronnberg, I. Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis. *J. Chromatogr.* **1992**, *597*, 397-410.
- (46) Felder, S.; Zhou, M.; Hu, P.; Urena, J.; Ullrich, A. et al. Quantification of Short Term Signaling by the Epidermal Growth Factor Receptor. *Mol. Cell. Biol.* **1993**, *13*, 1449-1455.
- (47) Sreerama, N. CDPro, <http://lamar.colostate.edu/~sreeram/CDPro/main.html>.
- (48) Baltzer, L.; Nilsson, H.; Nilsson, J. De novo design of proteins-what are the rules? *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3153-3164.
- (49) Walsh, S. T.; Sukharev, V. I.; Betz, S. F.; Vekshin, N. L.; DeGrado, W. F. Hydrophobic core malleability of a de novo designed three-helix bundle protein. *J. Mol. Biol.* **2001**, *305*, 361-373.
- (50) Liu, R.; Baase, W. A.; Mathews, B. W. The introduction of strain and its effects on the structure and stability of T4 lysozyme. *J. Mol. Biol.* **2000**, *295*, 127-145.
- (51) Sagawa, T.; Oda, M.; Morii, H.; Takizawa, H.; Kozono, H. et al. Conformational changes in the antibody constant domain upon hapten-binding. *Mol. Immunol.* **2005**, *42*, 9-18.
- (52) Forsgren, A.; Sjoquist, J. "Protein A" from *S. aureus*. I. Pseudo-immune reaction with human gamma-globulin. *J. Immunol.* **1966**, *97*, 822-827.
- (53) Wüthrich, K. Determination of three-dimensional protein structures in solution by nuclear magnetic resonance: An overview. *Methods Enzymol.* **1989**, *177*, 125-131.
- (54) Wüthrich, K. *NMR of proteins and nucleic acids*; Wiley: New York, 1986; 320.
- (55) Braunschweiler, L.; Ernst, R. R. Coherence transfer by isotropic mixing: Applications to proton correlation spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **1983**, *53*, 521-529.
- (56) Bax, A. Homonuclear Hartmann-Hahn experiments. *Methods Enzymol.* **1989**, *176*, 151-168.
- (57) Basus, V. J. Proton nuclear magnetic resonance assignment. *Methods Enzymol.* **1989**, *177*, 132-149.
- (58) Torigoe, H.; Shimada, I.; Saito, A.; Sato, M.; Arata, Y. Sequential ¹H assignments and secondary structure of the B domain of staphylococcal protein A: Structural changes between the free B domain in solution and the Fc-bound B domain in crystal. *Biochemistry* **1990**, *29*, 8787-8793.
- (59) Beasley, J. R.; Hecht, M. H. Protein design: the choice of novo sequences. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 2031-2034.
- (60) Wishart, D. S.; Case, D. A. Use of chemical shift in macromolecular structure determination. *Methods Enzymol.* **2001**, *338*, 3-34.
- (61) Carlisle, E. A.; Holder, J. L.; Maranda, A. M.; de Alwis, A. R.; Selkie, E. L. et al. Effect of pH, urea, peptide length, and neighboring amino acids on alanine α -proton random coil chemical shifts. *Biopolymers* **2007**, *85*, 72-80.
- (62) Avbelj, F.; Kocjan, D.; Baldwin, R. L. Protein chemical shifts arising from α -hélices and β -sheets depend on solvent exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 17394-17397.
- (63) Wishart, D. S.; Nip, A. M. Protein chemical shift analysis: a practical guide. *Biochem. Cell Biol.* **1998**, *76*, 153-163.
- (64) Wishart, D. S.; Sykes, B. D.; Richards, F. M. the chemical shift index: A fast and simple methods for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy. *Biochemistry* **1992**, *31*, 1647-1651.
- (65) Schwazinger, S.; Kroon, G. J.; Foss, T. R.; Wrigth, P. E.; Dyson, H. J. Random coil chemical shift in acidic 8M urea: implementation of random coil shift data in NMRView. *J. Biomol. NMR* **2000**, *18*, 43-48.
- (66) Schwazinger, S.; Kroon, G. J.; Foss, T. R.; Chung, J.; Wrigth, P. E. et al. Sequence-dependent correction of random coil NMR chemical shift. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**,

- 123, 2970-2978.
- (67) Senes, A.; Engel, D. E.; DeGrado, W. F. Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 465-479.
- (68) Berjanskii, M.; Wishart, D. S. NMR: prediction of protein flexibility. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 683-688.
- (69) Bai, Y.; Milne, J. S.; Mayne, L.; Englander, S. W. Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. *Proteins* **1993**, *17*, 75-86.
- (70) Molday, R. S.; Englander, S. W.; Kallen, R. G. Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. *Biochemistry* **1972**, *11*, 151-158.
- (71) Englander, S. W.; Sosnick, T. R.; Englander, J. J.; Mayne, L. Mechanisms and uses of hydrogen exchange. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 18-23.
- (72) Maier, C. S.; Deinzer, M. L. Protein Conformations, Interactions, and H/D Exchange. *Methods Enzymol.* **2005**, *402*, 312-360.
- (73) Redfield, C. Using nuclear magnetic resonance spectroscopy to study molten globule states of proteins. *Methods* **2004**, *34*, 121-132.
- (74) Koder, R. L.; Valentine, K. G.; Cerda, J.; Noy, D.; Smith, K. M. et al. Nativelike structure in designed four α -helix bundles driven by buried polar interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14450-14451.

