

18.126

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

Facultad de Ciencias Químicas.



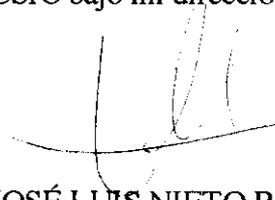
**Papel de los giros β en el plegamiento de proteínas.
Estudio por Resonancia Magnética Nuclear.**

Memoria, que para optar al grado de Doctor presenta

Francisco José Blanco Gutiérrez.

Instituto de Estructura de la Materia, CSIC.
Madrid, 1992.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en la
Unidad Estructural de Espectroscopía del
Instituto de Estructura de la Materia del
CSIC bajo mi dirección.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'JL Nieto Rodríguez', written over a horizontal line.

JOSÉ LUIS NIETO RODRIGUEZ.
Investigador Científico del CSIC.

Madrid 11 de Noviembre de 1992.

A mis padres.

Quiero expresar mi mayor gratitud a todos los miembros de la Unidad Estructural de Espectroscopía Molecular del Instituto de Estructura de la Materia. Su apoyo y estímulo permanentes han sido esenciales para llevar a buen término esta tesis.

Estoy especialmente agradecido al Dr. José Luis Nieto por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo y por todo lo que he aprendido a su lado, a la Dra. María Ángeles Jiménez por su compañía y colaboración constantes y a José Luis Neira por los gratos, y no tan gratos, momentos que hemos compartido.

Quiero agradecer también a los Drs. José Manuel Andreu y Alain Chaffotte su ayuda en el registro de los espectros de dicroísmo circular.

Finalmente, gracias a los contribuyentes españoles por el apoyo económico que me han dado a través de una beca del Ministerio de Educación y Ciencia.

Índice

Capítulo 1. INTRODUCCION.....	1
- El problema del plegamiento de las proteínas.....	3
- Estado actual del problema.....	4
- Estudio conformacional de péptidos aislados.....	6
- Importancia de los giros β	8
- Objetivos.....	10
Capítulo 2. METODOS Y MATERIALES.....	13
2.1. Métodos.....	15
- Técnicas de estudio conformacional de péptidos.....	15
- Resonancia magnética nuclear.....	16
- Parámetros espectrales con información estructural.....	16
- Tipos de NOE y estructura secundaria.....	17
- Criterios de detección de giros β	20
- Asignación del espectro.....	21
- Los experimentos NOESY y ROESY.....	25
- Cálculo de estructuras.....	29
- Geometría de distancias.....	30
- Dinámica molecular.....	31
2.2. Materiales.....	34
- Obtención de los péptidos.....	34
- Dicroísmo circular.....	34
- Resonancia magnética nuclear.....	34
- Cálculo de estructuras.....	35
Capítulo 3. ESTUDIO CONFORMACIONAL DE FRAGMENTOS DE PROTEINAS.....	36
3.1. Fragmento 12-26 de "Tendamistat" y péptidos relacionados.....	38
- Resultados.....	39
- Fragmento 12-26.....	39
- Fragmento 15-23.....	48
- Fragmento [S ¹⁸]15-23.....	51
- Fragmento [V ²¹]15-23.....	53
- Discusión.....	57
3.2. Fragmento 35-44 de "Tendamistat" y péptidos relacionados.....	61
- Resultados.....	61
- Fragmento [Q ⁴²]35-44.....	61
- Fragmento 35-44.....	65
- Fragmento [N ³⁸]35-44.....	68
- Fragmento [W ⁴¹]35-44.....	70
- Discusión.....	75
3.3. Fragmento 2-19 del dominio de unión a inmunoglobulinas G de "Proteína G".....	77
- Resultados.....	78
- Discusión.....	81
3.4. Fragmento 63-74 de "Ribonucleasa A".....	83
- Resultados.....	
- Fragmento 63-74 oxidado.....	83
- Fragmento 63-74 reducido.....	87
- Discusión.....	91
3.5. Fragmento 245-260 de "Termolisina".....	92
- Resultados.....	92
- Discusión.....	95

Capítulo 4. ESTUDIO CONFORMACIONAL DE PEPTIDOS CON SECUENCIAS DISEÑADAS.....	97
- Introducción.....	98
- Resultados.....	100
- Péptido Ac-LKLKLGDSLKLLKLNH ₂	100
- Péptido betamax.....	102
- Discusión.....	110
Capítulo 5. RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	112
5.1. Resumen.....	113
5.2. Conclusiones.....	118
APENDICE.....	119
BIBLIOGRAFIA.....	133

Capítulo 1.
Introducción.

En el proceso de estructuración de una proteína globular, se puede ver pues a la vez la imagen microscópica y la fuente del desarrollo epigenético autónomo del organismo mismo.

Jacques Monod, " El azar y la necesidad"

El trabajo presentado en esta tesis ha tenido como objetivo investigar la importancia de las secuencias con estructura de tipo giro β en el proceso del plegamiento de proteínas. La abundancia relativa de estos elementos estructurales en las proteínas y su conformación, con una inversión en el sentido de avance de la cadena polipeptídica, justifican el interés por el estudio de sus propiedades estructurales y han sido objeto de numerosos trabajos. Sin embargo, su papel en el plegamiento de las proteínas es aún controvertido.

El problema del plegamiento de proteínas.

Los primeros estudios de Anfinsen y col. (revisados en Anfinsen, 1973) con la ribonucleasa A mostraron que la desnaturalización era un proceso reversible y que la proteína recuperaba su estructura nativa funcional espontáneamente cuando se eliminaba el agente desnaturalizante. Estos resultados les llevaron a proponer lo que denominaron la hipótesis termodinámica: "... Esta hipótesis establece que la estructura tridimensional de una proteína en su medio fisiológico normal (disolvente, pH, fuerza iónica, presencia de otros componentes como iones metálicos o grupos prostéticos, temperatura y otros factores) es aquella en la cual la energía libre de Gibbs del sistema completo es menor; esto es, la conformación nativa está determinada por la totalidad de las interacciones interatómicas y, por tanto, por la secuencia de aminoácidos, en un medio determinado ..." (Anfinsen, 1973). Los mismos resultados se han observado para un gran número de proteínas globulares de pequeño tamaño y en la actualidad no hay duda de que toda la información necesaria para el plegamiento de la proteína está contenida en la secuencia de aminoácidos, aunque requiere un medio o contexto adecuado para expresarse correctamente. Otros factores pueden facilitar el plegamiento in vivo, pero no determinan la estructura final de la molécula (Fischer, 1990).

El hecho de que toda la información necesaria para plegarse se encuentre en la secuencia de aminoácidos ha llevado a hablar en términos de la existencia de un código de plegamiento en analogía con el código genético. A diferencia de éste, el código de plegamiento es bastante complejo y prácticamente desconocido a pesar de los grandes esfuerzos realizados para descifrarlo. La degeneración del código es muy grande a todos los niveles como se aprecia en la gran tolerancia de las estructuras proteicas a las mutaciones (Bowie, 1990) y en el pequeño número de patrones estructurales que adoptan las proteínas de estructura tridimensional conocida (Finkelstein). El problema de cómo una cadena polipeptídica adopta una estructura tridimensional única en el medio adecuado es un problema químico-físico y por tanto puede ser abordado experimentalmente. Se

trata de desenmarañar la complejidad de los procesos físicos que ocurren en el plegamiento. El diseño de proteínas con una estructura predeterminada proporciona un medio de poner a prueba los conocimientos que se tienen acerca del plegamiento. Los intentos hasta ahora han tenido un moderado éxito (Richardson, 1986), lo cual indica que el plegamiento puede no ser tan complejo como imaginamos y permite ser optimistas en cuanto a alcanzar una solución en un futuro próximo.

El gran esfuerzo realizado en los últimos años para encontrar una solución al problema del plegamiento muestra el interés que existe hacia este problema. Aparte del reto que supone la comprensión de uno de los procesos que forman parte de los fundamentos de la vida, hay grandes expectativas en cuanto a las posibilidades prácticas que abriría el dominio de las leyes que rigen el plegamiento de las proteínas: desde solucionar los problemas que se plantean en la obtención de proteínas funcionales por clonaje en microorganismos hasta la posibilidad de modificar, de un modo más directo y efectivo que en la actualidad, las propiedades de enzimas e incluso, de diseñar nuevas proteínas con funciones específicas.

Estado actual del problema.

En el problema del plegamiento hay dos aspectos fundamentales que reciben la atención de las investigaciones:

- **¿ por qué se pliegan las proteínas?**, ¿cuales son los determinantes de la **estabilidad** de la estructura tridimensional de las proteínas?

-**¿ cómo se pliegan?**, ¿ cual es el **camino de plegamiento** que sigue una proteína para adoptar su estructura tridimensional nativa a partir de su forma desplegada?

Ambos aspectos están íntimamente relacionados puesto que las fuerzas determinantes de la estabilidad de las estructuras tridimensionales tendrán un papel dominante en la dirección del plegamiento.

La estabilidad de las estructuras proteicas es *relativamente pequeña*, del orden de unas 5-15kcal/mol (Pace,1990). Esto implica que la estructura tridimensional es el resultado de un balance muy ajustado entre el gran número de fuerzas que contribuyen a la estabilidad de la estructura final. La contribución de los diferentes tipos de fuerzas ha sido muy estudiada (revisado en Dill, 1990) y aún se discute bastante acerca de su importancia relativa. Las diferentes fuerzas se pueden clasificar en :

- interacciones electrostáticas, su contribución no es grande debido al pequeño número de pares iónicos en las proteínas,

- interacción hidrofóbica, relacionada con la preferencia de las cadenas laterales de los aminoácidos apolares por excluir el disolvente acuoso de su entorno y rodearse de otras cadenas apolares. Existe bastante acuerdo en considerar que esta es la fuerza dominante en el plegamiento, idea apoyada por la desnaturalización de las proteínas en urea, cloruro de guanidinio y disolventes orgánicos,

- puentes de hidrógeno, su contribución ha sido objeto de revisión continua. Existen argumentos para pensar que los puentes de hidrógeno intramoleculares no son energéticamente ventajosos para la estabilidad de la estructura plegada puesto que se forman a costa de romperlos con las moléculas del disolvente, de energía similar (Kaufman, 1959); lo mismo se puede decir de las interacciones de van der Waals. Sin embargo, estudios recientes sobre el efecto de mutaciones que eliminan puentes de hidrógeno en la estabilidad de proteínas (Pace, 1992) apoyan la idea de que su contribución puede ser grande, del mismo orden que la de la hidrofóbica,

- interacciones locales, entendiéndose con ello las preferencias intrínsecas que las cadenas laterales de los aminoácidos imponen en la conformación del esqueleto bien individualmente bien en combinaciones de pares o tríadas de aminoácidos (Anfinsen, 1975), que surgen de la suma de fuerzas de corto alcance. Sobre el grado en que estas interacciones determinan la estructura hay gran discrepancia. Su importancia está apoyada por las preferencias conformacionales encontradas en péptidos de corta longitud (Wright, 1988) que, en los casos de estructura secundaria de tipo hélice α , se corresponden con la estructura que adoptan en la proteína nativa, y por la existencia de estructuras residuales en las proteínas desnaturalizadas (Dill, 1991).

La identificación de las fuerzas dominantes en el plegamiento es sólo una parte del problema. La otra parte se refiere al mecanismo del plegamiento, la secuencia de acontecimientos que llevan de la forma desplegada a la forma plegada y cuya comprensión es clave para conocer las reglas del plegamiento. Resulta obvio que las proteínas no pueden adoptar su estructura tridimensional de mínima energía muestreando todo el espacio de estructuras posibles, ya que el tiempo necesario sería muy grande en contra de la observación de tiempos del orden de segundos o minutos para proteínas cuyo plegamiento no está retardado por la isomerización de prolinas. Esto sugiere que el plegamiento debe darse por etapas y que el grado de estructuración alcanzado en cada una de ellas se mantiene en las siguientes.

Uno de los mayores avances en el entendimiento de este aspecto ha sido la confirmación de lo que se suponía debía ocurrir en un proceso como este: la existencia de un camino o caminos de plegamiento definidos que transcurre a través de especies intermedias (Kim, 1982). Los resultados experimentales indican que, a pesar de la heterogeneidad conformacional del estado desplegado, todas las moléculas convergen

rápidamente en una ruta de plegamiento y que la etapa limitante tiene lugar al final de éste (Creighton, 1990). En los últimos años se ha realizado una gran cantidad de trabajo enfocado a la identificación y caracterización de intermedios de plegamiento en diferentes proteínas (Kim, 1990).

Las tres principales etapas del plegamiento que se han revelado en los estudios experimentales son las siguientes (Ptitsyn, 1992):

- formación muy rápida (~ 10 ms) de gran cantidad de estructura secundaria,
- colapso rápido (~ 1 s) en una forma globular condensada con alto contenido de estructura secundaria, sin estructura terciaria definida y con un núcleo apolar accesible al disolvente, intermedio denominado glóbulo fundido por su naturaleza estructural fluctuante (Ptitsyn, 1987),
- formación de la estructura nativa, funcional, con estructura fija y núcleo apolar fuertemente empaquetado.

Probablemente uno de los puntos más oscuros y controvertidos es el **inicio del plegamiento**. Estudios de simulación del proceso de plegamiento y el limitado éxito de los algoritmos de predicción de estructura secundaria basados en estadísticas de correlación aminoácido-estructura en proteínas, han llevado a proponer que las interacciones locales no son importantes y que la estructura secundaria se forma como consecuencia del colapso hidrofóbico de la cadena (Dill, 1990). Esta teoría no explica satisfactoriamente cómo una interacción tan inespecífica como la hidrofóbica puede llevar a la adquisición rápida de una estructura única.

El problema es que una caracterización estructural detallada de lo que ocurre en los primeros milisegundos del plegamiento de la proteína no es posible con el estado actual de las técnicas experimentales disponibles. Las técnicas de flujo detenido más modernas tienen un tiempo muerto de alrededor de 4ms tiempo suficiente para que algunas proteínas adopten una estructura condensada con alto contenido de estructura secundaria (Chaffotte, 1992). Es necesario, pues, intentar reproducir las condiciones del inicio del plegamiento para poder estudiar la estructura de la cadena en el equilibrio.

Estudio conformacional de péptidos aislados.

El interés por el estudio conformacional de péptidos ha aumentado enormemente en los últimos años debido a su utilidad para identificar y caracterizar las estructuras transitorias que, probablemente, inician el plegamiento (Baldwin, 1986; Wright, 1988), intermedios difíciles de caracterizar en la proteína completa. Esta es, probablemente, la

mejor aproximación al estudio del estado desplegado de la proteína en condiciones de plegamiento, en donde sólo interacciones de corto y medio alcance son posibles.

En relación con este tipo de estudios cabe plantearse dos cuestiones. Una es si se pueden extrapolar los resultados a la proteína completa, es decir, si la estructura adoptada por el péptido aislado es representativa de la que adquiere en la cadena completa y, por tanto, si se puede considerar un intermedio de la ruta de plegamiento. Si la estructura es **similar a la nativa**, esto sugiere inmediatamente que el intermedio está en la ruta de plegamiento. La otra se refiere a la relevancia de su papel como centro de inicio del plegamiento. Cualquier péptido en disolución puede adoptar una conformación de, por ejemplo, hélice en una escala de tiempos de microsegundos (Hammes, 1969) pero la pierde con la misma rapidez, ¿en qué medida debe ser estable la hélice para ser significativa?. No es posible, por el momento, establecer un umbral, sin embargo el hecho de que no todos los péptidos adquieran conformaciones plegadas suficientemente pobladas para ser detectadas con las técnicas en uso, permite pensar que si se observa, la conformación plegada es significativa en cuanto al plegamiento, aunque esté en equilibrio rápido con otras.

El primer péptido que se identificó como capaz de plegarse independientemente del resto de la proteína fue el C-péptido de la ribonucleasa A de páncreas bovino (residuos 1-13), estudiado por Brown y Klee en 1971. Este péptido en disolución acuosa, a baja temperatura, forma una hélice α entre los residuos 3-13, los mismos que forman la hélice en la estructura de la proteína, y ha sido extensamente estudiado (Bierzynski, 1982; Rico, 1983). El S-péptido (residuos 1-19) forma una hélice entre los mismos residuos quedando el extremo C-terminal (residuos 14-19) en conformación extendida (Nieto, 1983). Estos resultados demuestran no sólo que el péptido aislado adquiere la misma estructura de hélice que tiene en la proteína completa, sino que ésta se circunscribe a los mismos residuos.

Los resultados obtenidos con el fragmento N-terminal de la ribonucleasa A abrieron la vía para posteriores estudios de la estabilidad de conformaciones en hélice α en otras secuencias helicoidales de proteínas. Estudios sistemáticos se han llevado a cabo en las otras dos hélices de ribonucleasa A (Jiménez, 1987 y 1988), en lisozima (Segawa, 1991), miohemeritina (Dyson, 1992) y el dominio C-terminal de la termolisina (Jiménez, 1992) con el mismo resultado: las secuencias correspondientes a hélices en proteína, y no otras, adquieren preferentemente una conformación de hélice. Esto indica que las interacciones locales actúan desde el principio, y permiten proponer que las secuencias en hélice son centros de inicio del plegamiento.

Un estudio del mismo tipo se ha llevado a cabo recientemente en una proteína con gran proporción de estructura secundaria de tipo lámina β , la plastocianina (Dyson, 1992). La mayoría de los péptidos no mostraban preferencias conformacionales significativas adoptando, mayoritariamente, conformaciones extendidas en equilibrio rápido entre sí, comportamiento típico de péptidos sin estructura. Muchos de los péptidos, especialmente aquellos que abarcaban dos hebras de lámina β y su conexión, eran muy poco solubles. Este es un problema muy común en este tipo de péptidos, la tendencia a formar agregados inespecíficos (probablemente láminas β intermoleculares) donde las interacciones intermoleculares dominan o se superponen a las intramoleculares (Mattice, 1989). Hasta el momento no se ha podido encontrar un péptido que forme una lámina β intramolecular aislada en disolución acuosa. Esto podría indicar que las láminas β surgen como consecuencia de interacciones de largo alcance en la forma condensada de la proteína o que su formación está dirigida por otros elementos de estructura secundaria, como los giros β en el caso de las antiparalelas.

Importancia de los giros β .

Los giros β son los elementos estructurales más comunes que invierten la orientación espacial de la cadena polipeptídica (descritos por primera vez por Geddes, 1968, y definidos por Venkatachalam, 1968). El resto de los segmentos de la cadena con topología similar forman un conjunto muy heterogéneo de geometría y longitud muy diversa, lo que ha complicado su análisis y estudio (Leszczynski, 1986; Ring, 1992). Las estructuras de tipo giro β típicas están formadas por cuatro aminoácidos y, con frecuencia, el grupo amida del cuarto residuo forma un puente de hidrógeno con el grupo carbonilo del primero. Los ángulos diedros de los residuos centrales definen la geometría del giro y se han utilizado como criterio de clasificación, entre otros, de los distintos tipos encontrados en proteínas (Richardson, 1981).

Alrededor de un tercio de los residuos en proteínas globulares están implicados en giros β , conectando otros elementos de estructura secundaria lineales como hélices α y láminas β , confiriendo así globularidad a la proteína. En los giros β abundan los residuos con cadenas polares, lo que parece estar asociado con su capacidad para interactuar con el esqueleto peptídico formando puentes de hidrógeno, y generalmente se encuentran en la superficie de la proteína. Estas características están de acuerdo con la observación de que los giros actúan frecuentemente como sitios de unión con receptores, de reconocimiento de anticuerpos y de modificación postraduccional aunque no está claro si esto se debe a sus propiedades estructurales o a su localización en la superficie. También

se ha relacionado la actividad biológica de péptidos naturales con la formación de giros. La gran cantidad de trabajos relacionados con todos estos aspectos ha sido extensamente revisada (Rose, 1985).

Los estudios estadísticos de giros en las proteínas de estructura conocida han puesto de manifiesto no sólo la gran frecuencia con que aparecen ciertos residuos sino también que existen fuertes preferencias posicionales para algunos de ellos (Chou, 1978; Wilmot, 1988). A partir de estos resultados se pueden deducir algunas características importantes para la formación de los giros. Por ejemplo, es fácil de racionalizar la gran preferencia de los residuos de prolina por aparecer en la segunda posición del giro por la restricción conformacional que su cadena lateral cíclica impone en el enlace peptídico precedente. El estudio sistemático de los puentes de hidrógeno en proteínas globulares, indica que las cadenas laterales de aminoácidos polares pueden formar puentes de hidrógeno con el esqueleto y esta capacidad se puede relacionar con ciertas preferencias posicionales de los giros (Wilmot, 1988).

El posible papel de los giros en el inicio del plegamiento de la proteína es una cuestión abierta. Por un lado se ha considerado que son elementos pasivos y que se forman como consecuencia de interacciones de largo alcance (Rose, 1976). Por otro, se ha postulado que los giros tienen un papel activo en el plegamiento aproximando zonas distantes de la cadena y promoviendo de este modo interacciones terciarias (Lewis, 1971). Estudios de simulación del plegamiento indican que pequeñas tendencias a formar giros β en las zonas que tienen esta estructura en la proteína completa son esenciales para su plegamiento correcto, y además, son las primeras estructuras secundarias persistentes formadas (Skolnick, 1990). Por otro lado estudios teóricos sugieren que los giros en dipéptidos en disolución acuosa son intrínsecamente inestables (Tobias, 1990). Es necesario, pues, llevar a cabo estudios experimentales para aclarar esta cuestión.

La mayor parte del trabajo experimental realizado hasta ahora se ha llevado a cabo con péptidos cíclicos para reducir la flexibilidad de la molécula y llevar a cabo un estudio estructural detallado. Estos estudios han proporcionado información valiosa acerca de la influencia de los aminoácidos en la geometría del giro, sin embargo, no proporcionan evidencia de su importancia en plegamiento, ya que la restricción impuesta por el ciclo puede distorsionar las tendencias conformacionales de las secuencias (Smith, 1980).

Existen unos pocos casos de péptidos lineales de corta longitud que forman estructuras de tipo giros β aislados en disolución acuosa. El estudio más completo ha sido realizado por Wright y col. con péptidos derivados de un epítipo inmunogénico de la proteína hemaglutinina del virus de la gripe (Dyson, 1988). Cuarenta y cinco penta y hexapéptidos lineales, todos ellos conteniendo prolina en la secuencia, fueron estudiados

encontrándose diferentes poblaciones de giro β en disolución acuosa, hasta un 50% en la secuencia H-Tyr-Pro-Gly-Asp-Val-OH, con los cuatro primeros residuos formando un giro β de tipo II. En pentapéptidos de secuencia H-Tyr-Pro-Xaa-Asp-Val-OH encontraron que la población de giro β se podía correlacionar con la probabilidad de estar en giro del residuo Xaa obtenidas del análisis estadístico de proteínas. Estos resultados indican que la formación del giro β está determinada por la secuencia local y, por tanto, que cabe esperar que estén presentes en las primeras etapas del plegamiento. Sin embargo, en la proteína nativa la secuencia no forma un giro β sino que está en una hélice α . Esto no excluye que los giros β sean importantes para el plegamiento, ya que las estructuras iniciales pueden transformarse en etapas posteriores, sin embargo resta apoyo a esta importante conclusión. Evidencia experimental concluyente de la formación de giros β en otros péptidos lineales de corta longitud (≤ 15 residuos) en agua, ha sido obtenida en pocos casos más (Dyson, 1988; Reed, 1988; Stroup, 1990; Mayo, 1991), en todos ellos la estructura en la proteína nativa es desconocida, y la gran mayoría posee prolina en la secuencia.

Objetivos.

El principal objetivo de esta tesis ha sido comprobar si los giros β pueden tener un papel relevante en el plegamiento de la cadena polipeptídica. El mejor indicio de que ello es así es comprobar si las secuencias que están en giros β en la proteína son capaces de formar estructuras similares a la nativa cuando están aisladas en disolución acuosa. Este planteamiento es una consecuencia lógica de los resultados obtenidos con las secuencias en hélice que han demostrado su capacidad para actuar como centros de inicio del plegamiento.

Relacionados con esta cuestión están los objetivos de explorar los requerimientos de secuencia que contribuyen a la estabilidad del giro en los péptidos aislados y la capacidad de estas estructuras para dirigir o estabilizar la formación de estructuras más complejas como las horquillas β , formadas por dos hebras de lámina β conectadas por un giro β .

Para alcanzar estos objetivos se han seleccionado fragmentos de proteínas que forman giros β en la estructura nativa, incluyendo también residuos contiguos que forman una lámina β . En algunos de ellos se han modificado las secuencias nativas con el fin de comprobar su efecto sobre la estabilidad de las estructuras detectadas. Los resultados de este estudio se describen en el capítulo 3. En la elección de los fragmentos se ha hecho uso, principalmente, de la información estructural disponible sobre la proteína nativa, en

particular de su estabilidad y de la regularidad de las estructuras secundarias. En algunas de ellas se han incluido o excluido interacciones de largo alcance, como puentes disulfuro, de tal forma que se pueda obtener información acerca de la importancia relativa de las interacciones locales y las terciarias en la formación de la estructura nativa. En concreto, los fragmentos seleccionados son los siguientes;

- fragmento 12-26 del "Tendamistat", que forma una horquilla β con un giro entre los residuos 17-20, y de la que se ha excluido el puente disulfuro entre las cisteínas 11 y 27; esta estructura está muy bien definida en la estructura tridimensional determinada por resonancia magnética nuclear (Kline, 1986)

- fragmento 35-44 del "Tendamistat", con una estructura similar a la del fragmento 12-26 (Kline, 1986),

- fragmento 2-19 del dominio de unión de la proteína G a la región Fc de inmunoglobulina G, que forma una estructura de horquilla β con un giro β de tipo I entre los residuos 9-12. Este dominio tiene una gran estabilidad térmica a pesar de su pequeño tamaño (56 residuos), (Gronenborn, 1991)

- fragmento 63-74 de ribonucleasa A de páncreas bovino, que forma un giro de tipo I entre los residuos 65-68 (González, 1991),

- fragmento 245-260 de termolisina, que forma un lazo de tipo Ω entre los residuos 248-255 (Leszczynski, 1986).

En el capítulo 4 se exponen los resultados obtenidos en péptidos con secuencias diseñadas para obtener giros β suficientemente estables para que sean capaces de estabilizar estructuras de lámina β antiparalela. Para el diseño se ha hecho uso de los resultados de estudios estadísticos que correlacionan secuencia y estructura. Las secuencias diseñadas son las siguientes:

- Ac-LKLKLGDSLKLLKLNH₂, en la que los residuos centrales se han encontrado un gran número de veces en giros β de proteínas (Rooman, 1988), y las secuencias alternantes de residuos hidrofílicos-hidrofóbicos favorecen, en principio, la formación de láminas β (Richardson, 1987, Barbier, 1989),

- YQNPDGSQA, en la que los residuos centrales del fragmento 15-23 del "Tendamistat", donde se forma el giro nativo, se han reemplazado por los aminoácidos de máxima probabilidad de ocupar cada una de las cuatro posiciones de un giro β en proteínas (Chou, 1978; Wilmot, 1988).

Los péptidos se han estudiado en disolución acuosa por medio de espectroscopía de dicroísmo circular y espectrometría de resonancia magnética nuclear de protón. Prácticamente toda la información de interés estructural se ha obtenido a partir de los resultados obtenidos del estudio por RMN gracias a su gran poder de resolución que permite detectar conformaciones plegadas poco pobladas y caracterizarlas con detalle a nivel de residuos concretos. La información acerca de la proximidad espacial de los protones de la molécula obtenida a partir de experimentos de RMN bidimensional de tipo NOESY y ROESY ha sido la más definitiva para la caracterización estructural de los péptidos, y se ha apoyado con la cuantificación de los efectos nucleares Overhauser (NOEs) y otros parámetros espectrales, especialmente los desplazamientos químicos y los coeficientes de temperatura de las señales de los protones amida y su variación en presencia de urea. La utilidad del análisis conjunto de los espectros NOESY y ROESY se ha puesto de manifiesto durante el trabajo desarrollado en esta tesis.

Obviamente la hipótesis de partida de este trabajo ha sido que si las secuencias en hélice de proteínas son intermedios del proceso de plegamiento, no había una razón clara para excluir un comportamiento similar en el caso de los giros β . Los resultados obtenidos en esta tesis permiten concluir que las estructuras de tipo giro β presentes en las proteínas, se mantienen aunque con estabilidad muy reducida, en las secuencias aisladas, y que la información para su plegamiento está en la secuencia local aunque los residuos más próximos, contiguos al giro, son importantes para su estabilidad. Se ha comprobado además, que los giros β son capaces de dirigir la formación de estructuras más complejas, como las horquillas β , con lo cual es posible proponer que estos elementos estructurales tan simples tengan un papel activo en el inicio del plegamiento de la cadena polipeptídica.

Capítulo 2.
Métodos y materiales.

2.1. METODOS.

Técnicas de estudio conformacional de péptidos.

Existen varios métodos que proporcionan información acerca de la conformación de péptidos. El más definitivo es la difracción de rayos X, que sin embargo tiene el grave inconveniente de que la conformación del péptido está en gran parte determinada por las interacciones intermoleculares en el cristal, y puede ser muy diferente de la conformación preferente en disolución. En cuanto a la detección de estructuras plegadas que puedan representar intermedios de plegamiento de proteínas, la estructura en disolución acuosa debe ser el objeto de estudio.

El dicroísmo circular (CD) es muy sensible a la conformación y es la técnica más comúnmente empleada para péptidos en disolución. Sin embargo el espectro DC en la zona del enlace peptídico está compuesto por varias bandas anchas que solapan, haciendo muy difícil una interpretación detallada del mismo, especialmente cuando el estado conformacional del péptido es heterogéneo. Además, diferentes estructuras pueden dar espectros muy parecidos, las distorsiones estructurales afectan al espectro y otros cromóforos como los grupos aromáticos y los puentes disulfuro contribuyen al espectro en el ultravioleta lejano (Woody, 1985). El DC es muy útil para detectar conformaciones en hélice α , que dan lugar a un espectro muy característico, cuando la población no es demasiado pequeña. En el caso de los giros β , no hay un único espectro de referencia aunque se han propuesto varios (Rose, 1985; Perczel, 1991).

La espectroscopía de infrarrojo (IR) puede ser especialmente útil en la detección de puentes de hidrógeno pero tiene los mismos inconvenientes que el DC. Además, estas dos técnicas dan información acerca de la estructura global puesto que la anchura y solapamiento de las bandas no permiten diferenciar las correspondientes a los aminoácidos o enlaces individuales.

La espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN) es, con diferencia, la técnica más apropiada para el estudio experimental de la conformación de péptidos en disolución. La RMN proporciona información acerca de los entornos químicos, relaciones geométricas, distancias y dinámica de los núcleos individuales, con lo que se pueden estudiar las propiedades estructurales a nivel de residuo. La interpretación de los datos de RMN en péptidos debe hacerse con precaución puesto que es un método más lento que las espectroscopías ópticas, con una escala de tiempos del orden del segundo, de aquí que la interconversión de los conformeros que no implican rotaciones del enlace peptídico conduzca a parámetros espectrales promediados.

En el trabajo de esta tesis se han registrado espectros de DC de la mayoría de los péptidos como complemento o como guía para el análisis por RMN, pero han resultado poco útiles, en general, para su caracterización estructural.

Resonancia magnética nuclear.

El protón es el núcleo que proporciona mayor sensibilidad debido a su abundancia natural y a su constante giromagnética. Esta propiedad, junto con su ubicuidad en polipéptidos, hace que sea la mejor sonda para su estudio estructural. Todo el análisis conformacional por RMN de los péptidos estudiados en esta tesis se ha realizado con espectros de protón.

Parámetros espectrales con información estructural.

Hay varios parámetros espectrales que reflejan tanto la estructura covalente como la conformación de la molécula. En el caso del estudio conformacional de péptidos en disolución, los más importantes, y los que se han medido en esta tesis, son los siguientes:

- los **desplazamientos químicos** (δ) de las resonancias dependen del entorno químico de los núcleos, y por tanto son sensibles a la conformación de la molécula. Sin embargo hay que tener en cuenta que existe un efecto de secuencia en los valores de δ , independiente de la conformación, que puede enmascarar el debido a la estructura cuando la población de ésta es muy pequeña. Como referencia se utilizan los desplazamientos químicos medidos en tetrapéptidos del tipo H-Gly-Gly-Xaa-Ala-OH, donde Xaa es uno de los 20 aminoácidos naturales. Los desplazamientos químicos del residuo central, Xaa, proporcionan una estimación de los valores esperados en ausencia de estructura (Bundi, 1979). Las diferencias entre los desplazamientos químicos medidos en la proteína y los valores de referencia de los tetrapéptidos cuando se representan en función de la secuencia, dan información acerca de la localización de los elementos de estructura secundaria en la cadena polipeptídica (siendo $\Delta\delta$ negativo en hélices y giros β , y positivo en láminas (Williamson, 1990).

- las **constantes de acoplamiento** (J) entre las resonancias dependen de la geometría de los enlaces, en particular la constante $^3J_{\text{NH-H}\alpha}$ se puede relacionar con el ángulo ϕ del esqueleto (Karplus, 1959), sin embargo el promediado conformal hace que sus valores sean de poca utilidad cuando la estructura plegada está poco poblada. Aunque

estas constantes se han medido para todos los péptidos estudiados no han servido como fuente de información estructural.

- los **coeficientes de temperatura** ($\alpha = \Delta\delta/\Delta T$) de las resonancias de los protones amida se utilizan habitualmente como medida de la accesibilidad del protón al disolvente. Una variación pequeña de la frecuencia de resonancia con la temperatura puede ser un indicio de que el NH está implicado en un puente de hidrógeno intramolecular. La interpretación de estos coeficientes, sin embargo, no es unívoca; normalmente no es posible asignar con seguridad que una accesibilidad reducida al disolvente proviene de un puente de hidrógeno intramolecular. Además, los cambios de temperatura puede variar la orientación de grupos magnéticamente anisótropicos, como las cadenas laterales de los residuos aromáticos, lo cual puede afectar a los desplazamientos químicos de los protones amida y, por tanto, a sus coeficientes de temperatura. Por otro lado, no existen valores absolutos de referencia para estos coeficientes por debajo de los cuales la inaccesibilidad de los protones pueda considerarse inequívoca (Smith, 1980). Estos coeficientes se han medido para algunos de los tetrapéptidos de secuencia GGXA y se ha encontrado un rango entre -5.8 y -9.1ppb/K en disolución acuosa (Jiménez, 1986) que puede considerarse como típico de péptidos con conformaciones al azar. A pesar de estos inconvenientes, estos parámetros se han revelado muy útiles en la práctica para detectar e identificar formas plegadas en péptidos lineales, especialmente de estructuras de tipo giro β (Dyson, 1988).

- el **efecto Overhauser nuclear** (NOE), por el cual se transfiere magnetización entre núcleos próximos en el espacio, proporciona información acerca de las distancias entre los protones del péptido. La simple presencia de un NOE directo entre dos protones, implica la existencia de una cierta población de estructuras en las que éstos se encuentran a menos de 4.5Å, distancia por encima de la cual el NOE no es observable (Anil Kumar, 1981). La gran ventaja del NOE es que, mientras los restantes parámetros espectrales se promedian linealmente sobre las distintas conformaciones en equilibrio, su dependencia con la distancia interprotónica (r) es extremadamente no lineal ($I_{\text{NOE}} \propto 1/r^6$) y destaca las distancias cortas haciendo posible la detección e identificación de conformaciones preferentes poco pobladas.

Tipos de NOE y estructura secundaria.

La distancia entre protones del esqueleto de la cadena polipeptídica depende únicamente de los ángulos ϕ y ψ (figura 2.1a). Los tipos de NOE observados entre protones de residuos contiguos en la secuencia, tales como NOEs $d_{\alpha N}(i, i+1)$ y

$d_{NN}(i,i+1)$ en la terminología de Wüthrich y col. (1984), dan información acerca de ϕ y ψ y, por tanto, de la conformación del esqueleto. El diagrama de energía potencial de Ramachandran (1966) de la figura 2.1b se puede usar para la interpretación de los NOEs secuenciales. Existen dos mínimos profundos de energía en las zonas β (cadena extendida) y α_R (hélices dextrógiras). El mínimo denominado α_L (hélices levógiras) en la figura, tiene una energía relativamente alta y se encuentra muy poco poblado salvo en caso de péptidos con glicina.

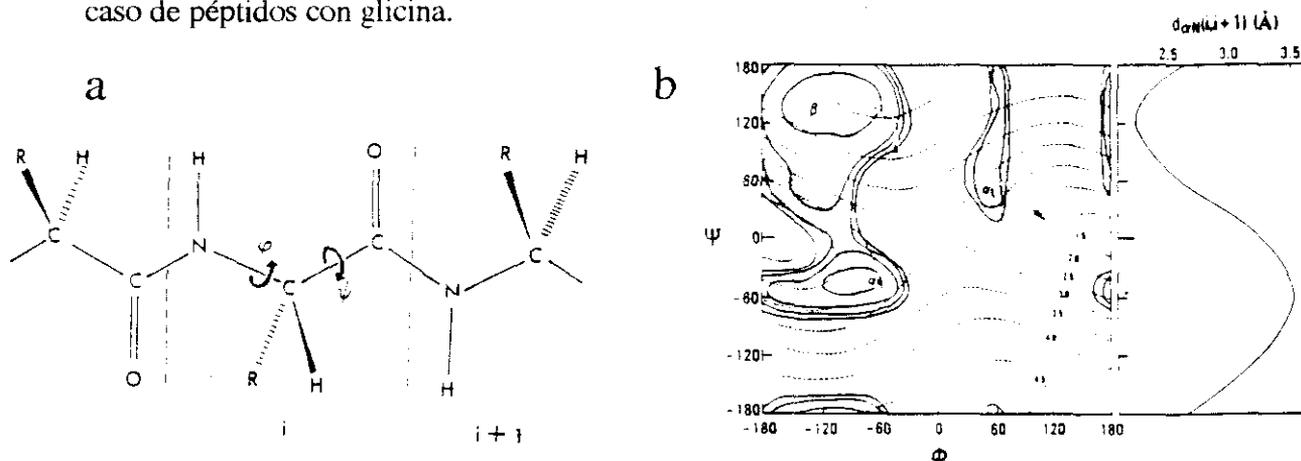


Figura 2.1. a) definición de los ángulos diedros ϕ y ψ ; b) Mapa de energía potencial del dipéptido Ala-Ala, Las líneas continuas indican los contornos de energía dibujados a intervalos de 1Kcal/mol, las líneas discontinuas muestran la dependencia de la distancia $d_{NN}(i,i+1)$, en Å, con los ángulos diedros del enlace peptídico; a la derecha se representa la variación de la distancia $d_{\alpha N}(i,i+1)$ con el ángulo ψ .

Los patrones de NOE que se observan para cada uno de los dos principales mínimos de energía son diferentes. NOEs $d_{\alpha N}(i,i+1)$ intensos en ausencia de NOEs $d_{NN}(i,i+1)$ indican que los ángulos diedros del péptido se encuentran en la región β del espacio conformacional ϕ,ψ . La presencia de NOEs $d_{NN}(i,i+1)$ intensos indica que el péptido adopta conformaciones en la región α_R .

En péptidos lineales de corta longitud en disolución, los NOEs $d_{\alpha N}(i,i+1)$ se observan siempre entre todos los pares de residuos; si la sensibilidad es suficiente, también se pueden detectar todos los NOEs $d_{NN}(i,i+1)$ como se ha puesto de manifiesto muy recientemente (Blanco,manuscrito en preparación). La presencia simultánea de NOEs $d_{\alpha N}(i,i+1)$ intensos y NOEs $d_{NN}(i,i+1)$ débiles es una consecuencia del promediado entre las estructuras del péptido que, sin tener preferencias conformacionales marcadas, muestrea todo el espacio conformacional accesible de acuerdo con las energías y la distribución de estados posibles. La región β , a pesar de tener un mínimo de energía algo superior al de la region α_R , se encuentra mas poblada que ésta al ser más ancho el pozo de potencial.

La presencia de conformaciones plegadas preferentes puede ponerse de manifiesto comparando entre sí las intensidades de los NOEs secuenciales detectados. Como se ve en la tabla I, la relación de intensidades entre los NOEs secuenciales, $I_{NN(i,i+1)}/I_{\alpha N(i,i+1)}$, es mucho mayor en una hélice α que en una lámina β , debido a la diferencia entre las distancias NH-NH y H α -NH secuenciales, que se amplifica en el NOE al depender su intensidad de la inversa de la sexta potencia de la distancia interprotónica. Estas intensidades son, sin embargo, difíciles de medir con precisión, especialmente las de los NOEs $d_{NN(i,i+1)}$ que son débiles en péptidos lineales con conformaciones plegadas poco pobladas. En estos casos puede ser más útil la relación entre las intensidades de los NOEs $d_{\alpha N(i,i+1)}$, secuenciales, y $d_{N\alpha(i,i)}$, intrarresiduo, que también es muy sensible a la conformación (tabla I) y se pueden medir con mayor precisión.

Tabla 2.I. Relaciones de intensidad de los NOEs entre protones del esqueleto en estructuras de lámina β y hélice α regulares.

Estructura	NOE	Distancia (Å)*	Relaciones de intensidad	
			$\frac{I_{NN(i,i+1)}}{I_{\alpha N(i,i+1)}}$	$\frac{I_{N\alpha(i,i)}}{I_{\alpha N(i,i+1)}}$
Lámina β	$d_{\alpha N(i,i+1)}$	2.2	0.02	0.24
	$d_{NN(i,i+1)}$	4.3		
	$d_{N\alpha(i,i)}$	2.8		
Hélice α	$d_{\alpha N(i,i+1)}$	3.5	3.81	4.74
	$d_{NN(i,i+1)}$	2.8		
	$d_{N\alpha(i,i)}$	2.7		

*Wüthrich, (1984)

Los valores dados en la tabla 2.I están calculados en dos puntos concretos del espacio ϕ, ψ , los correspondientes a las estructuras regulares de tipo hélice α y lámina β . Son por tanto valores de referencia extremos. La medida de la relación $I_{NN(i,i+1)}/I_{\alpha N(i,i+1)}$ en un péptido sin preferencias conformacionales nunca será de 0.02, pero estará más cerca de este valor que de 3.81 y se aproximará más a 3.81 cuanto más poblada esté una conformación en la zona α_R .

La información obtenida a partir de las intensidades de los NOEs secuenciales, puede ser la única accesible si hay problemas de sensibilidad en los experimentos, y puede resultar muy útil complementada con otros parámetros, como los coeficientes de temperatura, para detectar formas plegadas. Sin embargo, la identificación del tipo de estructura adoptada preferentemente por el péptido, sólo es posible con la observación de

NOEs específicos de estas estructuras entre protones de residuos no contiguos en la secuencia. Así, la geometría de las hélices α , con 3.6 residuos por vuelta, da lugar a NOEs del tipo $(i,i+3)$ e $(i,i+4)$, mientras que los NOEs $d_{\alpha N}$, d_{NN} , y $d_{\alpha\alpha}$ del tipo (i,j) son característicos de láminas β (siendo i y j residuos de cada una de las hebras de la lámina).

Criterios de detección de giros β .

Los giros β están formados por cuatro residuos contiguos en la secuencia y quedan definidos por los ángulos diedros ϕ_2 , ψ_2 y ϕ_3 , ψ_3 . Los dos tipos de giros β más abundantes en proteínas (tipo I y tipo II) están dibujados en la figura 2.2, donde están marcadas las distancias más útiles para su identificación. El residuo 3 de un giro β de tipo II tiene los ángulos diedros en la región α_L y por ello la mayoría de estos giros tienen glicina en la posición 3. Salvo los giros de tipo VI, que incluyen un residuo de prolina cis en la posición 3, los otros tipos descritos en la bibliografía se pueden considerar como distorsiones más o menos acusadas de estos.

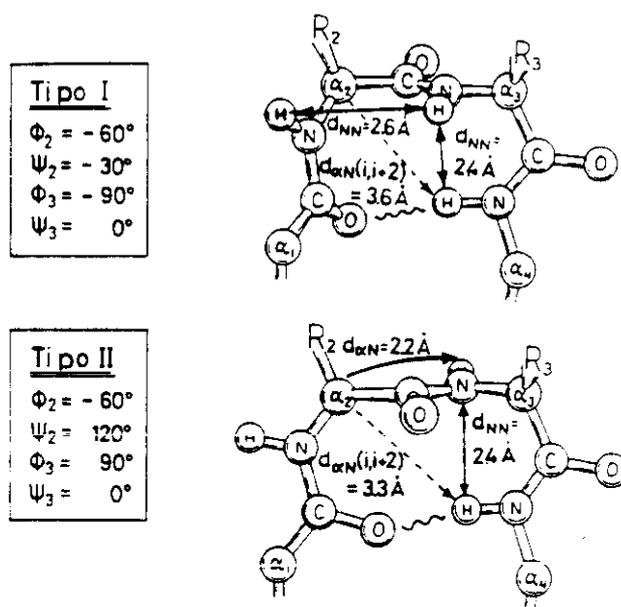


Figura 2.2. Los dos tipos de giros más abundantes en proteínas.

Los criterios que permiten la identificación de un giro β son los siguientes:

- NOEs $d_{NN}(i,i+1)$ entre los residuos 2-3 y 3-4 para giros de tipo I y 2-3 para los de tipo II,
- NOE $d_{\alpha N}(i,i+2)$ entre los residuos 2-4,
- accesibilidad reducida al disolvente del protón NH del residuo 4 (coeficiente de temperatura pequeño, en valor absoluto)

- constantes de acoplamiento $^3J_{\text{NH-H}\alpha}$ apropiadas,
- espectro de DC o IR característico.

Por las razones comentadas más arriba, los criterios más definitivos son los proporcionados por los NOEs $d_{\text{NN}}(i,i+1)$ y $d_{\alpha\text{N}}(i,i+2)$, que pueden complementarse con los restantes, de los cuales los coeficientes de temperatura son los más útiles en la práctica, cuando las poblaciones son bajas.

Los NOEs $d_{\text{NN}}(i,i+1)$ no son específicos de giros β , y también aparecen en hélices α . Los NOEs $d_{\alpha\text{N}}(i,i+2)$, acompañados de NOEs $d_{\alpha\text{N}}(i,i+3)$ más intensos aún que los $(i,i+2)$, pueden aparecer en hélices 3_{10} . Es difícil, pero no imposible, diferenciar estos dos estados conformacionales, una vuelta de hélice 3_{10} ó un giro β , (de hecho son conformacionalmente muy parecidos), especialmente en peptidos flexibles que presentan poblaciones bajas de estructuras. En proteínas con estructura única, el patrón de NOEs permite diferenciar perfectamente entre los tres tipos de estructura secundaria (hélice α , hélice 3_{10} y giro β). Es comunmente aceptado que la presencia sólo de NOEs $d_{\alpha\text{N}}(i,i+2)$ sin estar acompañados por NOEs $d_{\alpha\text{N}}(i,i+3)$ y $d_{\alpha\text{N}}(i,i+4)$, apoya fuertemente la existencia de un giro β en un peptido. Si existe algún protón amida con coeficiente de temperatura bajo, protegido del disolvente, la evidencia es aún más poderosa.

La diferenciación de giros β de tipo I y de tipo II tampoco es posible cuando esta conformación está muy poco poblada. Incluso en pentapéptidos cíclicos se ha podido demostrar que existe un equilibrio rápido entre estructuras de giro β tipo I y tipo II (Stradley, 1990).

Como ya se ha comentado la potencia de la RMN como método de determinación estructural de péptidos y proteínas se debe a la posibilidad de obtener información a nivel de residuo. Para esto es imprescindible la asignación específica de las frecuencias de resonancia (señales del espectro de RMN) a cada protón del péptido.

Asignación del espectro.

Es conveniente comenzar el análisis de un péptido con el registro de un espectro monodimensional del mismo. De esta forma se puede examinar el estado de la muestra en lo que se refiere a la presencia de impurezas, relación señal ruido, agregación e incluso información preliminar acerca de su estado conformacional. La dispersión en frecuencia de las señales de resonancia y el ensanchamiento selectivo de algunas señales con respecto a lo habitual en péptidos flexibles son los primeros indicios de la existencia de formas plegadas que afectan al entorno químico de los protones y reducen la movilidad de la molécula. Algunas señales se pueden asignar directamente a partir del espectro

monodimensional por su intensidad, desplazamiento químico y patrones de acoplamiento escalar.

A medida que aumenta la complejidad de la molécula (el número de aminoácidos en el caso de péptidos) se hace más imprescindible el uso de los experimentos bidimensionales para la asignación completa del espectro. Las técnicas de RMN bidimensional fueron desarrolladas por Ernst y col. en la década de los 70 (Aue, 1976). Todas ellas se basan en el mismo principio, la introducción de un tiempo de evolución (t_1) antes del tiempo de adquisición (t_2) durante el que se registra la respuesta de los núcleos al pulso de radiofrecuencia de medida. En una serie de N experimentos, el tiempo t_1 se va incrementando de modo que cada registro es distinto del anterior debido a la evolución de los espines nucleares durante t_1 . Los datos tienen la forma de una matriz que, después de una transformada de Fourier respecto a t_1 y otra respecto a t_2 , produce un espectro bidimensional. En éste la diagonal es un análogo del espectro monodimensional y la aparición de señales fuera de la diagonal identifican los espines entre los que se han producido transferencias de magnetización durante el tiempo de mezcla (t_m) previo a t_2 . El esquema general de un experimento bidimensional se representa en la figura 2.3.

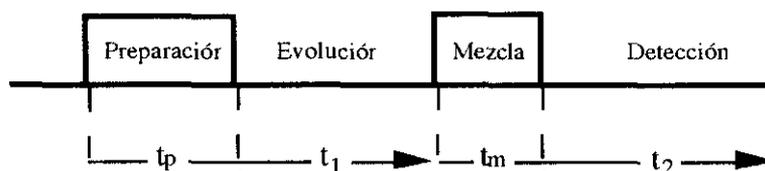


Figura 2.3. Esquema general de un experimento bidimensional.

Lo que diferencia a unos experimentos de otros es el proceso de mezcla que se lleva a cabo por medio de diferentes secuencias de pulsos. Existen actualmente muchos experimentos bidimensionales. Los que se han utilizado para el estudio conformacional de péptidos en esta tesis son los siguientes:

- **COSY** (COrelated SpectroscopY). Fue el primer experimento bidimensional propuesto (Aue, 1976). Es el más simple de todos, y consiste en dos pulsos de radiofrecuencia (figura 2.4). Las señales de correlación de un espectro COSY conectan espines acoplados escalarmente. De esta forma se pueden identificar las señales $NH-H_\alpha$, $H_\alpha-H_\beta$, etc. de un mismo residuo (ya que el acoplamiento entre protones se interrumpe en el grupo carbonilo del enlace peptídico).



Figura 2.4. Esquema de pulsos del experimento COSY.

- **TOCSY** (TOtal Correlated SpectroscopY, Braunschweiler, 1983). Se trata de una modificación del experimento COSY en la que el segundo pulso se sustituye por un tren de pulsos. La magnetización fluye a lo largo de toda la red de acoplamientos y se obtiene un espectro con señales que correlacionan las frecuencias de los espines que pertenecen a una misma red de acoplamientos, con lo que la identificación de todos los protones pertenecientes a un mismo residuo de aminoácido es más inmediata que en el COSY.

- **NOESY** (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY, Macura, 1980). La secuencia de pulsos de este experimento se representa en la figura 5 y consiste en tres pulsos de 90° (ángulo de nutación producido por el pulso en la magnetización macroscópica del sistema) como se ve en la figura 2.5.

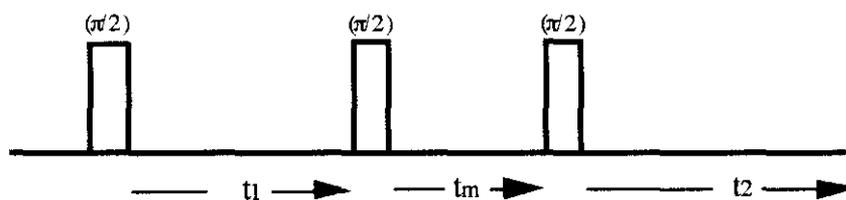


Figura 2.5. Esquema de pulsos del experimento NOESY.

En el espectro NOESY las señales fuera de la diagonal correlacionan protones que están próximos en el espacio ($\leq 4.5\text{\AA}$). De este experimento se extrae información acerca de las distancias interprotónicas que se emplea tanto para la asignación de las resonancias como para el análisis conformacional del péptido.

- **ROESY** (Rotating frame Overhauser Effect SpectroscopY, Bothner-By, 1984; Bax, 1985). Este experimento proporciona una información similar a la del NOESY pero tiene ciertas peculiaridades que se comentarán más abajo. Durante el tiempo de mezcla se aplica a la muestra un pulso largo de radiofrecuencia de menor intensidad que el pulso de preparación. La secuencia de pulsos se puede ver en la figura 2.6.

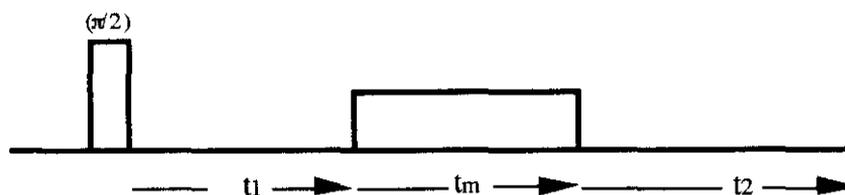


Figura 2.6. Esquema de pulsos del experimento NOESY.

Wüthrich y col. han desarrollado un método estándar para la asignación sistemática de los espectros de RMN de proteínas (Wüthrich, 1982). El primer paso consiste en la identificación de los sistemas de espín correspondientes a cada tipo de aminoácido. Esta identificación se basa en los acoplamientos escalares detectados en los experimentos COSY y TOCSY. En este punto no será posible distinguir todavía residuos con el mismo sistema de espines (aspártico y asparagina, por ejemplo) ni residuos repetidos en la secuencia.

Estas ambigüedades se resuelven en el segundo paso que hace uso de la información de las distancias entre protones obtenida en el experimento NOESY. La información de interés para la asignación proviene de los NOEs entre protones de residuos contiguos en la secuencia. Se ha observado que, independientemente de la estructura de la cadena polipeptídica, siempre existe al menos una distancia secuencial menor de 3Å que da lugar a un NOE intenso (Billeter, 1982). A partir de estas correlaciones es posible establecer el orden secuencial de los sistemas de espín (figura 2.7).

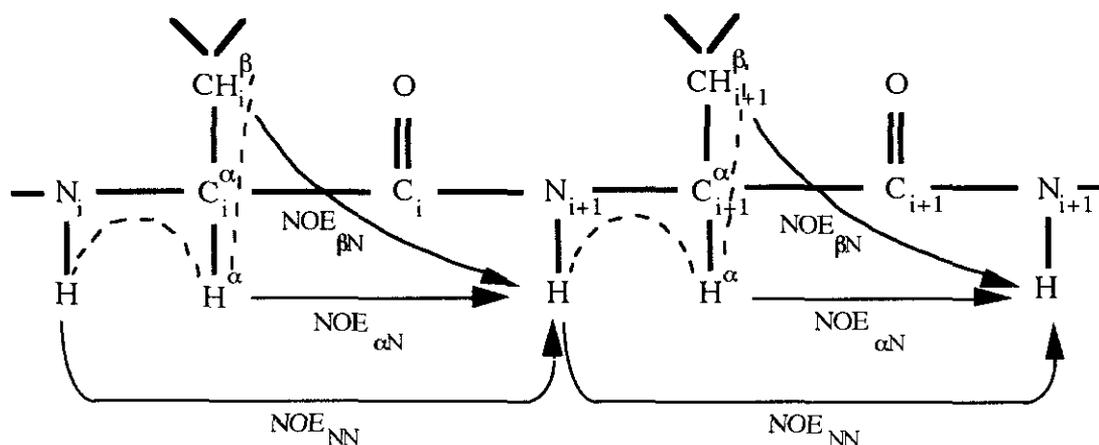


Figura 2.7. NOEs secuenciales (flechas) y correlaciones a través del acoplamiento escalar (líneas de trazos) entre protones de un segmento de cadena polipeptídica.

Experimentos NOESY y ROESY.

El acoplamiento dipolar entre protones cercanos en el espacio es una interacción que afecta a los procesos de relajación de estos núcleos previamente excitados por los pulsos de radiofrecuencia. De esta forma, las poblaciones de sus niveles energéticos se ven modificadas por esta interacción produciéndose una variación en la intensidad de la señal detectada (NOE). La eficiencia de esta relajación cruzada depende, no sólo de la distancia entre núcleos, sino también de la movilidad de la molécula. Esto es debido a que la relajación es un proceso de emisión estimulada por campos locales virtuales creados por la reorientación espacial de los espines de la molécula. Una menor movilidad se traduce en una relajación más efectiva (más rápida) y se manifiesta en una mayor anchura de la señal de RMN.

Para relacionar la movilidad molecular con la relajación resulta muy útil el manejo de un parámetro llamado tiempo de correlación molecular, τ_c . Este parámetro es una constante de tiempo que está inversamente relacionada con la rapidez con que se pierde una orientación molecular dada.

En la figura 2.8a está representada la variación de la intensidad del NOE con el producto $\omega\tau_c$, siendo ω la frecuencia de resonancia del protón, que depende fundamentalmente de la intensidad del campo magnético en el que se encuentra. Para una frecuencia fija se puede ver como al aumentar el tiempo de correlación (disminución de la movilidad molecular) el NOE pasa de ser positivo a negativo y se hace cero cuando $\omega\tau_c=1.12$ (Neuhaus, 1989). El NOE alcanza su máxima intensidad (en valor absoluto) en el régimen de NOEs negativos (es el caso de moléculas muy grandes como las proteínas) y puede llegar a ser del 100%. Las moléculas de pequeño tamaño dan lugar a NOEs positivos debido a su mayor movilidad y, en el peor de los casos, el NOE puede estar tan próximo a cero que no sea detectable. En estos casos se puede aumentar la intensidad de los NOEs trabajando con imanes de campo más intenso o reduciendo la movilidad de la molécula, lo que se consigue al incrementar la viscosidad del medio y al disminuir la temperatura.

Como ejemplo comentaremos uno de los resultados obtenidos en esta tesis. Trabajando a una frecuencia de 600MHz ($H=14$ Teslas), los NOEs de una disolución 5mM de un péptido de 10 aminoácidos en agua a 25° eran negativos, positivos o cero (indistinguibles de ruido) dependiendo de la localización de los protones en la cadena,

reflejo de la distinta movilidad en diferentes partes del péptido. Al bajar la temperatura a 5° todos los NOEs resultaron negativos.

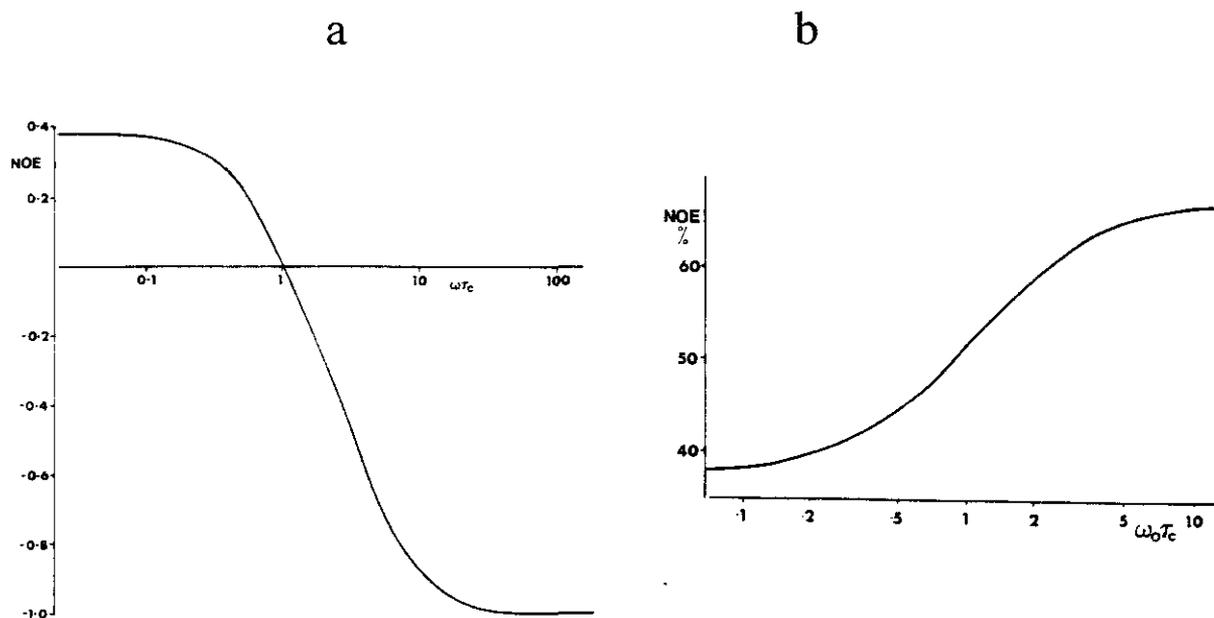


Figura 2.8. Dependencia de la intensidad del NOE con el producto de la frecuencia de resonancia y el tiempo de correlación molecular. a) NOESY; b) .

Aunque los procesos de relajación son los mismos en el NOESY que en el ROESY, la intensidad del NOE en el ROESY tiene una dependencia distinta con la movilidad molecular debido al pulso de radiofrecuencia que actúa sobre los espines durante el tiempo de mezcla. En la figura 2.8b se puede ver la análoga a la figura 2.8a para el ROESY. El NOE es positivo para cualquier valor de $\omega\tau_c$ aunque la intensidad máxima es de un 67.5% (Bothner-By, 1984). Este experimento es el más adecuado cuando las condiciones del experimento son tales que los NOEs son próximos a cero en el NOESY. Para moléculas grandes el NOESY proporciona una mayor sensibilidad por lo que es el comúnmente empleado en el estudio de proteínas.

La sensibilidad de los experimentos NOESY y ROESY en péptidos de pequeño tamaño, como los que son objeto de estudio en esta tesis, es similar. Sin embargo, la información que se obtiene en ambos es complementaria. Esto es debido a que en ambos experimentos pueden aparecer correlaciones entre protones que no son debidas a una corta distancia entre ellos. Estos artefactos no son todos iguales en los dos espectros y gracias a ello es posible su identificación.

Uno de los artefactos más perjudiciales es el que surge como consecuencia del fenómeno de la difusión de espín. Éste consiste en la transferencia de magnetización indirecta entre dos espines que están lejos uno de otro a través de un tercero próximo a

ambos. En la figura 2.9 se representa esta situación. La interacción dipolar directa entre los espines 1 y 3 puede ser muy débil, o inexistente en la práctica, si la distancia entre ellos es menor de 4.5\AA , pero el camino de relajación cruzada 1-2-3 puede ser suficientemente efectivo para dar lugar a un NOE indirecto entre estos dos espines si las distancias 1-2 y 2-3 son cortas y la magnetización transferida es grande.

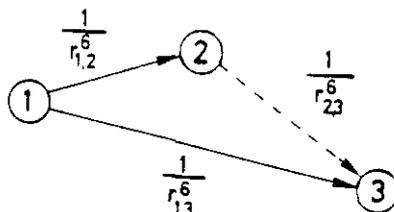


Figura 2.9. *Rutas de relajación cruzada directa (flechas continuas) e indirecta (flecha discontinua) en un sistema de tres espines.*

La difusión de espín aumenta en importancia cuanto más intensos son los NOEs directos, por lo que debe tenerse en cuenta cuando se trabaja con moléculas grandes y espectrómetros de alto campo. En el caso de proteínas y ácidos nucleicos, la difusión de espín puede influir grandemente en las intensidades de los NOEs, pero no afecta a la estructura global determinada a partir de ellos. Normalmente se registran espectros NOESY con tiempos de mezcla cortos para minimizar su contribución.

La presencia de difusión de espín en moléculas más pequeñas como los péptidos de corta longitud, se considera normalmente despreciable debido a que los NOEs son mucho menos intensos que en las proteínas. Sin embargo los errores a que puede dar lugar en la interpretación de los resultados, de estar presente, son mucho más graves ya que los NOEs más importantes para la identificación de conformaciones plegadas (los no secuenciales) son muy débiles y pueden confundirse con NOEs indirectos. La posibilidad de realizar una interpretación errónea es aún mayor en el caso de los giros β ya que su identificación se basa fundamentalmente en la presencia de NOEs del tipo $d_{\alpha N}(i,i+2)$ que son especialmente susceptibles de surgir a través de caminos indirectos del tipo $H_{\alpha}(i)-NH(i+1)-NH(i+2)$ o $H_{\alpha}(i)-H_{\beta}(i)-NH(i+2)$ entre otros.

Para moléculas que se encuentran en el régimen de NOEs negativos en el NOESY ($\omega\tau_c > 1.12$) la difusión de espín se manifiesta de forma diferente en los espectros NOESY y ROESY. Mientras que tanto el NOE directo como el indirecto son del mismo signo en el NOESY (y, por tanto, se suman), en el ROESY el NOE indirecto es de signo diferente por lo que su identificación es inmediata. Además la difusión de espín es mucho menor en el ROESY (Neuhaus, 1989) por lo que la presencia de un NOE en el NOESY que no aparece en el ROESY es un indicio de que el NOE es indirecto.

Existen varias formas de comprobar la autenticidad del NOE, sin embargo, durante los trabajos realizados en esta tesis, se ha podido comprobar que el empleo conjunto de los experimentos NOESY y ROESY es el modo más sencillo y efectivo de no caer en error de evitar errores en la interpretación de un NOE indirecto como una distancia corta entre dos protones. Principalmente por esta razón, se han registrado ambos espectros en todos los péptidos estudiados en esta tesis.

La complementariedad de la información suministrada por el NOESY y el ROESY se puede apreciar claramente en los resultados que se recogen en la figura 2.10a. En ella se representa el crecimiento de la intensidad de algunos de los NOEs observados en los espectros del fragmento 15-23 del tendamistat, cuyo análisis estructural se detalla más adelante, con el tiempo de mezcla. Se observa que los NOEs secuenciales $d_{\alpha N}(15-16)$ y $d_{\alpha N}(19-20)$ son más intensos en el ROESY que en el NOESY, consecuencia de la mayor eficiencia de la relajación cruzada en el ROESY para esta molécula. Esta ganancia en intensidad es mayor en el primero de ellos al ser el extremo del péptido más móvil que el centro. Por el contrario, el NOE $d_{NN}(18-19)$ es menos de la mitad de intenso en el ROESY que en el NOESY a tiempos largos. Esto, junto con la forma sigmoïdal de la curva en el NOESY, indica que este NOE tiene una contribución importante de difusión de espín.

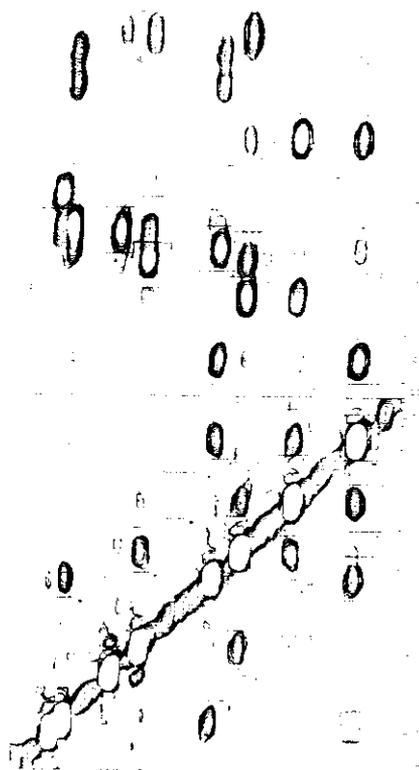
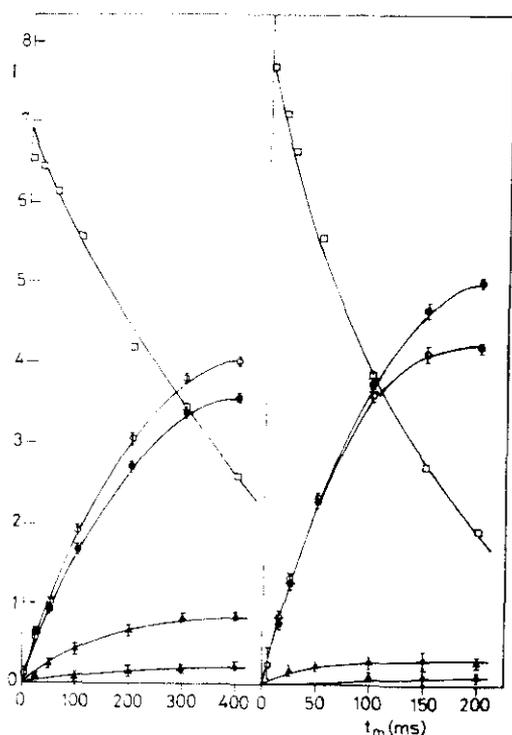


Figura 2.10. a) Curvas de crecimiento de algunos NOEs del fragmento 15-23 del tendamistat en los experimentos NOESY y ROESY; b) NOESY de $t_m=400$ ms.

El NOE no secuencial $d_{\alpha N}(19-21)$, clave para identificar la estructura de tipo giro β en este péptido (ver más adelante) es la mitad de intenso en el ROESY que en el NOESY y corresponde al NOE directo entre estos dos protones.

En el NOESY de $t_m=400$ ms la difusión de espín resulta ya muy importante (figura 2.10b). En él aparecen múltiples NOEs $d_{\alpha N}$ del tipo $(i,i+2)$, $(i,i+3)$, $(i,i-1)$ y $d_{NN}(i,i+2)$ que podrían interpretarse erróneamente como síntomas de la formación de una estructura de hélice α .

Aunque las curvas de la figura 2.10 no han alcanzado todavía su máximo, las intensidades de los NOEs están ya cerca de él en el NOESY de 400ms y en el ROESY de 200ms. La ventaja de usar tiempos de mezcla largos (además de observar NOEs más intensos) es que disminuye la intensidad del pico diagonal. Esto reduce otros artefactos no debidos al experimento (diagonales múltiples y colas bifurcadas originados por inestabilidades en el tiempo del campo magnético y de la electrónica del espectrómetro) que distorsionan las regiones próximas a la diagonal y dificultan el análisis del espectro. Esto no es posible hacerlo en el NOESY por el aumento de la contribución de la difusión de espín pero sí en el ROESY.

El experimento ROESY no está exento de artefactos. En realidad es un experimento muy parecido al TOCSY y se diferencia fundamentalmente en la potencia de la radiofrecuencia aplicada durante el tiempo de mezcla. Se pueden observar picos de correlación entre protones acoplados escalarmente, como en el TOCSY, que son de diferente signo que los NOEs, por lo que es fácil identificarlos. Aunque los NOEs utilizados para la identificación de las formas plegadas se producen entre protones que no están acoplados escalarmente, conviene minimizar las señales de tipo TOCSY utilizando una radiofrecuencia de baja potencia (Farmer, 1987). En esta tesis se registraron espectros ROESY utilizando diferentes potencias y se ha buscado un compromiso entre la reducción de picos de correlación escalar y la observación de los NOEs de interés (cuya intensidad también disminuye al disminuir la potencia).

Cálculo de estructuras.

La información obtenida a partir de los experimentos NOESY y ROESY se ha interpretado de acuerdo con las ideas expuestas más arriba para proponer el tipo de conformación preferente adoptada por el péptido en su caso. El cálculo de una estructura tridimensional no tiene mucho sentido en el caso de péptidos con gran flexibilidad conformacional como es el caso de los estudiados en esta tesis (Dyson, 1988). Sin

embargo puede utilizarse cuando se tiene un conjunto numeroso de NOEs consistentes con una estructura con la precaución de no interpretar ésta como la única conformación existente en el péptido en disolución. Normalmente, éste cálculo añadirá poco más a la información que se obtiene de un examen cualitativo del patrón de NOEs, pero puede resultar muy útil como confirmación de la consistencia de los NOEs no secuenciales observados con una sólo conformación preferente (aunque esté en equilibrio con otras muchas no plegadas). Este tipo de análisis se ha podido llevar a cabo con dos de los péptidos estudiados en esta tesis en los cuales se observó un conjunto considerable de NOEs de este tipo.

Geometría de distancias.

Los primeros métodos que se desarrollaron para convertir la información de restricciones de distancias obtenida de los espectros de RMN en estructuras tridimensionales, fueron métodos basados en la matriz métrica (Havel, 1983). Estos métodos se apoyan en la relación existente entre un conjunto de $3N$ coordenadas en el espacio real y una matriz métrica \mathbf{G} , de dimensión $N \times N$, cuyos elementos están definidos como:

$$G_{ij} \equiv \vec{r}_i \cdot \vec{r}_j \quad [2.1]$$

Esta matriz está directamente relacionada con la matriz de distancias entre los átomos mediante las expresiones:

$$G_{ii} = \frac{1}{N} \sum_j D_{ij}^2 - \frac{1}{2N^2} \sum_{j,k} D_{jk}^2 \quad [2.2]$$

$$G_{ij} = \frac{1}{2} (G_{ii} + G_{jj} - D_{ij}^2) \quad [2.3]$$

Conocida la matriz de distancias, y por tanto, la matriz \mathbf{G} , las coordenadas pueden recuperarse mediante la diagonalización de la matriz métrica.

El método, tal y como aquí se ha expuesto, permite obtener coordenadas a partir de una matriz de distancias ideal, donde todos los términos son conocidos exactamente. Desgraciadamente, éste no es nuestro caso. La información obtenida a partir de los espectros de RMN corresponde sólo a distancias entre protones menores de 4.5 \AA y, además, dichas distancias son aproximadas. Debido a esta incertidumbre, se emplean dos matrices, una con cotas superiores de distancias y otra con cotas inferiores. La matriz

final tiene sus términos elegidos al azar entre estas dos cotas. La matriz de distancias puede completarse con información procedente de la estructura covalente de la molécula pero aún así nunca obtendremos las $N(N-1)/2$ distancias posibles.

Las cotas de la matriz de distancias deben cumplir una serie de desigualdades, gracias a las cuales podemos restringir fuertemente el rango de valores de las distancias desconocidas. Al proceso iterativo por el cual se aplican las desigualdades triangulares a las restricciones superiores e inferiores, se le denomina suavizamiento de la matriz.

El proceso de "suavizamiento" es esencial para que la matriz métrica corresponda a un conjunto de N vectores en el espacio tridimensional. Este hecho no está garantizado para una matriz de distancias aproximada y pueden obtenerse estructuras aberrantes; el éxito de estos cálculos depende esencialmente de la cantidad de información experimental disponible.

Dinámica Molecular.

El método de Dinámica Molecular consiste en integrar numéricamente las ecuaciones de Newton de un sistema de partículas:

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} = - \nabla V(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N) \quad [2.4]$$

donde las posiciones iniciales provienen de una estructura de partida que será la estructura obtenida mediante la geometría de distancias. Las velocidades se toman de una distribución de Maxwell-Boltzman a temperatura T a la que se realiza la simulación.

El potencial utilizado en el caso de simulaciones de biopolímeros es bastante complejo e incluye términos dependientes no sólo de las posiciones relativas de pares de átomos sino de posiciones relativas de tres y hasta cuatro átomos.

Actualmente se utilizan diferentes potenciales que difieren entre sí esencialmente en la parametrización. En general, cuentan con un término de enlace que suele ser armónico:

$$V_b = \sum k_b (b - b_0)^2 \quad [2.5]$$

donde b es la longitud de enlace, b_0 la longitud de enlace en el equilibrio y K_b una constante. K_b y b_0 dependen del tipo de átomos involucrados en el enlace.

Un segundo término es el que mantiene los ángulos de enlace cerca del valor de equilibrio. Es de la forma:

$$V_{\theta} = \sum k_{\theta} (\theta - \theta_0)^2 \quad [2.6]$$

donde θ es el ángulo de enlace y θ_0 el valor de ángulo en el equilibrio. Tanto θ_0 como K_{θ} dependen del tipo de los tres átomos que forman el ángulo de enlace. La suma se extiende a todos los tríos de átomos que forman un ángulo de enlace a lo largo de la molécula.

Otro término introducido es el término de torsión, que depende de las posiciones de los cuatro átomos que definen el ángulo diedro. Este término es necesario para reproducir adecuadamente las barreras de potencial observadas en las rotaciones sobre enlaces simples. Suele ser de la siguiente forma:

$$V_t = \sum k_{\phi} [1 + \cos (n\phi - \delta)] \quad [2.7]$$

donde ϕ es el ángulo diedro de la torsión, n es la multiplicidad de la barrera y δ , la fase. La multiplicidad depende del tipo de átomos que forman el enlace central, puede ser 2, como en el enlace peptídico o 3, como en las cadenas hidrocarbonadas.

Un término similar se introduce para asegurar la planaridad de los enlaces dobles o la correcta quiralidad de centros asimétricos. En este caso, se define una falsa torsión, llamada impropia, entre los átomos enlazados a aquél cuya planaridad o quiralidad se quiere mantener.

Además de éstos, se incluyen términos para representar interacciones de no-enlace. Por un lado se incluye un término de tipo Lennard-Jones, que incluye a su vez dos términos: uno atractivo, de relativamente largo alcance ($\propto r^{-6}$) que da cuenta de la interacción dipolar debida a pequeñas fluctuaciones de carga y otro repulsivo, de menor alcance, ($\propto r^{-12}$), que reproduce el efecto de la repulsión nuclear y del principio de exclusión de Pauli. La otra contribución a las interacciones de no enlace proviene de cargas parciales efectivas en los átomos. El término de interacción de no-enlace toma la forma:

$$V_{L-J} = \sum 4\epsilon \left[\left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{B_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \quad [2.8]$$

Donde la suma debería extenderse a todos los pares de átomos no enlazados o distantes más de dos enlaces entre sí. En la práctica, esto nos daría un enorme número de pares y se eliminan aquellos cuya distancia entre átomos es mayor que una cierta cantidad. En aplicaciones a biopolímeros es habitual considerar sólo interacciones entre átomos distantes menos de 10 Å. El efecto de truncamiento puede minimizarse usando funciones que suavizen el potencial en la zona de corte.

Los parámetros que intervienen en estas expresiones han sido obtenidos o bien, mediante cálculos mecanocuánticos en pequeñas moléculas modelo, o bien, ajustados a datos experimentales procedentes de diferentes fuentes.

La Dinámica Molecular aplicada a proteínas se introdujo inicialmente para el estudio teórico de propiedades dinámicas de estas moléculas pero tiene una gran utilidad para obtener estructuras a partir de datos de RMN. El punto clave de esta aplicación consiste en introducir un término nuevo en el potencial, sin sentido, físico pero que representa la información experimental obtenida. Este término es, típicamente, de la forma:

$$\mathbf{V}_{\text{NOE}} = \left\{ \begin{array}{ll} \sum k_{\text{NOE}} f(d_{ij} - d_{ij}^0) & \text{si } d_{ij} > d_{ij}^0 \\ 0 & \text{si } d_{ij} < d_{ij}^0 \end{array} \right\} \quad [2.9]$$

Con él se penalizan las violaciones de las restricciones de distancias observadas experimentalmente y mantiene los átomos i,j a una distancia de d_{ij}^0 conocida. A la Dinámica Molecular con la inclusión de este término se acostumbra a denominarla Dinámica Molecular Restringida (RMD).

La ventaja de la RMD sobre otros métodos reside en la capacidad de la Dinámica Molecular para saltar barreras de potencial y superar así, en parte, el problema de mínimos locales. La RMD se suele aplicar en combinación con REM (Minimización de Energía Restringida), que consiste en minimizar la estructura sometida al mismo potencial que actuó durante la dinámica. El objetivo de la REM después de un cálculo de RMD o de geometría de distancias, es eliminar la energía cinética introducida en el sistema y obtener una estructura de energía mínima.

2.2. MATERIALES.

Obtención de los péptidos.

Todos los péptidos estudiados fueron suministrados por *Neosystem* (Strasbourg, France), con una pureza >95% estimada a partir del cromatograma de HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia, en sus siglas en la traducción inglesa) de fase inversa. La identidad de los péptidos se comprobó con los espectros de RMN.

En los casos en que fué necesaria una mayor purificación, se realizó por medio de HPLC en fase inversa en un cromatógrafo *Knauer*, usando gradientes de mezclas acetonitrilo (*Scharlau*)/agua (*milli-Q*) con un 0.02% de ácido trifluoroacético (*Merck*).

Dicroísmo Circular.

La concentración de las muestras se midió por la absorción en el ultravioleta (Gill, 1989) de los aminoácidos aromáticos en cubetas de 1cm de paso óptico con un espectrofotómetro *Shimadzu UV 2100*. El ajuste del pH se realizó con la adición de pequeñas cantidades de soluciones concentradas de NaOH (*Scharlau*) y HCl (*Prolabo*). El pH se midió con un electrodo de combinación *Ingold (Wilmad co.)* de 3mm de diámetro.

Los espectros se registraron en dos dicrógrafos, ambos con cámara termostatzada:

-dicrógrafo *Roussel-Jouan CD185* con registro analógico de la señal; se realizó un calibrado previo con ácido (+)canforsulfónico y se emplearon células de 1mm de paso óptico (Centro de Investigaciones Bilógicas del CSIC).

- dicrógrafo *Jobin-Ibon CD6* con registro computerizado con el que se emplearon células de 0.05mm de paso óptico (Instituto Pasteur, París).

Resonancia magnética nuclear.

Las muestras se prepararon disolviendo el péptido en un 90% de H₂O milli-Q hervida y 10% de D₂O (*Cambridge isotopes*). La concentración se estimó por pesada. Cuando fué necesario las muestras se pasaron a través de filtros de 45µm de tamaño de poro (*Millipore*).

El ajuste del pH se realizó como en las muestras para el DC y el pH se midió en el interior del tubo de RMN, de 5mm de diámetro (*Norell*).

Los espectros de RMN se midieron en dos espectrómetros:

- espectrómetro *Bruker WM-360* operando a una frecuencia de 360MHz para el protón

- espectrómetro *Bruker AMX-600* con una intensidad de campo de 14Teslas (600MHz), controlado por un computador *Aspect X32*, que también se utilizó para el procesado de los espectros con el programa *UXNMR* de *Bruker*. Todos los espectros que se muestran en esta tesis se han obtenido con este espectrómetro, instalado en el Instituto de Estructura de la Materia, CSIC.

En ambos espectrómetros se acopló una unidad *Haake* de enfriamiento del aire utilizado para termostatar la muestra de un modo eficiente durante las 8-20 horas de duración de los experimentos bidimensionales.

Los espectros bidimensionales se adquirieron en el modo sensible a la fase según el método TPPI (*Marion*, 1983). Los tamaños de la matriz de datos fueron de 1Kx512 en f1 y f2 respectivamente y se rellenaron de ceros antes de la transformada de Fourier hasta un tamaño final de 2Kx2K. Las funciones de apodización utilizadas fueron del tipo seno cuadrado con desplazamientos de $\pi/2.4$. La línea base del espectro se corrigió con una función polinómica de quinto grado.

Cálculo de estructuras.

Los cálculos de geometría de distancias se llevaron a cabo con los programas *DISGEO* (*Havel*, 1983) y *DIANA* (*Güntert*, 1991).

La dinámica molecular y minimización de energía se realizó con el paquete de programas *GROMOS* (*van Gunsteren*, 19887). Todos los cálculos se llevaron a cabo en un ordenador *CYBER/910*.

Capítulo 3.

Estudio conformacional de fragmentos de proteínas.

3.1. Fragmento 12-26 del tendamistat y péptidos relacionados.

El inhibidor de α -amilasa, tendamistat (Vertesy, 1984) fue de las primeras proteínas cuya estructura tridimensional se determinó por RMN. Estudios simultáneos e independientes se llevaron a cabo por difracción de rayos X (Pflugrath, 1986) y por RMN (Kline, 1986) como test de la compatibilidad de estos dos procedimientos de determinación estructural. Se obtuvo esencialmente la misma estructura, con pequeñas diferencias en la superficie, reflejo de la diferente dinámica de la proteína en disolución y en el cristal (Billeter, 1989).

El tendamistat es una proteína pequeña (74 aminoácidos) con plegamiento del tipo de los barriles β antiparalelos en clave griega (Richardson, 1981), constituido por dos láminas β de tres hebras cada una. Tiene dos puentes disulfuro que conectan hebras de la misma lámina. La estructura tridimensional simplificada se muestra en la figura 3.1.1a.

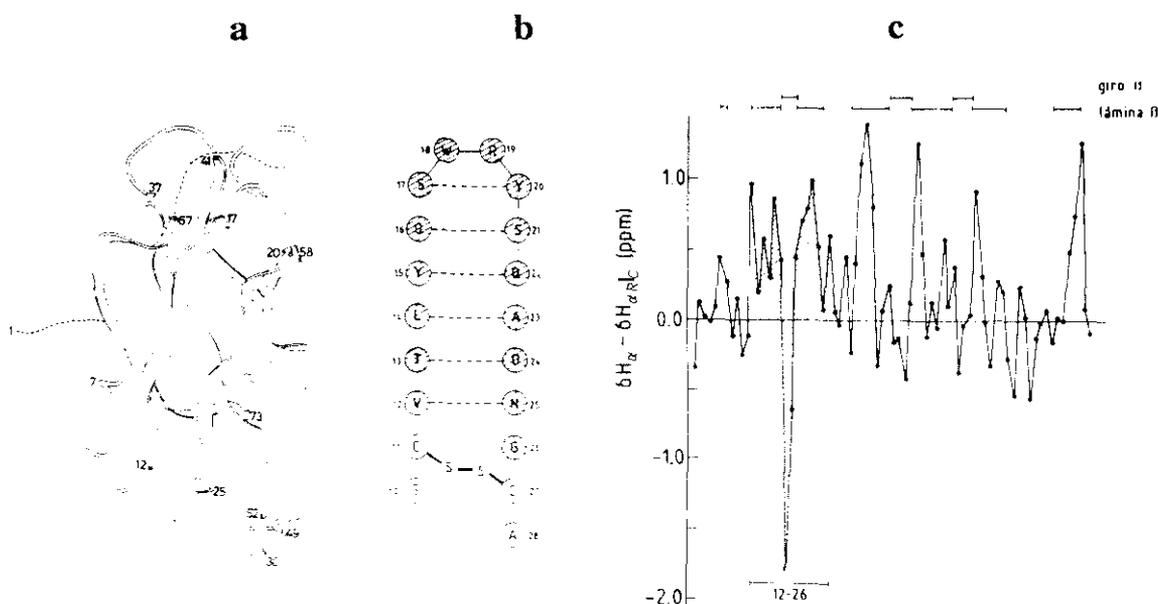


Figura 3.1.1. a) Estructura tridimensional del tendamistat; b) secuencia del segmento 10-28, los residuos rayados son los del fragmento seleccionado para su estudio. c) Perfil de los desplazamientos conformacionales del tendamistat.

A partir de la asignación del espectro de RMN de protón (Kline, 1986) se calcularon los desplazamientos conformacionales de las resonancias de los protones α , (figura 3.1.1c) obtenidos tomando como referencia los desplazamientos químicos de estos protones medidos en los tetrapéptidos modelo de péptidos sin estructura. Las regiones correspondientes a láminas β muestran los típicos valores positivos mientras que las secuencias con estructura de giro β tienen valores negativos (Williamson, 1990). La

región entre los residuos 12-26 forma en la proteína una doble hebra de lámina β con un giro β de tipo I entre los residuos 17 y 20 (estructura denominada comúnmente horquilla β). Esta estructura está especialmente bien definida desde el punto de vista de los desplazamientos conformacionales tanto en la zona de la lámina, como en la del giro, aunque no se puede excluir que la presencia de dos residuos aromáticos en el giro β como el Trp18 y la Tyr20 sean en parte responsables del gran desplazamiento negativo de los protones α del giro. La exploración de estos perfiles en estructuras de este tipo en varias proteínas sugirió que la región 12-26 del tendamistat podría ser un buen modelo para el estudio de la estabilidad de un giro β en un fragmento de proteína aislado. La secuencia de este fragmento se puede ver en la figura 3.1.1b.

El estudio conformacional de este fragmento ofrece la posibilidad de comprobar no sólo la formación del giro β , sino también la de la lámina, lo cual informaría acerca de la importancia de estos dos elementos estructurales en el plegamiento. Además la exclusión de las cisteínas que flanquean a esta secuencia (y, por tanto, del puente disulfuro que une las dos hebras de la lámina) permite sacar conclusiones acerca de si esta interacción terciaria es imprescindible para que la cadena adopte este plegamiento o, por el contrario, la cadena se pliega independientemente del puente disulfuro formándose éste en una etapa posterior del plegamiento como una consecuencia de la preferencia conformacional local de la secuencia.

La secuencia correspondiente al giro β tiene además otras dos características que la hacen particularmente atractiva. Los residuos que forman el giro β se encuentran entre los más conservados en varios inhibidores de α -amilasa microbianos (Hirayama, 1987) y los estudios de modificación química llevados a cabo con un miembro de esta familia, indican que son los responsables de su capacidad inhibidora.

Todas estas características llevaron a seleccionar este péptido como modelo de estructura de giro β . Los resultados obtenidos sugirieron la conveniencia de estudiar péptidos relacionados con éste. En particular se han estudiado también los péptidos correspondientes al fragmento 15-23 y a dos mutantes de éste: [V²¹]15-23 y [S¹⁸]15-23.

Resultados.

Fragmento 12-26.

En la figura 3.1.2 se muestra la zona de los protones amida del espectro del fragmento 12-26.

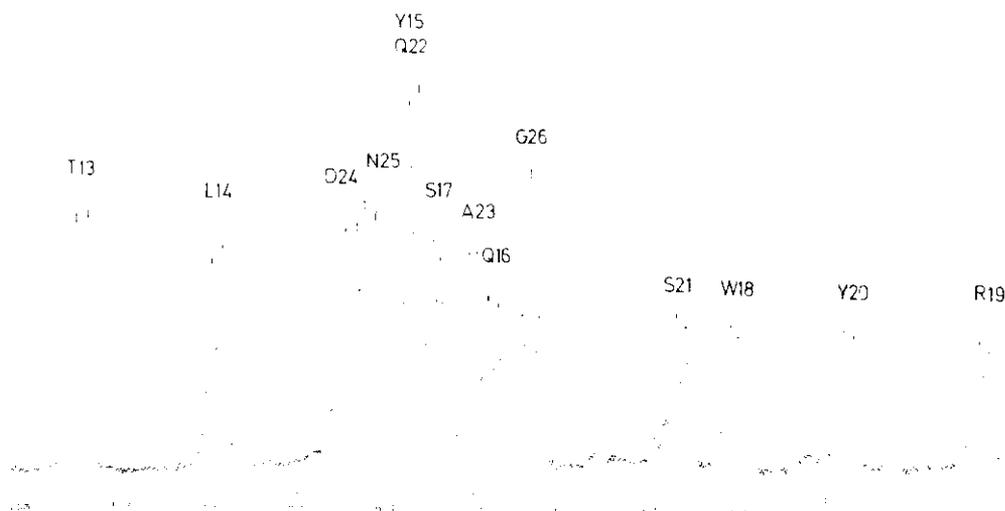


Figura 3.1.2. *Espectro monodimensional del fragmento 12-26. Condiciones: concentración <1mM, pH=3.0, 5°C.*

Se pueden observar algunas impurezas menores a pesar de que el cromatograma de HPLC indica una pureza del 96%. En este espectro se observan algunas características que pueden ser síntomas de la existencia de conformaciones plegadas. Por un lado la dispersión de las señales es bastante mayor de lo que cabría esperar para un péptido con conformaciones al azar, aunque la presencia de tres residuos aromáticos en la secuencia debe contribuir bastante a este efecto. Por otro, ciertos residuos tienen señales más anchas que el resto, especialmente los de la región central del péptido (Trp18-Arg19-Tyr20), mientras que los demás tienen señales estrechas. Este ensanchamiento selectivo de las señales está más de acuerdo con la presencia de conformaciones preferentes en esta región del péptido en intercambio con conformaciones al azar que con una posible agregación inespecífica, que debería producir un ensanchamiento general en todas las señales, además la solubilidad del péptido resultó muy pequeña (<1mM) para los requerimientos de la RMN. Se pudieron obtener espectros bidimensionales pero sólo a pH=3.0 (al aumentar el pH la muestra precipitaba) y a temperatura moderadamente baja (10°C). Esto limitó bastante la sensibilidad de los espectros y la asignación se realizó combinando espectros en agua y en urea 6M donde el péptido es más soluble. Los desplazamientos químicos de las resonancias de protón se encuentran en la tabla I del apéndice. En la figura 3.1.3 se puede ver la asignación del péptido en urea a partir de los experimentos TOCSY y NOESY.

El espectro NOESY en agua (figura 3.1.4) sólo presenta NOEs intrarresiduo y secuenciales del tipo $d\alpha N$ y $dNN(i,i+1)$. Un resumen de los NOEs observados se recoge en la figura 3.1.5. Sin embargo la relación de intensidades entre los NOEs NN y αN secuenciales y entre los αN intrarresiduo y los secuenciales son algo mayores que los

típicos de péptidos sin estructura y disminuyen al añadir urea (Tabla 3.1.I). En la figura 3.1.6 se pueden ver los NOEs NN secuenciales en urea.

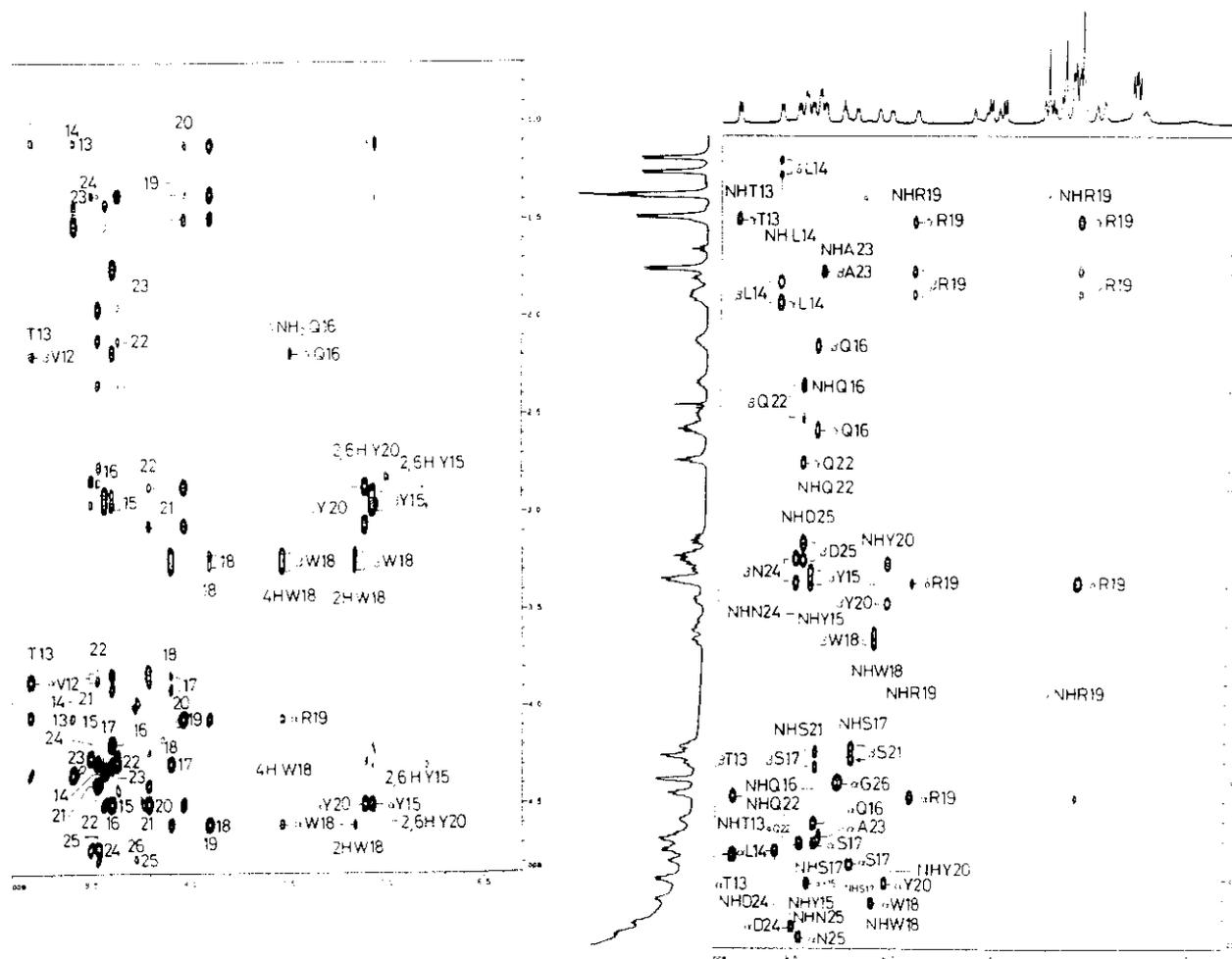


Figura 3.1.3. Asignación del fragmento 12-26, a) TOCSY ; b) NOESY. Condiciones: 1mM, pH=3.0 urea 6M.

Estos resultados indican que el péptido adopta una estructura plegada por su parte central aunque la baja relación señal/ruido impide detectar NOEs no secuenciales por lo que no es posible identificar qué tipo de conformación preferente adopta el péptido.

Tabla 3.1.I. Relación de intensidades de los NOEs entre prones del esqueleto del fragmento 12-26, medidos en el espectros NOESY de 200ms a pH=3.0, 10 °C.

Residuo i	$I_{NN(i,i+1)}/I_{\alpha N(i,i+1)}$		$I_{\alpha N(i,i)}/I_{\alpha N(i,i+1)}$	
	H ₂ O	Urea 6M	H ₂ O	Urea 6M
Tyr15	---	----	0.2	---
Gln16	---	---	0.4	---
Ser17	0.3	0.3	---	---
Trp18	0.3	0.2	0.4	0.4
Arg19	0.6	0.2	0.5	0.3
Tyr20	0.4	0.2	0.3	0.3
Ser21	0.3	0.1	0.8	0.3
Asn25	---	---	---	2.0

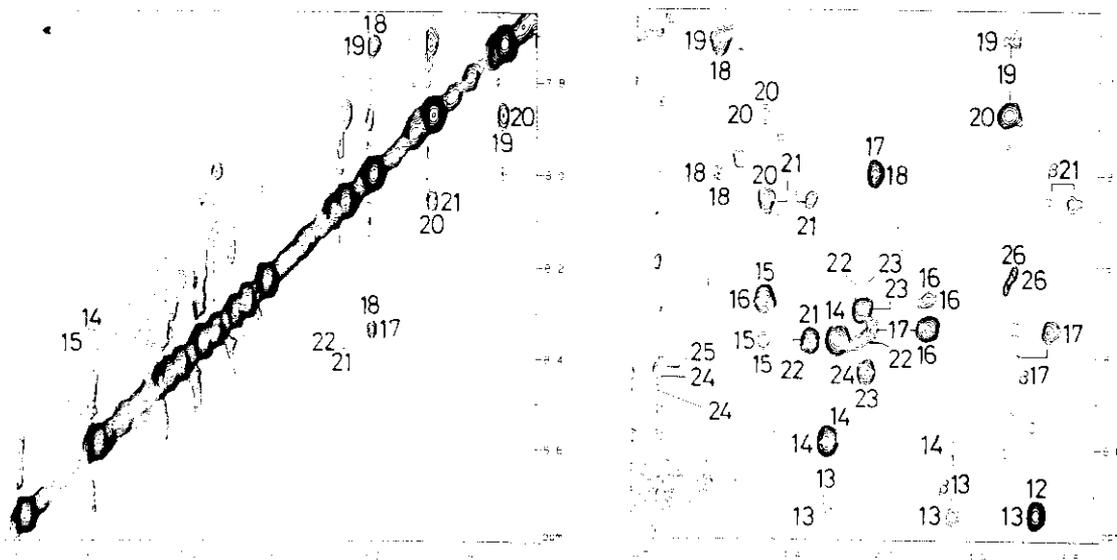


Figura 3.1.4. Espectro NOESY ($t_m=200ms$) del fragmento 12-26. a) Región NH-NH. b) Región H α -NH. Condiciones como en la figura 3.1.2.

Tabla 3.1.II. Coeficientes de temperatura (α , en ppb/K) de los fragmentos del tendamistat en agua y en urea 6M.

Residuo	Fragmento							
	12-26		15-23		[V ²¹]15-23		[S ¹⁸]15-23	
	H ₂ O	Urea	H ₂ O	Urea	H ₂ O	Urea	H ₂ O	Urea
Val12	---	---						
Trh13	-7.8	-7.6						
Leu14	-9.0	-8.7						
Tyr15	-9.0	-10.0	---	---	---	---	---	---
Gln16	-6.8	-6.3	-6.0	-7.1	-6.0	-7.1	-6.0	-7.1
Ser17	-7.8	-8.2	-9.1	-9.1	-9.5	-9.7	-8.6	-8.9
Trp18/Ser18	-4.6	-5.6	-6.6	-7.4	-6.2	-7.4	-7.7	-8.6
Arg19	-2.8	-3.9	-2.9	-5.4	-2.1	-4.9	-6.9	-7.7
Tyr20	-5.2	-6.8	-6.6	-8.3	-6.9	-8.0	-6.9	-7.7
Ser21/Val21	-3.8	-6.1	-4.6	-6.6	-5.9	-7.6	-5.1	-6.9
Gln22	-6.2	-7.4	-6.6	-8.0	-8.5	-8.7	-7.1	-8.3
Ala23	-5.5	-7.1	-7.7	-8.0	-9.9	-10.1	-8.0	-8.6
Asp24	-6.2	-7.1						
Asn25	-5.5	-6.3-						
Gly26	-5.8	-5.3						

El espectro de dicroísmo circular en el UV lejano indica que el péptido es básicamente flexible aunque el hombro a 220nm sugiere que existe una pequeña población de formas plegadas (figura 3.1.7). Al añadir urea este hombro desaparece y una banda positiva a 230nm se hace visible. Espectros registrados en presencia de NaCl 1M y a pH=6.0 no mostraron diferencias significativas. El cambio del espectro con la urea está de acuerdo con los datos de RMN. La causa de la banda a 230nm no está clara, aunque se ha relacionado en otros estudios con contribuciones en esta región del espectro de las cadenas laterales de residuos aromáticos y puentes disulfuro (Woody,1978). Se registró también el espectro de DC en la zona del UV cercano por si fuera posible detectar

bandas de los residuos aromáticos, dado que estos están localizados en la región central, con resultados negativos.

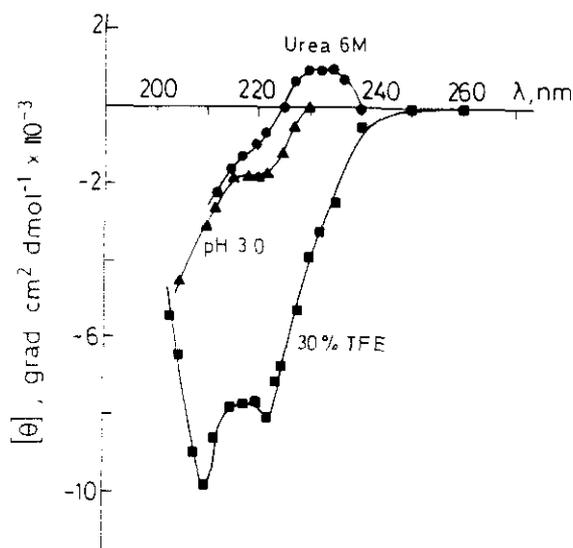


Figura 3.1.7. Espectros de DC del fragmento 12-26 a 5°C.

La baja solubilidad del fragmento 12-26 en disolución acuosa ha impedido la observación de NOEs característicos de los giros β que se forman en su zona central identificados en fragmento 15-23 más soluble. Esto hizo que se intentase estudiar su conformación en medios donde la solubilidad del péptido fuese más favorable. El trifluoroetanol es un disolvente orgánico muy utilizado en estudios conformacionales de péptidos para estabilizar estructuras de hélice α . La gran ventaja de las mezclas H_2O/TFE es que no inducen estructura helicoidal en cualquier péptido sino que la estabilizan cuando la secuencia tiene una tendencia intrínseca a plegarse en hélice (Dyson, 1988) permitiendo de este modo una más detallada caracterización de la estructura. En particular las diferencias en los desplazamientos químicos al añadir TFE a la muestra permiten identificar los residuos que forman la hélice cuando no es posible observar los NOEs de medio alcance $i,i+3$ típicos de hélices (Jiménez, 1987).

El espectro de DC del fragmento 12-26 en disolución acuosa con un 30% de TFE (figura 3.1.7) es típico de una hélice α (~25% de hélice).

En el espectro NOESY se observan NOEs NN secuenciales intensos con respecto a los αN y varios NOEs del tipo $\alpha N(i,i+3)$ y $\alpha\beta(i,i+3)$ típicos de la estructura de hélice α entre los residuos 14 y 23 (figuras 3.1.8a y 9). Un resumen de estos NOEs y los perfiles de los cambios de los desplazamientos químicos con el TFE se muestra en la figura 3.1.8b. Estos perfiles tienen la forma típica de dientes de sierra aunque distorsionada por

la presencia de residuos aromáticos, lo que indica que la hélice está curvada como consecuencia del periodo de alternancia de los residuos hidrofílicos e hidrofóbicos, carácter anfifílico de la secuencia (Bruix, 1990, Jiménez, 1992, Blanco, 1992).

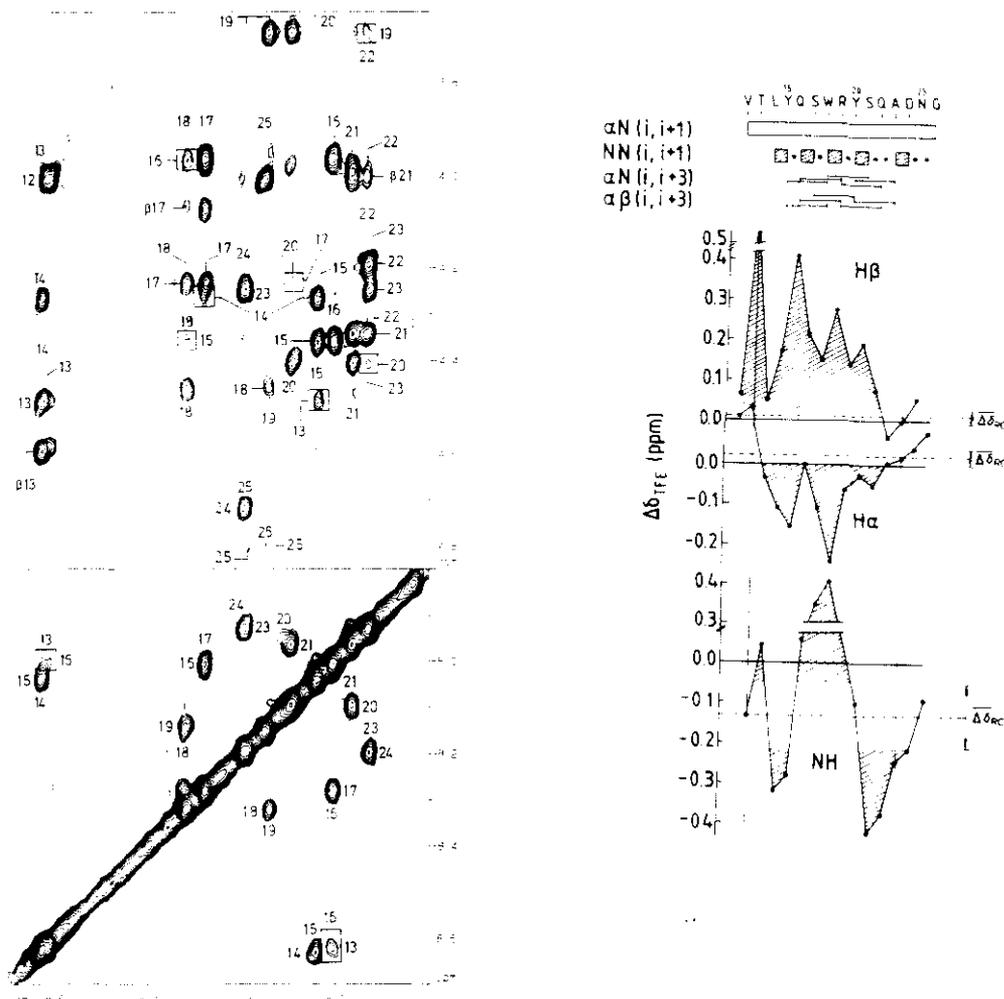


Figura 3.1.8.a) Espectro NOESY ($t_m=200ms$) del gragmento 12-26 1mM pH=3.0 en TFE:H₂O 1:3 (v/v) a 5°C; **b)** Resumen de NOEs y cambios de los desplazamientos químicos con respecto a los medidos en agua pura.

Además de estos NOEs característicos de hélice se pueden observar en el espectro otras señales entre los residuos del extremo N-terminal que no son típicos de hélices. Estos NOEs se listan en la tabla IV y se pueden ver en la figura 3.1.9.

Estos NOEs indican que el extremo N-terminal se pliega sobre la hélice, ya que de otra forma no se explicarían distancias cortas que dieran lugar a NOEs entre los residuos 12 y 17. Con todos los NOEs observados se calcularon dieciseis estructuras por medio DG, RMD y REM. Debido a que la mayoría de los NOEs no secuenciales eran de intensidad débil, las estructuras resultantes tienen una RMSD alta (2.6Å de media para las dieciseis) y la mitad eran hélices levo o irregulares. Las tres hélices dextro con

menores violaciones de NOEs ($>1.2\text{\AA}$) se muestran en la figura 28. En ellas se puede apreciar que el extremo C-terminal no tiene una estructura definida mientras que el extremo N-terminal se pliega hacia la hélice formada entre los residuos 15 y 23 (límites de la hélice según los ángulos diedros Φ, Ψ en estas estructuras).

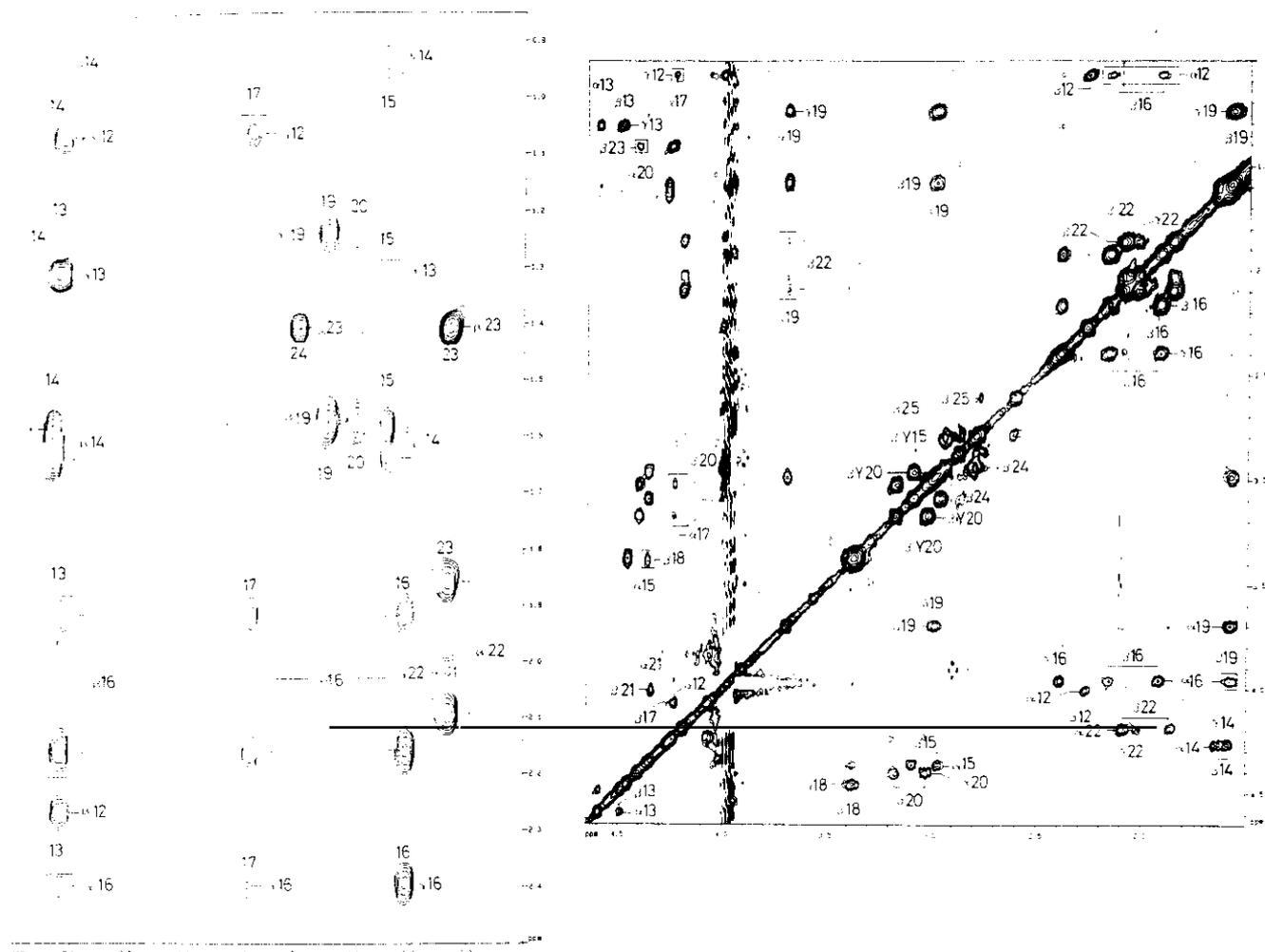


Figura 3.1.9. *Dos regiones del NOESY del fragmento 12-26 (condiciones como en la figura 3.1.8a)*

Tabla IV. NOEs en el extremo N-terminal del fragmento 1226 en 30% TFE.

NOE	Intensidad
γ Val12-NHSer17	media
γ Val12- β Gln16	débil
γ Val12- α Ser17	débil
NHThr13-NHGln16	media
NHThr13- β Gln16	débil
NHThr13- γ Gln16	débil
α Thr13-NHTyr15	media

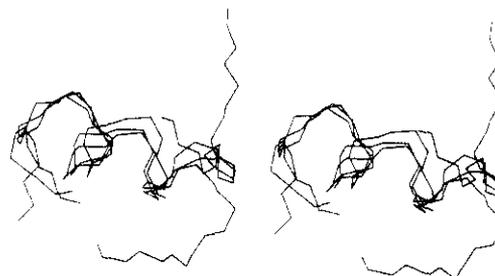


Figura 3.1.10

Fragmento 15-23.

Este fragmento es el resultado de acortar la cadena en tres residuos por cada lado con dos objetivos: por un lado la eliminación de los tres primeros residuos (Val-Thr-Leu, hidrofóbicos) debería aumentar la solubilidad del péptido y, por tanto, permitir una más detallada caracterización estructural, por otro, se comprobaría el efecto de los extremos (aparentemente más flexibles) sobre la estructura de la zona central.

Como se esperaba la solubilidad de este péptido resultó bastante mayor que la del 12-26 pudiéndose trabajar con concentraciones de hasta 10mM. En la figura 3.1.11 se puede ver la zona de los protones amida, que aparece muy limpia de impurezas.

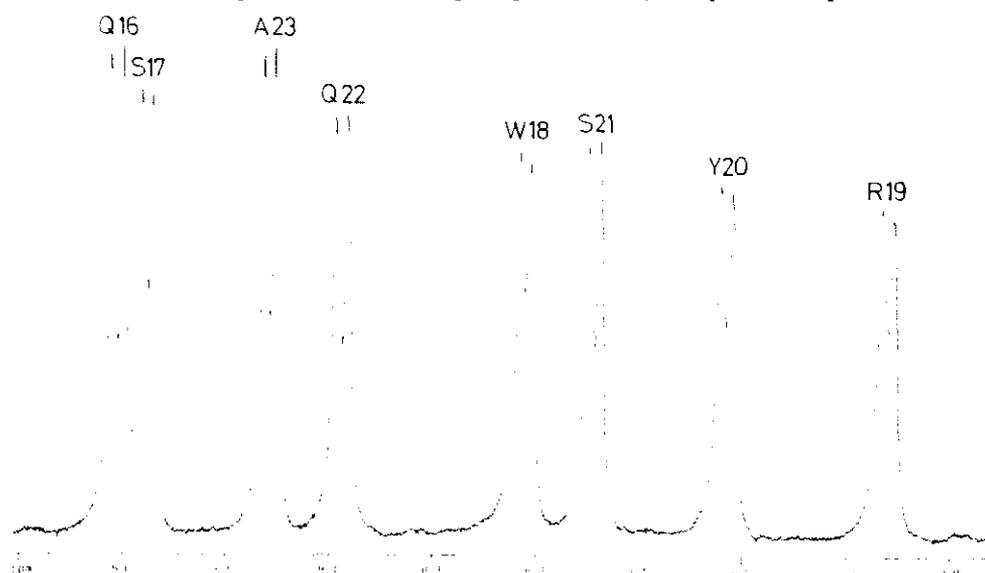


Figura 3.1.11. Región de los protones NH del fragmento 15-23. Condiciones; 10mm, pH=3.0 5°C.

La asignación se pudo realizar completamente en agua; los desplazamientos químicos están listados en la tabla II del apéndice. Los coeficientes de temperatura de los protones amida son casi todos mayores (en valor absoluto) que los del fragmento 12-26 pero los de la Arg19 (-2.9ppb/K) y de la Ser21 (-4.6ppb/K) siguen estando fuera del rango típico de los péptidos sin estructura y aumentan al añadir urea (tabla 3.1.II, y figuras 3.1.27 y 28) Esto indica que la estructura adoptada por este péptido es similar a la del fragmento más largo aunque algo menos estable.

En el espectro NOESY (figura 3.1.12a) se observan dos NOEs no secuenciales $\alpha\text{N}(i,i+2)$, típicos de giros β , entre los residuos 17-19 y 19-21. Estos NOEs están presentes también en el espectro ROESY (figura 3.1.12b), lo que excluye la posibilidad de que sean artefactos de los experimentos como la difusión de espín. Se observan también NOEs del tipo $\beta\text{Ny } \gamma\text{N}(i,i+2)$ entre los residuos 16-18 y 21-23 consistentes con la existencia de conformaciones preferentes en estas regiones. Un resumen de los NOEs observados se muestra en la figura 3.1.13.

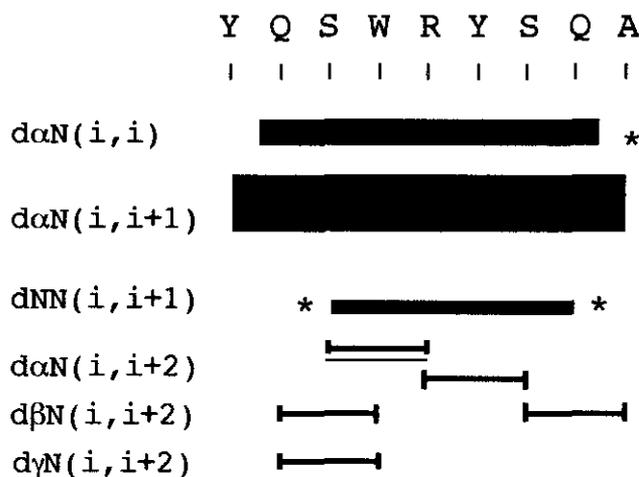


Figura 3.1.13. Resumen de NOEs observados en el fragmento 15-23.

Estos resultados indican que este péptido adopta estructuras de tipo giro β entre los residuos 16-19 (coeficiente de temperatura de la Arg19 y NOE $\alpha\text{N}(17-19)$) y 18-21 (coeficiente de temperatura de la Ser21 y NOE $\alpha\text{N}(19-21)$) aunque la relación de intensidades de los NOEs αN y NN secuenciales indica que estas conformaciones están en equilibrio con un conjunto mayoritario de estructuras extendidas. Los espectros NOESY y ROESY registrados en urea 6M sólo presentan NOEs secuenciales.

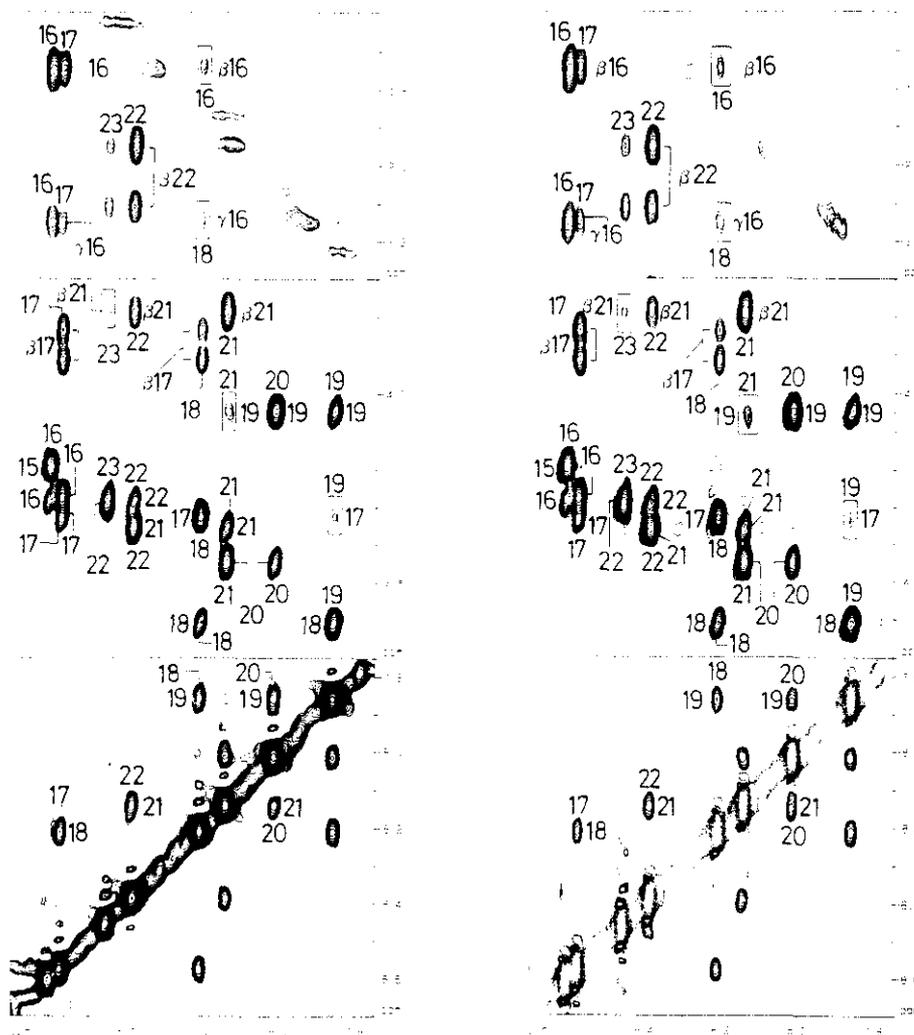


Figura 3.1.12. a) Espectro NOESY ($t_m=200ms$) del fragmento 15-23, b) ROESY ($t_m=200ms$). Condiciones como en la figura 3.1.11.

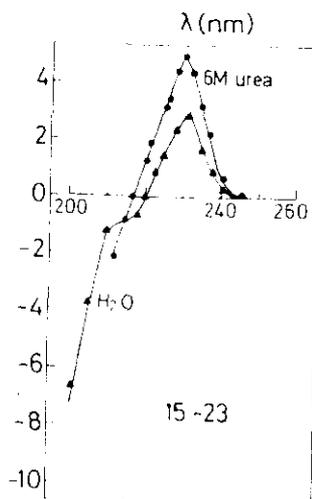


Figura 3.1.14. Espectros de DC del fragmento 15-23 a pH=3.0, 5°C.

En el espectro de DC de la figura 3.1.14 se puede ver que la elipticidad a 220nm es menos negativa que en el fragmento 12-26, lo cual está de acuerdo con la inestabilización de las formas plegadas al acortar la cadena según se deduce de los datos de RMN. En este caso se puede ver en agua la banda positiva a 230nm que probablemente queda enmascarada en el fragmento más largo por la contribución de las conformaciones plegadas.

Fragmento [S¹⁸]15-23.

Las siguientes modificaciones que se hicieron sobre la secuencia original del fragmento 12-26 del tendamistat estuvieron orientadas a explorar los determinantes de su estabilidad, identificar los residuos importantes para la formación de los giros β encontrados.

En los dos giros β detectados interviene el residuo de triptófano, en las posiciones $i+2$ (giro QSWR) e i (giro WRYS). Este hecho es bastante sorprendente teniendo en cuenta la baja abundancia de este residuo en los giros β (y en general en las proteínas) y su fuerte preferencia por ocupar casi exclusivamente la posición $i+4$ de los giros β cuando se encuentra en ellos (Chou, 1978). Por esta razón se pensó en sustituirlo por un residuo de serina, que tiene una alta probabilidad de ocurrencia en las cuatro posiciones del giro, para aumentar su estabilidad.

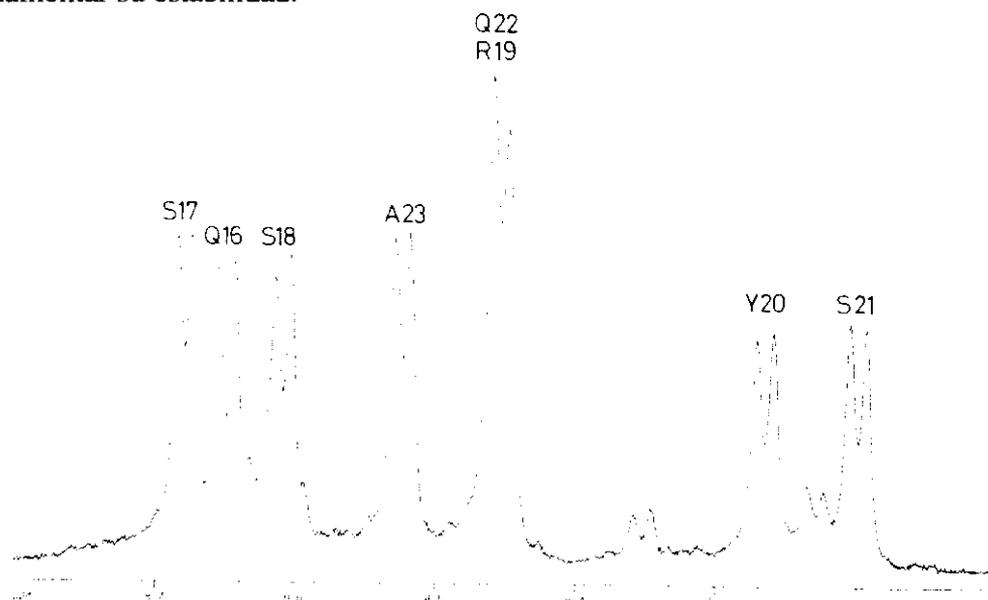


Figura 3.1.15. Región de los protones NH del fragmento [S¹⁸]15-23, 15mM, pH=3.0 5°C

El espectro monodimensional del péptido se muestra en la figura 3.1.15. Se puede ver que hay una impureza de aproximadamente un ~25% del péptido mayoritario. Se intentó purificar la muestra, pero en el cromatograma de HPLC la impureza aparecía como un hombro del pico mayoritario que apenas se resolvía en condiciones isocráticas con un 7% de acetonitrilo, lo que indica que ésta debe ser un péptido de secuencia muy similar a la del péptido mayoritario. Afortunadamente la asignación se pudo realizar sin problemas, aunque no se identificó la naturaleza del péptido contaminante. En la tabla III del apéndice se listan los desplazamientos químicos de todas las resonancias del péptido.

En el espectro ROESY sólo se observan correlaciones secuenciales e intrarresiduo (figura 3.1.16). La ausencia de los NOEs $\alpha\text{N}(i,i+2)$ observados en el fragmento 15-23 indica que los giros β han resultado desestabilizados en gran medida de forma que no son detectables. La presencia de un NOE muy débil entre los protones $\text{H}_{\beta 21}\text{-NH}_{23}$ indica que la estructura en el extremo C-terminal no es completamente al azar. El patrón de NOES está en la figura 3.1.16.

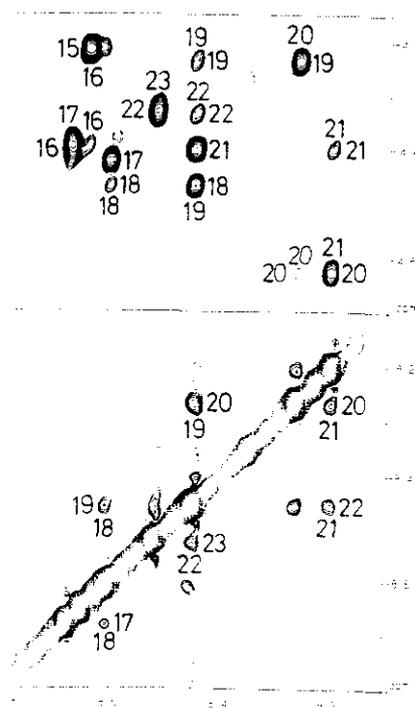


Figura 3.1.16 Espectro ROESY ($t_m=120\text{ms}$) del fragmento $[\text{S}^{18}]15\text{-}23$. Condiciones como en la figura 3.1.15.

el objetivo de comprobar si la mutación de un residuo implicado sólo en uno de los giros podría influir selectivamente en la estabilidad de éste, se pensó en sustituir la Ser21 (en la posición $i+4$ del segundo de los giros) por un residuo con probabilidad muy baja de encontrarse en giros β . La valina es uno de los residuos con menor probabilidad de formar giros β y el menos probable en la posición $i+4$ (Chou, 1978), por lo que se sustituyó la Ser21 por un residuo de valina.

En el espectro monodimensional de la figura 3.1.19 se puede ver el espectro monodimensional de este fragmento modificado. La solubilidad de este péptido era mucho menor que la del fragmento 15-23 y poco mayor que la del 12-26. De igual modo que en éste, la muestra precipitaba al subir el pH por encima de 3.0. La tabla IV del apéndice recoge la lista de los desplazamientos químicos de los protones de este péptido.

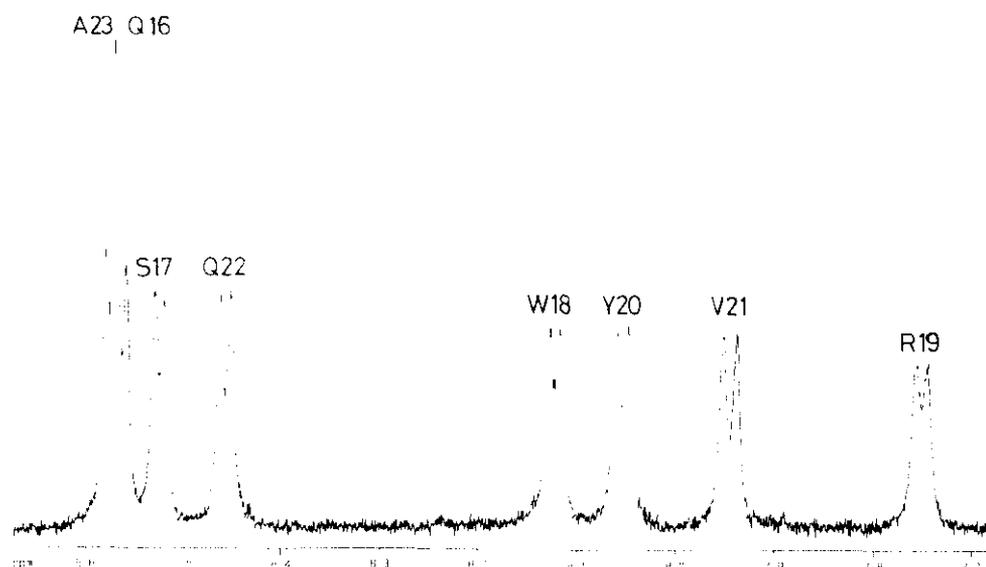


Figura 3.1.19. Espectro monodimensional del fragmento $[V^{21}]_{15-23}$, condiciones: 1mM, pH=3.0, 5°C.

El espectro de DC es muy similar al del fragmento 15-23 como se puede ver en la figura 3.1.20.

En los espectros ROESY o NOESY en agua, (figura 3.1.21) solo se observan NOEs intrarresiduo y secuenciales, aunque la baja relación señal/ruido impediría detectar NOEs de la intensidad de los observados en el fragmento 15-23, de estar presentes. El resumen de NOEs se muestra en la figura 3.1.22.

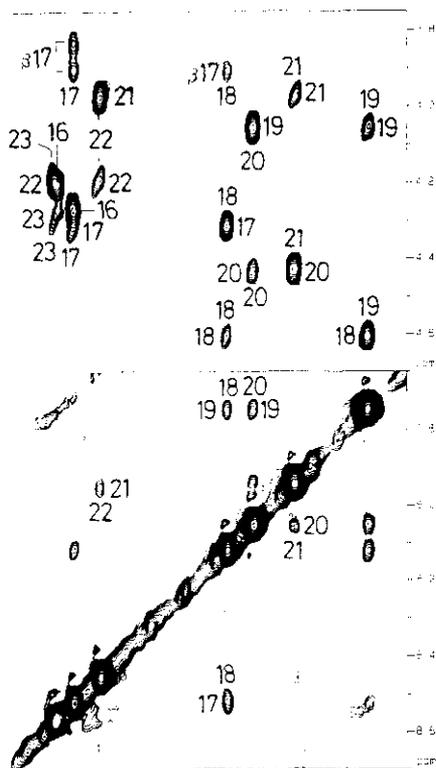


Figura 3.1.20. NOESY $t_m=250ms$.

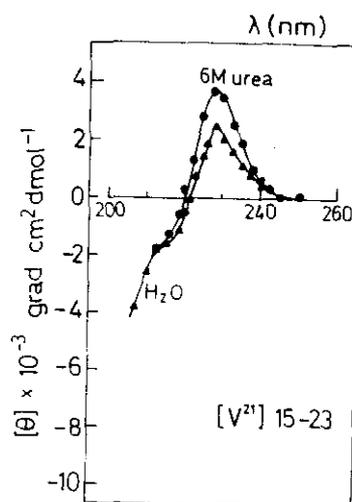


Figura 3.1.21. Espectros de DC.

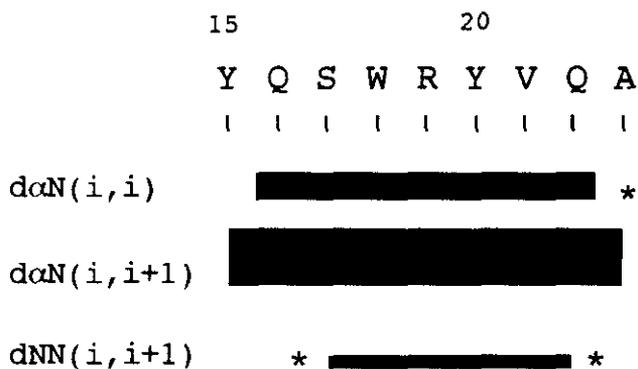


Figura 3.1.22. Patrón de NOEs observados en el fragmento $[V^{21}]15-23$.

Los coeficientes de temperatura de los protones amida (tabla II, y figuras 3.1.23 y 3.1.24) indican que la Arg 19 ($\alpha = -2.1\text{ppb/K}$) tiene una accesibilidad restringida al disolvente que aumenta en presencia de urea 6M, lo que significa que su estructura en esta región del péptido es similar a la de los fragmentos 12-26 y 15-23. Sin embargo, el coeficiente de temperatura de la Val21 está dentro del rango de lo medido en péptidos modelo de péptidos sin estructura lo que sugiere que la estructura es a azar en el extremo C-terminal.

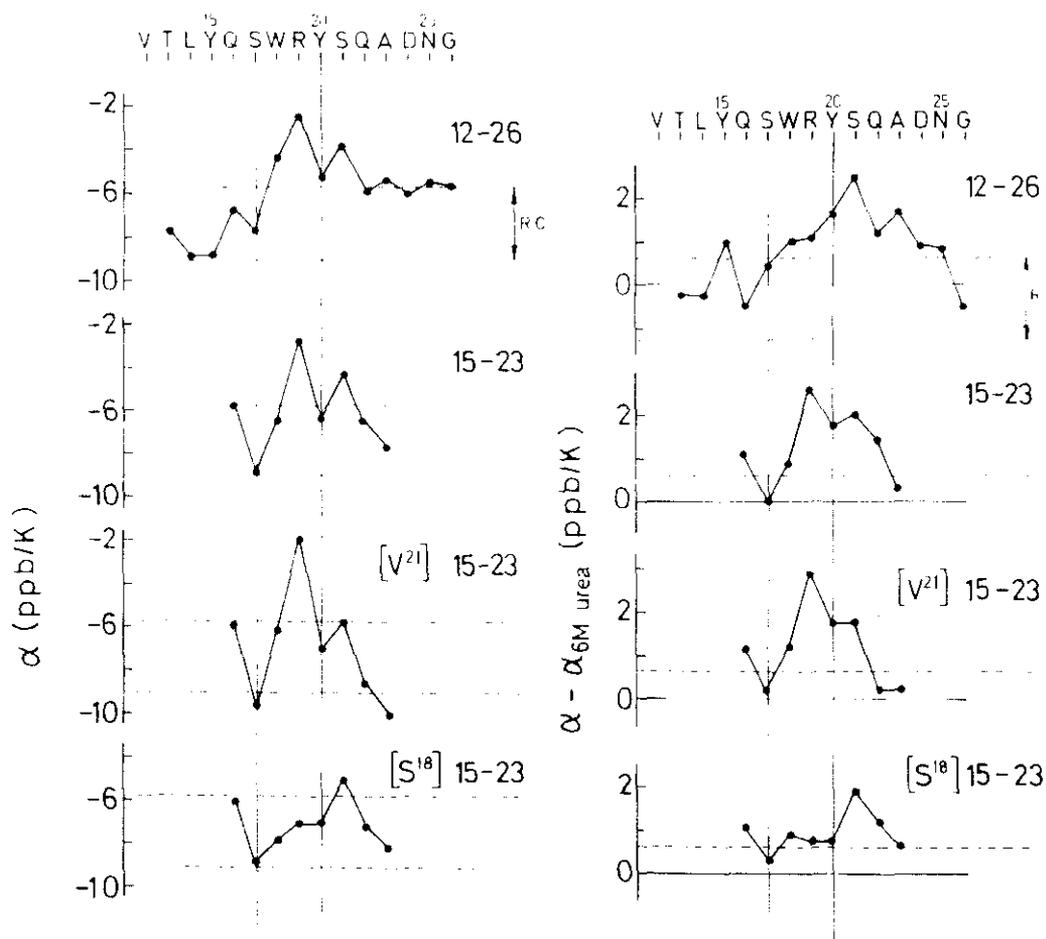


Figura 3.1.23. Coeficientes de temperatura (y su variación con la adición de urea) de las señales amida de los péptidos que se indican. Las líneas discontinúas indican el rango medido en los tetrapéptidos sin estructura.

Las diferencias de los desplazamientos químicos de los protones Ha con respecto a las medidas en los tetrapéptidos modelo de péptidos sin estructura se representan en función de la secuencia en la figura 3.1.24, junto con las correspondientes a los otros cuatro fragmentos estudiados y a las del segmento 12-26 en el tendamistat.

En la tabla 3.1.IV se muestran las diferencias de los desplazamientos químicos de los protones no intercambiables con el disolvente de la Arg19 con respecto a los medidos en el tetrapéptido GGRA.

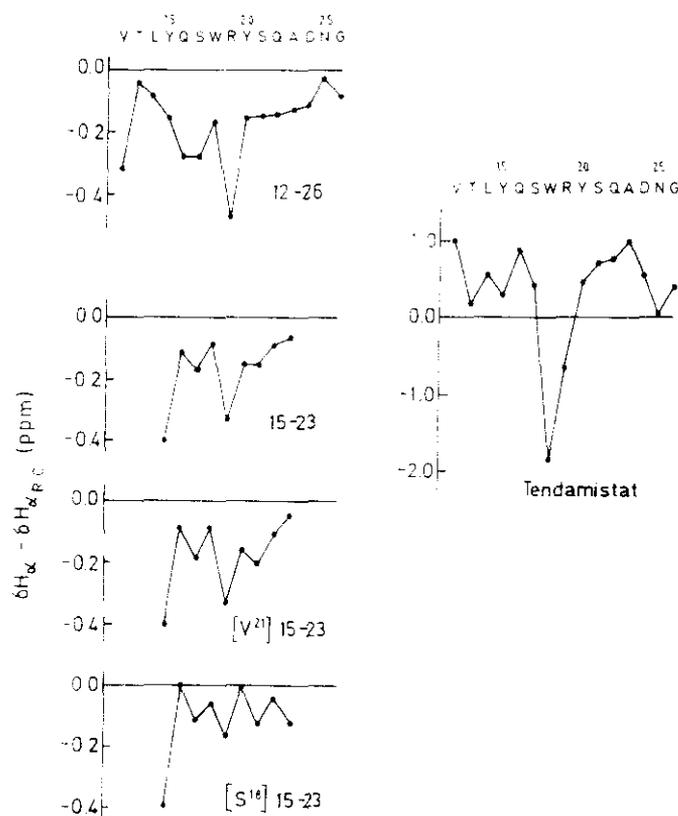


Figura 3.1.24. Comparación de los desplazamientos conformacionales ($\delta - \delta_{RC}$) de las señales H_{α} de los residuos 12-26 de la proteína Tendamistat y en los fragmentos estudiados.

Tabla 3.1 IV. Comparación de los desplazamientos conformacionales de los protones de la Arg19 en la proteína Tendamistat con los de los cinco péptidos estudiados.

Polipéptido	$\Delta\delta_{Ar19}$ Obs. - $\Delta\delta_{Ar}$ en GGRA			
	H_{α}	H_{β}	H_{γ}	H_{δ}
Tendamistat	-0.61	-1.59	-1.29	0.67
Fragmento 12-26	-0.41	-0.45	-0.62	-0.29
Fragmento. 15-23	-0.31	-0.41	-0.56	-0.27
Fragmento [V ²¹]15-23	-0.29	-0.38	-0.54	-0.24
Fragmento [S ¹⁸]15-23	-0.13	-0.37	-0.27	-0.03
		-0.11		
		-0.21		

Discusión.

La diferente solubilidad en agua de los cuatro péptidos estudiados impide comparar las propiedades conformacionales de los péptidos basándose en los NOEs no

secuenciales observados. Por otro lado en algunos de ellos la baja relación señal/ruido hace que la medida de las intensidades de los NOEs secuenciales (especialmente las de los NN) tengan mucho error, y los espectros de DC se han revelado poco útiles dado que las conformaciones plegadas se encuentran en equilibrio rápido con estructuras al azar mayoritarias.

En este caso, los desplazamientos químicos pueden ser muy útiles para comparar las estructura de los cuatro péptidos. En la figura 3.1.23 se pueden ver los perfiles de los coeficientes de temperatura de los péptidos estudiados con respecto a la secuencia y ~~en la~~ figura 22 su variación con la urea. Estos resultados indican que el fragmento 12-26 es el péptido con mayor población de conformaciones con estructura de giro β , y que esta población disminuye con el acortamiento de la cadena por ambos extremos. La sustitución de la Ser21 por valina desestabiliza selectivamente el segundo de los giros mientras que la sustitución del Trp18 por serina produce una desestabilización de los dos giros. Parece, pues, que los residuos Trp18 y Ser21 son esenciales para la estabilidad de los giros y que la tendencia a plegarse está fuertemente determinada por la secuencia en la misma posición del giro.

Como se ha comentado en la introducción, la capacidad inhibidora del tendamistat se ha podido relacionar con tres de los residuos que forman el giro β en la proteína Trp-Arg-Tyr. La cadena lateral de la arginina queda entre las cadenas laterales de los dos residuos aromáticos produciéndose un fuerte desplazamiento a campo alto de las resonancias de sus protones de la arginina con respecto a los valores de referencia del tetrapéptido GGRA. En la tabla 3.1.IV se puede ver que esta diferencias son muy grandes en el tendamistat y disminuyen (en valor absoluto) en los fragmentos estudiados en el orden 12-26, 15-23, [V²¹]15-23, [S¹⁸]15-23. Se han comparado únicamente los valores correspondientes a protones no intercambiables. Los resultados están de acuerdo con una pérdida gradual de estructura de los péptidos en el mismo sentido que el indicado por los los NOEs observados y los valores de los coeficientes de temperatura.

Esta pérdida gradual de estabilidad de las conformaciones plegadas en los péptidos estudiados se refleja también en los desplazamientos químicos de los protones H α del esqueleto como se puede apreciar en la figura 3.1.24, donde se representan las diferencias con los valores de los tetrapéptidos de referencia con respecto a la secuencia en los cuatro péptidos estudiados y en el tendamistat.

La formación de una hélice α en el fragmento 12-26 en 30% de TFE, en la zona del péptido que en agua forma estructuras de tipo giro β es consistente con esa última. De hecho la estructura de un giro β de tipo I no es muy diferente de una vuelta de hélice. También se han relacionado los giros β con las hélices α en las primeras etapas del

plegamiento y a las vueltas de hélice 3_{10} conexión de dos hebras de una lámina β (Barlow, 1990). Lo relevante en cuanto al posible papel es que la tendencia de la cadena a plegarse por esta zona está determinada por la secuencia local y, por tanto puede actuar desde el principio del plegamiento dirigiendo las etapas posteriores.

Los resultados obtenidos con estos cuatro péptidos indican que esta secuencia es capaz de formar estructuras de tipo giro β en la zona central de la cadena donde existe un giro β en la proteína completa, lo que permite proponer que esta secuencia se pliega de forma independiente del resto siendo, por tanto, un intermedio del camino de plegamiento. Además se ha podido comprobar que cambios de un sólo aminoácido de la secuencia afectan fuertemente a la estabilidad de los giros.

3.2. Fragmento 35-44 del tendamistat y péptidos relacionados.

En el tendamistat existe otro giro que conecta dos hebras contiguas de una lámina β (estructura de horquilla β), perteneciente a la familia 3:3, según la clasificación de Sibanda (1989). Se trata de un giro de cinco residuos (37-41, con un puente de hidrógeno NH41-CO37), que se observa raramente en proteínas. En la figura 3.1.1a la horquilla β en el tendamistat, que está conectada por un puente disulfuro con la otra lámina del barril β . En la figura 1c se puede ver que el perfil de los desplazamientos conformacionales en la región que forma la horquilla β tiene las mismas características que el correspondiente a la región 12-26, aunque está menos marcado en los residuos del giro. En este caso se seleccionó un péptido más corto que el 12-26 para evitar los problemas de solubilidad que aparecieron en éste.

La secuencia de este fragmento no está tan conservada como la del 12-26 y sólo la Val 35 y la Tyr 37 son invariantes en cinco inhibidores de α -amilasa microbianos (Hirayama, 1987). De igual modo que el fragmento 12-26, esta secuencia permitirá comprobar no sólo la estabilidad del giro sino también si éste es capaz de dirigir la formación de contactos entre los residuos que forman la lámina β . Si este péptido se comporta como el 12-26 formando estructuras de tipo giro β en la zona 37-41 donde está el giro nativo, será posible proponer que estas secuencias constituyen centros de inicio del plegamiento de esta proteína.

Resultados.

Fragmento [Q⁴²]35-44.

Debido a un error en la síntesis, este fue el primer péptido que se estudió. La sustitución del glutámico por glutamina en la posición 42 de la secuencia no debe afectar mucho a sus preferencias conformacionales, según las estadísticas de giros β en proteínas. La secuencia nativa pudo obtenerse a partir de esta por hidrólisis ácida de la amida de la glutamina y el análisis conformacional de los dos péptidos ⁴ indica que el comportamiento es muy similar.

Este péptido resultó muy soluble y se pudo estudiar por RMN usando muestras concentradas (10mM). La figura 3.2.1 corresponde a la zona de los protones NH del espectro monodimensional de este fragmento donde se puede ver que la muestra está libre de impurezas, con lo que la asignación de las señales se realizó sin problemas. Los

desplazamientos químicos de todas las resonancias del espectro están en la tabla V del apéndice. Este péptido a pH=3.0 se degradaba con el tiempo como se deduce de la aparición de señales nuevas débiles.

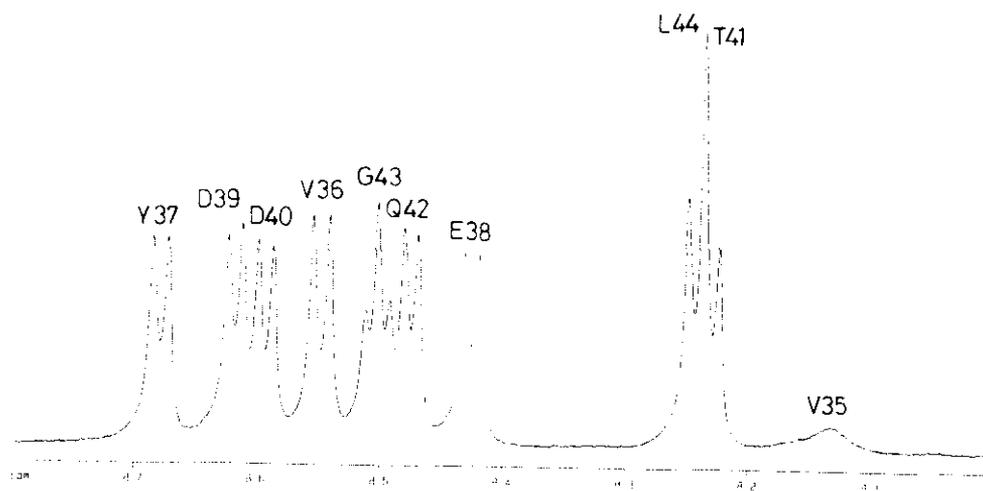


Figura 3.2.1 Espectro monodimensional del fragmento $[Q^{42}]_{35-44}$. Condiciones: 10mM, pH=3.0, 5°C.

Los espectros de DC de éste péptido en diferentes condiciones se muestran en la figura 3.2.2. El espectro en agua a pH=3.0, es parecido al del fragmento 15-23 (ver página 50), y no cambia en presencia de NaCl 1M. La adición de urea modifica sólo ligeramente el espectro, la banda positiva a 230nm aumenta algo en intensidad y el hombro a 220nm se desplaza a valores menos negativos. El mismo efecto pero ampliado se produce al subir el pH a 6.0, condiciones en las que todos los grupos ionizables del péptido están cargados.

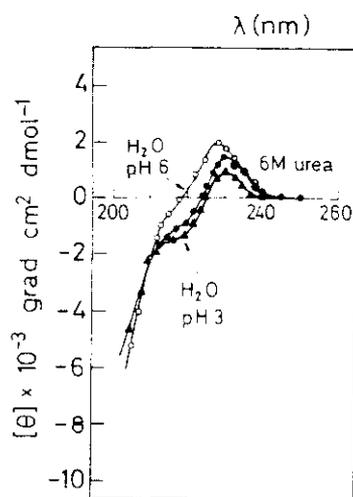


Figura 3.2.2 Espectros de DC del fragmento $[Q^{42}]_{35-44}$. Condiciones: como en 3.2.1.

Los espectros de RMN (NOESY y ROESY) en las mismas condiciones que los de DC, indican que el equilibrio conformacional del péptido es básicamente el mismo en las tres condiciones. En la figura 3.2.3 se muestran las regiones α N y NN del ROESY en agua a pH=3.0. Se pueden observar dos NOEs $d\alpha N(i,i+2)$ entre los residuos 39-41 y 40-42. Estos NOEs indican que en esta zona el péptido adopta conformaciones de tipo giro β entre los residuos 38-41 y 39-42 que están en equilibrio entre sí y con conformaciones al azar mayoritarias. En presencia de urea 6M se observan los mismos NOEs

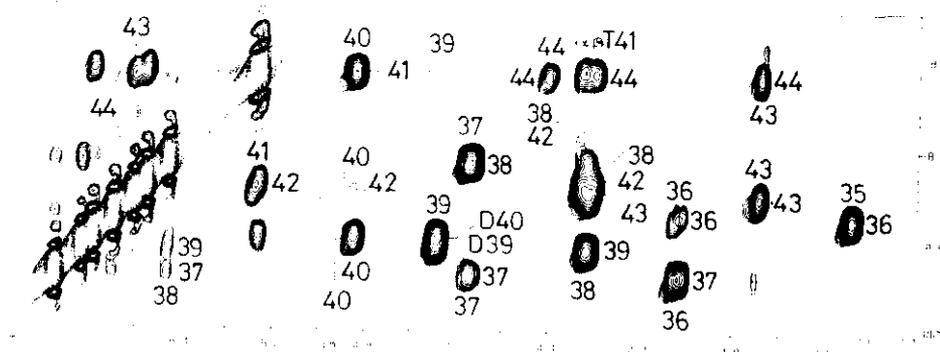


Figura 3.2.3. ROESY, $t_m=120ms$, del fragmento $[Q^{42}]_{35-44}$. Condiciones: como en 3.2.1.

A pH=5.6 se ve, además de estos, el NOE $d\alpha N(i,i+3)$ 41-44 como consecuencia del movimiento de las frecuencias de resonancia de los protones $H\alpha$ y NH de la Leu44 al aumentar el pH (titulación del carboxilo terminal). La suposición de que esta distancia es igualmente corta en el péptido a pH=3.0, se basa en la observación de otros NOEs entre las cadenas laterales de estos dos residuos, en particular entre los protones $H\alpha, H\beta$ Thr41- $H\beta, H\delta, Leu44$, que se ven a los dos pHs y en urea. Estos NOEs indican que en el extremo C-terminal el péptido adopta una conformación similar a una vuelta de hélice. En el extremo N-terminal se pueden observar contactos $(i,i+2)$ cadena lateral-NH entre los residuos Val36-Glu38 y cadena lateral-cadena lateral entre los residuos Val35-Tyr37 y Tyr37-Asp39. Un resumen de los NOEs observados se muestra en la figura 6.

Estas características están de acuerdo con las intensidades de los NOEs secuenciales y con los valores de los coeficientes de temperatura, que cambian muy poco con el pH y la adición de urea (tabla 3.2.1).

Fragmento 35-44.

La posibilidad de obtener este péptido a partir del fragmento [Q⁴²]35-44 por simple hidrólisis ácida se comprobó sobre una muestra a pH<1. La evolución de la reacción con el tiempo se siguió con espectros de RMN monodimensionales, observándose cambios en la zona de los protones NH y el desdoblamiento de la señal correspondiente a los protones H_γ de la Gln42 y Glu38 que resuenan a la misma frecuencia 12. A este pH y a temperatura ambiente, la reacción progresaba rápidamente pero al cabo de dos semanas, los cambios en el espectro indicaban que había más de dos especies en la muestra. El cromatograma de HPLC se vió que, además de los picos correspondientes a los dos péptidos mayoritarios aparecen al menos cuatro especies minoritarias. Para evitar esta degradación del péptido, se preparó una muestra con 5mg disueltos en 1ml de agua a pH=2.1, y se dejó a temperatura ambiente. La reacción se siguió por HPLC y se paró a los 54 días cuando la proporción [Q⁴²]35-44:35-44 era 8:2 aproximadamente. La separación de estos dos picos tuvo que hacerse en columna analítica con inyecciones de 50 a 100μl., aun así fue necesario recromatografiar la fracciones recogidas hasta que el grado de pureza se juzgó suficiente para llevar a cabo el análisis conformacional por RMN sin problemas (figura 3.2.5). El liofilizado de las fracciones finales dió un peso de 3.7mg, que se utilizó para preparar una muestra para el estudio por RMN de concentración 4mM aproximadamente.

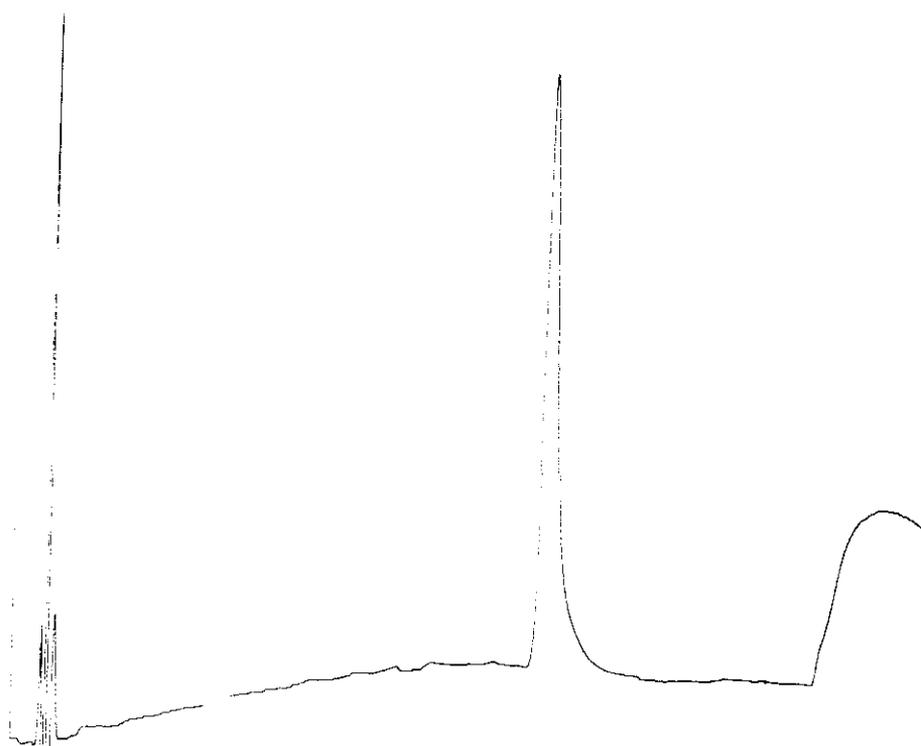


Figura 3.2.5. *Cromatograma de HPLC del fragmento 35-44 del tendamistat.*

En la figura 3.2.6 se puede ver las señales de los protones NH en el espectro monodimensional. La identidad del péptido se confirmó con la signación completa del espectro. Los desplazamientos químicos están recogidos en la tabla VI del apéndice.

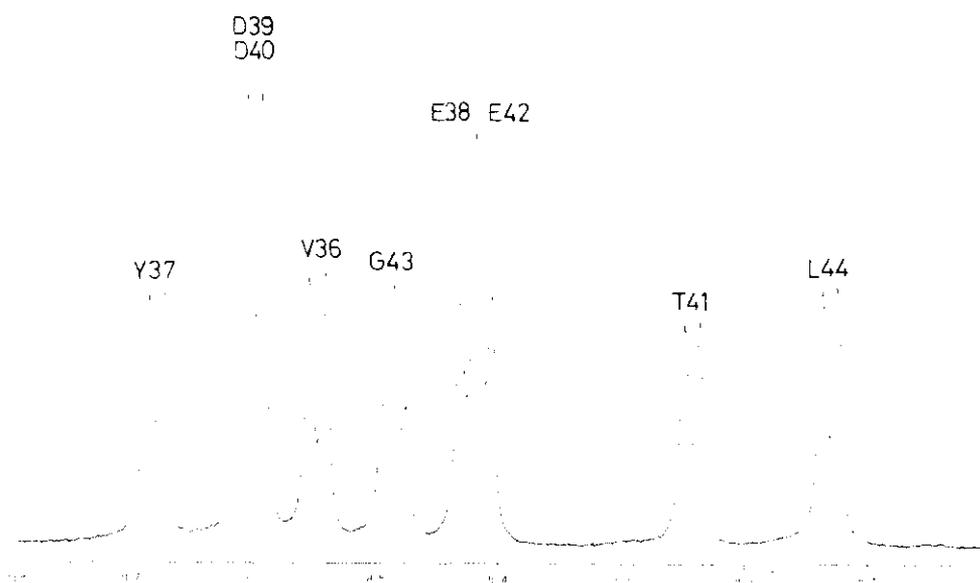


Figura 3.2.6. Espectro monodimensional del fragmento 35-44. Condiciones: 4mM, pH=3.0, 5°C.

En la figura 3.2.7 se puede ver que los espectros de DC son muy parecidos a los del fragmento [Q⁺²]35-44 registrados en las mismas condiciones aunque con dos dicrógrafos distintos.

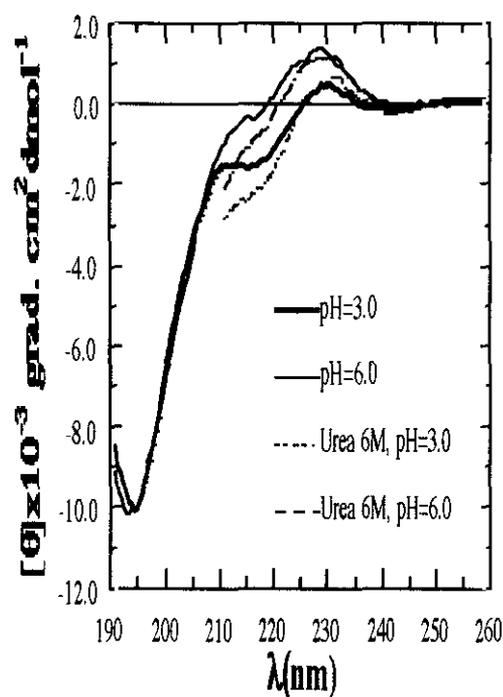


Figura 3.2.7. Espectros de dicroísmo circular del fragmento 35-44.

Los coeficientes de temperatura de este péptido son también muy parecidos a los del fragmento $[\text{Q}^{42}]35-44$ (tabla 3.2.II), en general disminuyen (en valor absoluto) pero las diferencias son menores de 0.8ppb/K.

Los NOEs observados también son los mismos. En la figura 3.2.8 se muestran las regiones del espectro donde se ven los NOEs secuenciales entre protones de esqueleto y los no secuenciales. Estos resultados indican que los dos péptidos tienen una estructura muy similar.

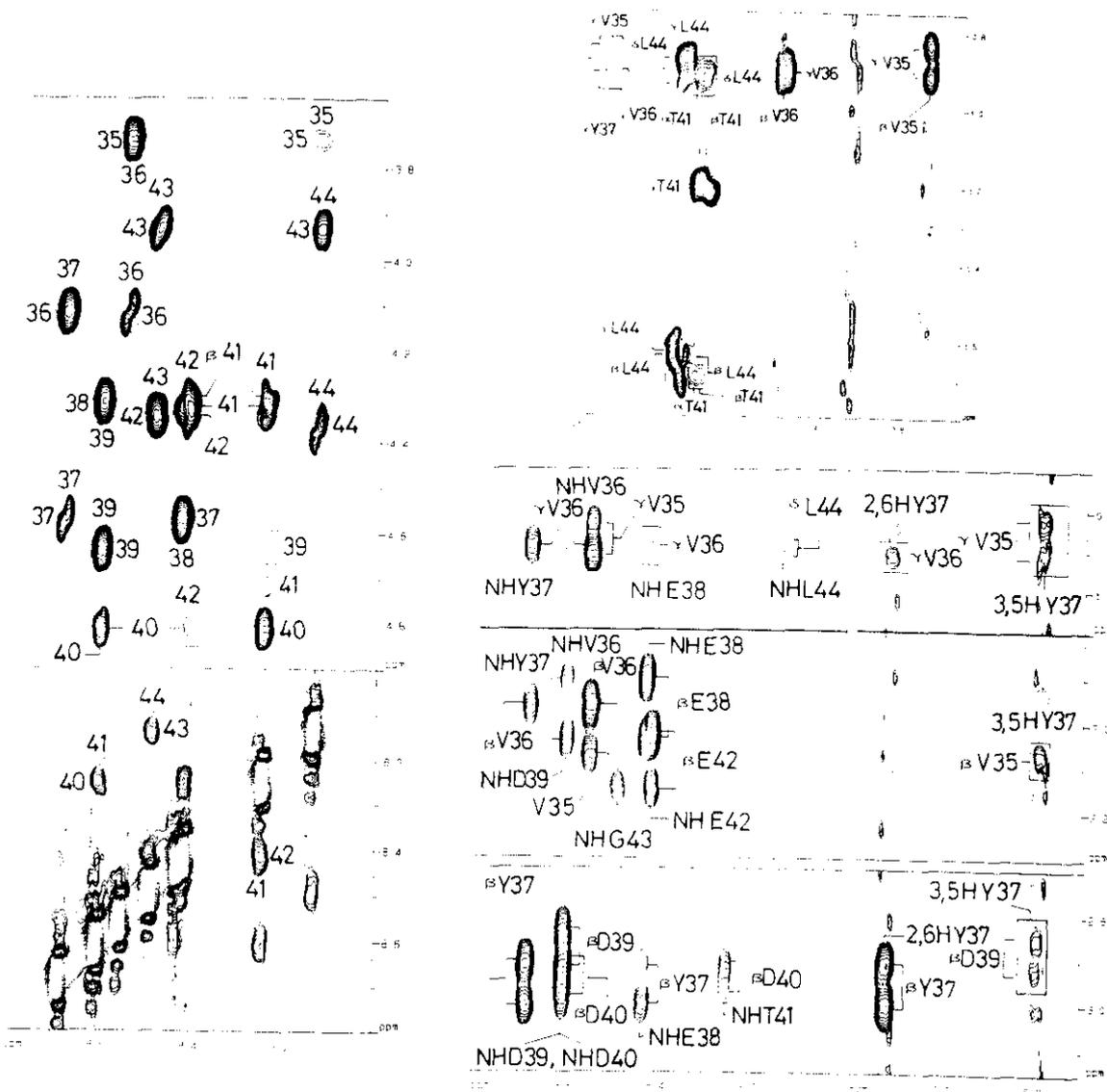


Figura 3.2.8. Espectro ROESY ($t_m=120ms$) del fragmento 35-44. Condiciones como en 3.2.6.

Fragmento [N³⁸]35-44.

Con el objetivo de modificar la estructura del péptido y explorar los requerimientos de secuencia para la estabilidad de los giros detectados, se estudió este péptido con una asparagina en el lugar del Asp38 de la secuencia nativa. Según las estadísticas de preferencias posicionales de los aminoácidos en los giros β en proteínas (Chou, 1978, Wilmot, 1988) este cambio debería estabilizar el segundo de los giros y desestabilizar el primero, ya que la asparagina es más abundante que el aspártico en la posición 1 y menos que éste en la posición 2 de un giro β en proteínas (Chou, 1978, Wilmot, 1988).

En la figura 3.2.9 se puede ver que el espectro es muy similar al del péptido con la secuencia nativa cambiando algo las señales del nuevo residuo. Existen algunas señales débiles que corresponden a impurezas no identificadas que, afortunadamente, no

estorbaron demasiado para el análisis de los espectros. Los desplazamientos químicos de las resonancias se encuentran en la tabla VII del apéndice.

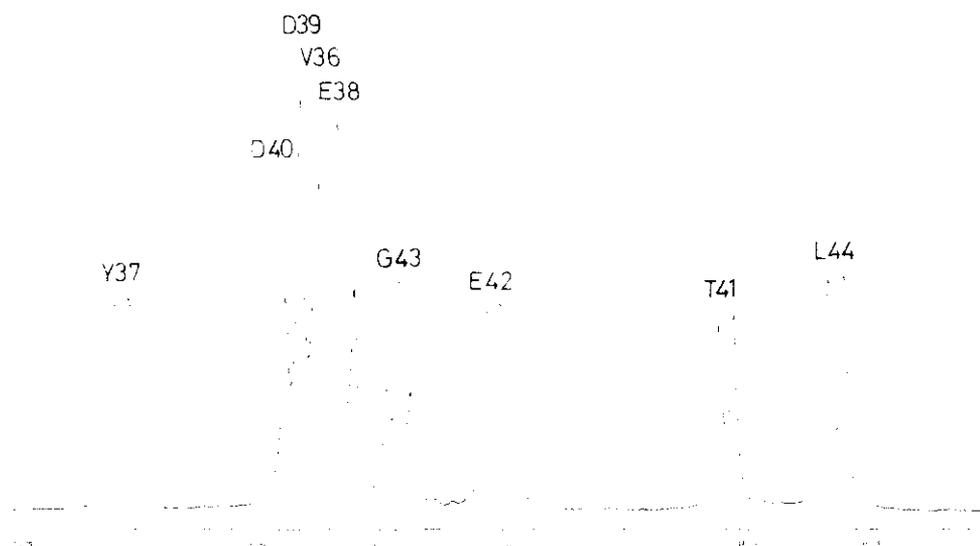


Figura 3.2.9. Espectro monodimensional del fragmento $[N^{38}]_{35-44}$. Condiciones: 10mM pH=3.0, 5°C.

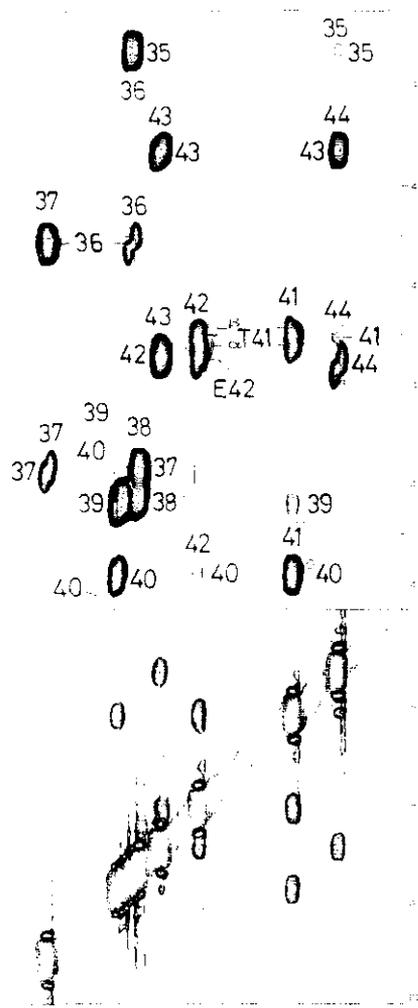


Figura 3.2.10. Espectro ROESY ($t_m=250$ ms) del fragmento $[N^{38}]_{35-44}$.

Los NOEs observados en los espectros NOESY y ROESY de este péptido son los mismos que en los fragmentos anteriores. En la figura 3.2.10 se muestran las zonas α N y NN del espectro ROESY. Los coeficientes de temperatura (tabla 3.2.II) prácticamente no cambian con respecto a los de la secuencia nativa salvo el del Asp40 que pasa de -6.8 a -5.5 ppb/K.

Fragmento [W⁴¹]35-44.

Con esta mutación en la secuencia, se pretendía desestabilizar el primero de los giros y estabilizar el segundo. La introducción de un triptófano en la posición 41 debería causar este efecto puesto que es muy poco abundante en la posición 3 y tiene gran preferencia por la posición 4.

La solubilidad de este péptido resultó menor que las de los tres anteriores pero aún se pudieron preparar muestras con una concentración de 3mM. La figura 3.2.11 corresponde a la zona de los protones NH del espectro monodimensional de este fragmento. En este espectro se pueden ver grandes cambios en las frecuencias de resonancia de los protones de los residuos 40, 42 y 43, los más próximos al Trp41. La Gly43 es el que más cambia desplazándose la señal de su protón NH casi 0.9ppm a campo alto con respecto al péptido de secuencia nativa. Los desplazamientos químicos de todas las resonancias del espectro están en la tabla VIII del apéndice.

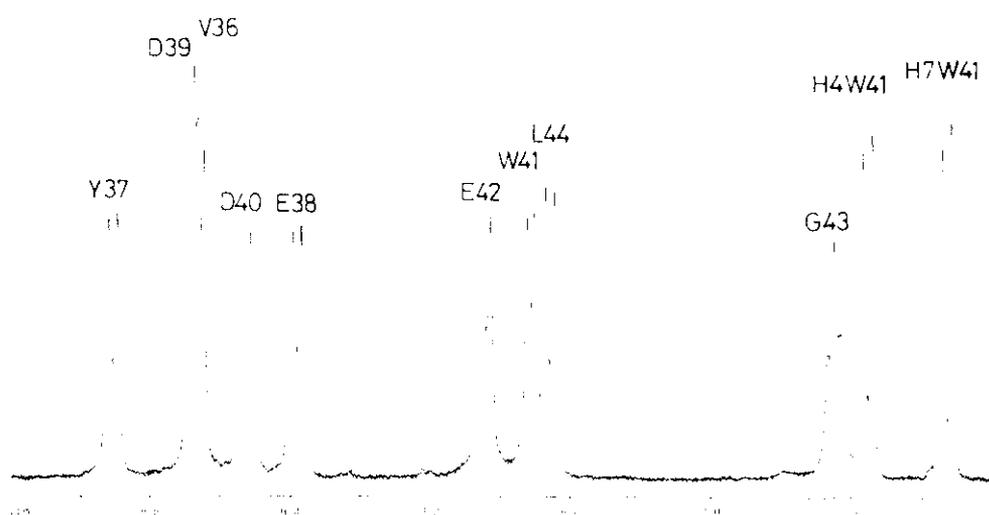


Figura 3.2.11. Espectro monodimensional del fragmento [W⁴¹]35-44. Condiciones: 3mM, pH=3.0, 5°C.

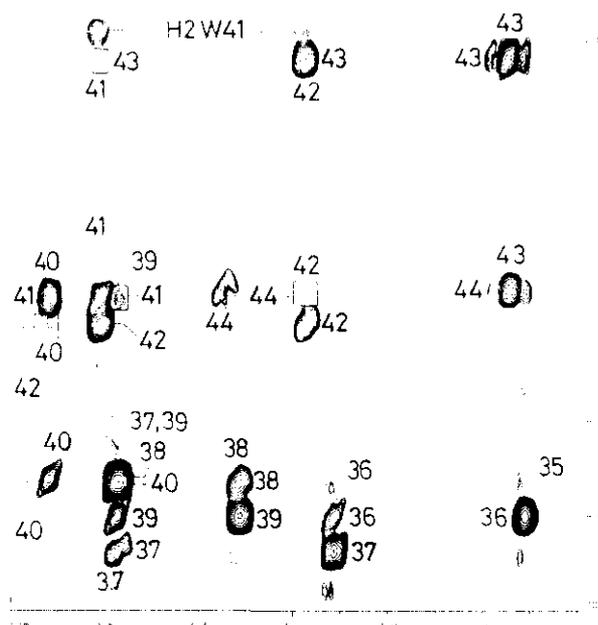


Figura 3.2.14. Espectro ROESY en urea 6M del $[W^{41}]_{35-44}$. Condiciones: 3mM, pH=3.0, 5°C.

Los coeficientes de temperatura de las señales de los protones NH son parecidos a los del péptido con la secuencia nativa (tabla II) salvo los de los residuos 41, 42 y 43 que disminuyen en más de una unidad. Especialmente sorprendente es la práctica insensibilidad de la señal de la Gly 43 ($\alpha = -0.4 \text{ppb/K}$) al aumento de temperatura. Este comportamiento puede deberse a una accesibilidad muy reducida al disolvente o a una reorientación del anillo aromático del Trp41 con la temperatura, de tal forma que desplazaría la señal a campo bajo en una medida similar al desplazamiento de la señal a campo alto como consecuencia de la alteración del equilibrio de formación de puentes de hidrógeno con las moléculas de agua. Las señales de los protones H_{α} de la Gly43 se desplazan a campo bajo pero muy poco ($\Delta\delta = 0.03 \text{ ppm}$ entre 5 y 32°C), por lo que debe concluirse que el coeficiente de temperatura medido es consecuencia de una accesibilidad reducida al disolvente. Los coeficientes de temperatura de este péptido no varían significativamente en presencia de urea ($\Delta\delta < 1 \text{ppb/K}$) salvo los de la Val36 y la Tyr37 (-5.9 y -7.8ppb/K respectivamente)

Tabla 3.2.II. Coeficientes de temperatura (α , en ppb/K) de los cuatro fragmentos estudiados a pH=3.0.

Residuo	Fragmento			
	35-44	[Q ⁴²]35-44	[N ³⁸]35-44	[W ⁴¹]35-44
Val35	---	---	---	---
Val36	-7.4	-7.7	-7.1	-7.0
Tyr37	-10.3	-10.3	-10.1	-10.2
Glu38	-6.1	-6.3	-5.8	-6.4
Asp39	-7.3	-7.3	-7.1	-7.2
Asp40	-6.8	-7.0	-5.5	-7.0
Thr41	-6.0	-6.3	-5.5	-4.8
Gln42	-6.3	-6.7	-5.9	-5.2
Gly43	-6.7	-7.0	-6.4	-0.4
Leu44	-6.6	-7.3	-6.5	-6.4

Las intensidades relativas de los NOEs entre los protones del esqueleto pueden calcularse en toda la secuencia del péptido gracias a la gran dispersión de las señales en el espectro de RMN. En la tabla 3.2.III se recogen las relaciones de intensidad $I_{\alpha N(i,i)}/I_{\alpha N(i,i+1)}$.

Tabla 3.2.III. Relación de intensidades de los NOEs secuenciales e intrarresiduo de los cuatro péptidos medidos en espectros NOESY, de 200-250ms.

Residuo i	$I_{\alpha N(i,i)}/I_{\alpha N(i,i+1)}$			
	35-44	[Q ⁴²]35-44	[N ³⁸]35-44	[W ⁴¹]35-44
Val35	---	---	---	---
Val36	0.03	0.12	0.13	0.13
Tyr37	0.04	0.16	0.14	0.18
Glu/Asn38	---	0.21	---	0.28
Asp39	---	---	---	0.55
Asp40	0.55	0.64	0.67	0.66
Thr/Trp41	---	---	---	0.43
Glu/Gln42	---	---	---	0.67
Gly43	1.00	2.29	2.40	2.23
Leu44	---	---	---	---

En la figura 3.2.15 se representan estas relaciones de intensidad frente a la secuencia. Se puede ver que en la región N-terminal (residuos 35-38) las relaciones de intensidad son muy bajas y que estas aumentan a partir del Asp39.

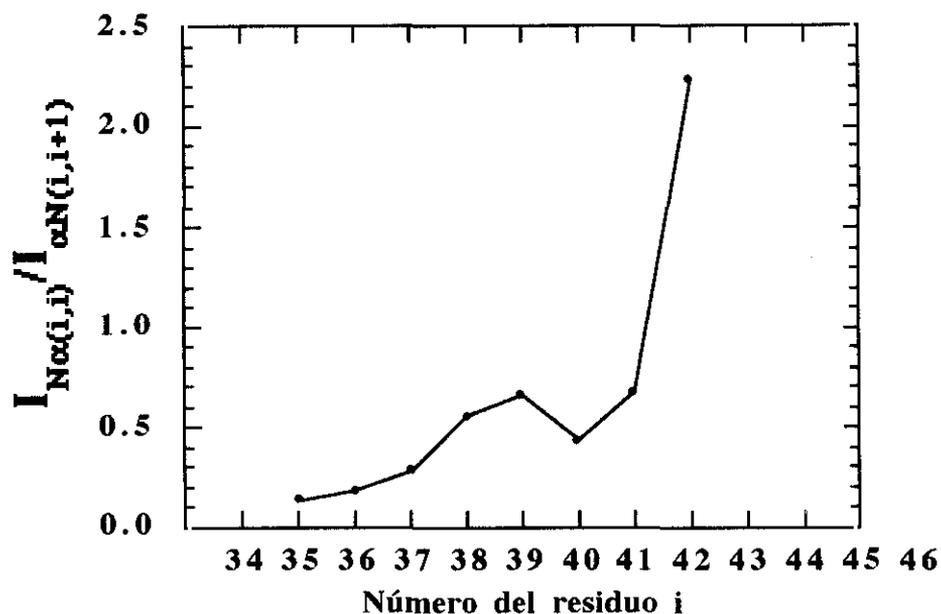


Figura 3.2.15.

Discusión.

Las relaciones de intensidad $I_{\alpha N(i,i)} / I_{\alpha N(i,i+1)}$ indican que los cuatro péptidos estudiados tienen básicamente el mismo comportamiento conformacional. Las intensidades que se pueden medir en los fragmentos 35-44, $[Q^{42}]35-44$ y $[N^{38}]35-44$ son muy parecidas a las correspondientes en el fragmento $[W^{41}]35-44$. El coeficiente de temperatura bajo de Gly43 en este fragmento (-0.4ppb/K) indica una accesibilidad reducida del disolvente, probablemente debida a la cadena lateral de Trp41 (muy voluminosa). No parece probable que este valor sea consecuencia de un puente de hidrógeno con alguno de los grupos carbonilo del péptido puesto que en los otros fragmentos no hay indicios de que se forme.

Como se puede ver en la figura 3.2.15, las intensidades relativas de los NOEs permiten concluir que existen dos regiones en estos péptidos con un equilibrio conformacional diferente. En la región N-terminal del péptido existe una gran población

de conformaciones con estructura extendida mientras que en el resto del péptido hay poblaciones mayores de conformeros correspondientes a la zona α del mapa de Ramachandran. Los NOEs entre las cadenas laterales en el extremo N-terminal se pueden interpretar con una disposición alternada de las cadenas laterales de estos residuos en una conformación similar a una hebra de lámina β . La presencia de un conjunto de NOEs del tipo $d_{\alpha N}(i,i+2)$ desde el residuo 38 al 43 indica que el péptido adopta conformaciones de tipo giro β en esta región. Los contactos $(i,i+3)$ entre los residuos 41-44 parecen indicar que en esta región la estructura formada podría ser también una vuelta de hélice 3_{10} . Estas estructuras están en equilibrio con conformaciones al azar mayoritarias.

Como el caso del fragmento 12-26 del tendamistat, lo relevante en cuanto al posible papel de esta secuencia en el inicio del plegamiento es que existe una tendencia, aunque débil, de la cadena a plegarse por esta zona. Las poblaciones no parecen afectarse mucho por la presencia de urea ni con cambios puntuales de aminoácidos en la secuencia, probablemente debido a que ya son muy bajas y no se produce un efecto desestabilizador que pueda ser detectado por intensidades de NOEs.

3.3. Fragmento 2-19 del dominio de unión a inmunoglobulinas G de la proteína G.

La proteína G es una proteína de la superficie celular del grupo G de *Streptococcus* que cumple la función de sortear las defensas del organismo huésped y contiene de dos a tres dominios de unión a la región F_c de la inmunoglobulina G (Fahnestock, 1986). Las propiedades estructurales de estos dominios aislados de varias estirpes de *Streptococcus* (de unos 60 residuos aproximadamente) han sido estudiados por varios autores (Lian, 1991; Gronenborn, 1991; Orban, 1992). El estudio más completo ha sido el realizado por Gronenborn y col. encontrando una estabilidad inusual frente a la desnaturalización térmica y por urea para un polipéptido de este tamaño y sin puentes disulfuro ($T_m=87^\circ\text{C}$). Las razones de esta estabilidad parecen residir en que casi todos los aminoácidos forman parte de elementos de estructura secundaria (un 95%) con gran número de puentes de hidrógeno intramoleculares. Además el interior es muy hidrofóbico y el exterior muy hidrofílico de tal forma que la proteína es muy compacta con gran número de contactos en el núcleo apolar. Estas características hacen proponer a los autores que la desnaturalización debe ocurrir simultáneamente en toda la estructura implicando a toda la proteína, y sugieren su utilidad como modelo de estudio del problema del plegamiento.

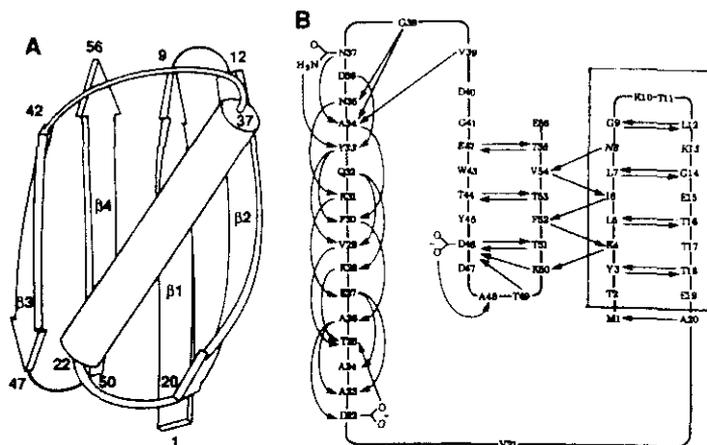


Figura 3.3.1. a) Estructura tridimensional del dominio de la proteína G; b) secuencia del dominio con los puentes de hidrógeno identificados (flechas). El fragmento escogido está recuadrado en esta figura.

Parecía, por tanto, interesante llevar a cabo un estudio conformacional de alguno de los elementos de estructura secundaria de esta proteína con el fin de comprobar si la estabilidad estructural podría tener una contribución importante de la suma de estabilidades parciales de estos elementos. Si esto fuera así, los fragmentos con estructura de horquilla β serían buenos modelos para el estudio de la estabilidad de estos elementos aislados y su implicación en el plegamiento. De las dos horquillas β se escogió la primera

(figura 3.3.1) por tener un giro β regular de tipo I. De esta se excluyeron los dos residuos de los extremos, puesto que el primero (metionina) proviene de la expresión del dominio por ingeniería genética y no está en la proteína G.

Resultados.

Este péptido resultó suficientemente soluble como para preparar muestras de concentración 5mM. El espectro monodimensional de la figura 3.3.2 corresponde a la zona de los protones NH donde se puede ver que la muestra está libre de impurezas. Las señales, sin embargo, se encuentran en un rango reducido de frecuencias, indicio de que el péptido está poco estructurado. A pesar de la pequeña dispersión de las señales, la asignación se llevó a cabo sin problemas y se confirmó con espectros a diferentes valores de pH y temperatura. Los desplazamientos químicos de todas las resonancias del espectro están en la tabla IX del apéndice.

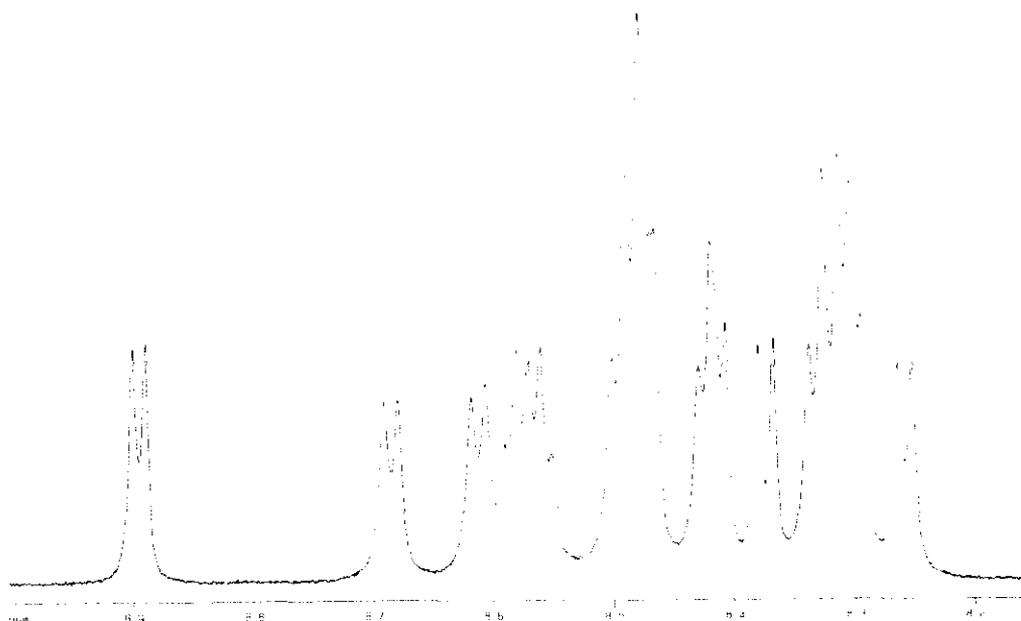


Figura 3.3.2 Espectro monodimensional del fragmento 2-19. Condiciones: 5mM, pH=3.0, 5°C.

El análisis de los espectros NOESY y ROESY se vió muy dificultado por el gran solapamiento de las señales tanto en la región α N como en la NN. En la figura 3.3.3 se muestra la región α N del espectro ROESY. Se observan tres NOEs del tipo $d\alpha N(i,i+2)$ entre los residuos 7-9, 8-10 y 13-15, que indican la existencia de conformaciones de tipo giro β . Otros NOEs del mismo tipo en otras regiones de la cadena no serían detectados, de estar presentes, debido al solapamiento con otras señales. Además se observan contactos entre las cadenas laterales de la Tyr3 y la Leu5 y entre las cadenas laterales y el esqueleto de los residuos 6-9, 7-9 y 7-10, que confirman la presencia de estructuras

locales en esta región del péptido (figuras 3.3.4). La figura 3.3.5 resume los NOEs observados.

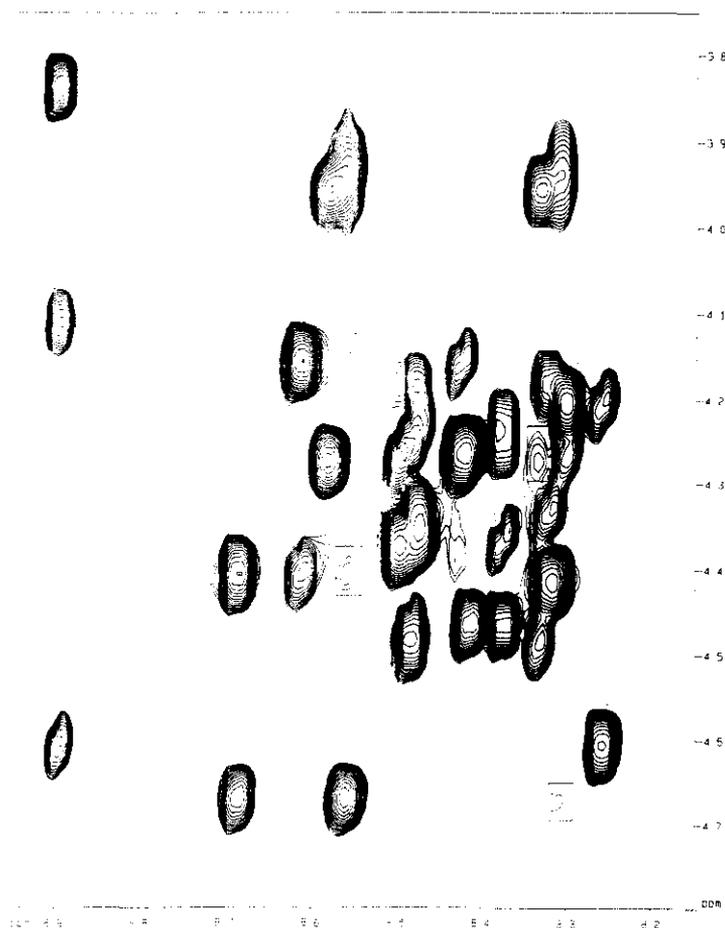


Figura 3.3.3. Región αN del Espectro ROESY ($t_m=200ms$) del fragmento 2-19 de la proteína G. Condiciones como en la figura 3.3.2.

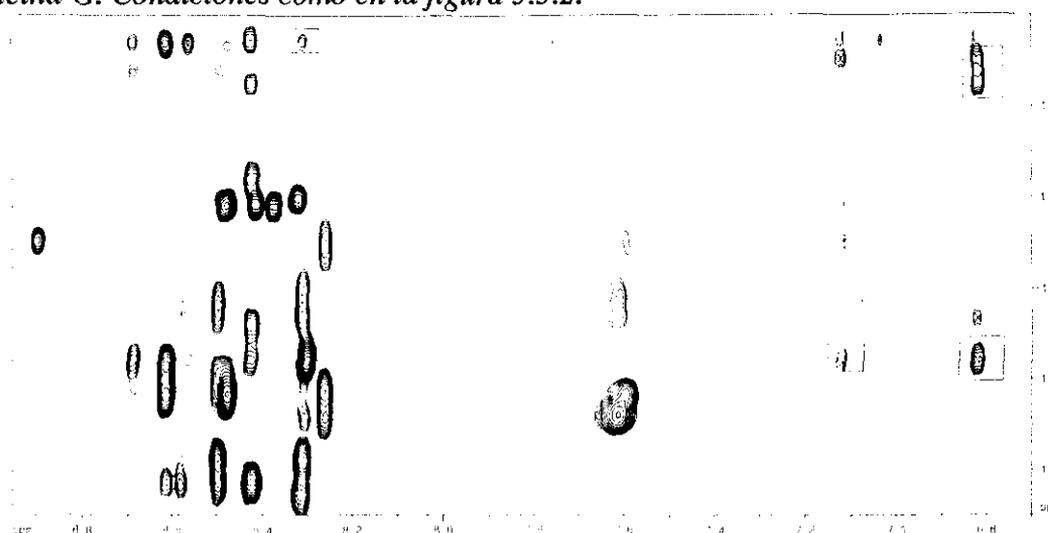


Figura 3.3.4. Región del espectro ROESY donde se observan los NOEs entre las cadenas laterales de los residuos 3-5.

Tabla 3.3.II. *Coefficientes de temperatura (α , en ppb/K) del fragmento 2-19 de la proteína G.*

Residuo	Condiciones		
	H ₂ O, pH=3.0	H ₂ O, pH=5.0	Urea 6M, pH=5.0
Trh2	---	---	---
Tur3	-8.2	-7.3	-7.3
Lys4	-5.0	-4.6	-7.8
Leu5	-7.8	-6.8	-8.2
Ile6	-8.7	-7.8	-10.0
Leu7	-8.7	-8.2	-8.7
Asn8	-8.7	-6.4	-9.6
Gly9	-6.7	-6.0	-6.8
Lys10	-6.7	-6.4	-7.3
Trh11	-7.8	-7.3	-8.2
Leu12	-7.8	-7.8	-8.2
Lys13	-7.8	-7.3	-8.7
Gly14	-7.8	-7.8	-8.2
Glu15	-5.5	-4.1	-5.5
Trh16	-7.8	-7.8	-8.2
Trh17	-7.8	-7.3	-7.3
Thr18	-7.3	-6.8	-7.3
Glu19	-8.1	-7.3	-7.8

Discusión.

En este péptido se observan al menos tres estructuras plegadas locales aunque con una población muy pequeña. En la región 6-10 del péptido existe muy probablemente una conformación del tipo de un giro β , que se manifiesta en los NOEs no secuenciales, y en las intensidades de los NOEs secuenciales. Una interpretación alternativa, aunque menos probable por la ausencia de NOEs $d\alpha N(i,i+3)$, es la existencia de un inicio de una vuelta de hélice 3_{10} . El NOE del tipo $d\alpha N(i,i+2)$ y el coeficiente de temperatura del Glu15, indican que existe otro giro β entre los residuos 12-15. La interacción entre las cadenas laterales de la Tyr3 y la Leu5 sugiere que en el extremo N-terminal la cadena tiene gran preferencia por una estructura extendida. Las variaciones de las intensidades de los NOEs y los coeficientes de temperatura parecen indicar que las conformaciones plegadas se estabilizan al aumentar el pH y se desestabilizan en presencia de urea, aunque los cambios

son pequeños. La gran variación del coeficiente de temperatura de la Lys4 con la urea puede deberse a una reorientación del anillo aromático de la Tyr3.

La presencia de un giro β , solapando con la región del giro nativo es la característica más importante de este péptido. Sin embargo, la población de esta estructura es muy pequeña, existe otro giro β en los residuos 12-15 y otros posibles giros no serían detectables debido al gran solapamiento de señales en los espectros, con lo cual no es posible afirmar con seguridad que esta estructura sea especialmente relevante en el plegamiento de la proteína.

3.4. Fragmento 63-74 de la ribonucleasa A.

La ribonucleasa A de páncreas bovino es uno de los enzimas mejor conocidos, tanto a nivel estructural como funcional. Su estructura tridimensional ha sido estudiada en detalle por difracción de rayos X (Kantha, 1967) y por RMN (Rico, 1991; González, 1991). Esta proteína se ha utilizado como modelo para el estudio del plegamiento de proteínas, mediante diversas estrategias. La estructura en disolución de los fragmentos correspondientes a las tres hélices de la ribonucleasa, se ha estudiado por RMN (Nieto, 1983; Jiménez, 1987; Jiménez, 1988) encontrándose una población significativa de estructura nativa en todas ellas aunque con diferente estabilidad. En un estudio análogo con el fragmento 112-124, que corresponde a un giro β de tipo VIb (residuos 112-115) seguido de una hebra de la lámina β antiparalela, no se encontró evidencia experimental de la formación del giro nativo. Los giros 112-115 y 91-94 han sido estudiados en disolución acuosa y en cristales utilizando tripéptidos correspondientes a los tres últimos residuos del giro (Montelione, 1984) encontrándose una estructura de tipo giro β en el primero y estructura extendida en el segundo. Estos dos diferentes trabajos se han basado casi exclusivamente en resultados obtenidos con técnicas de RMN monodimensional y, por tanto, cabe pensar que no sean definitivos.

Existe otro giro β en la ribonucleasa A (residuos 65-68) en la región 61-74, que forma una estructura de tipo horquilla β conectando la tercera hélice con una de las hebras de la lámina β . Este segmento de la proteína está muy bien definido en la estructura en disolución y contiene dos cisteínas que forman un puente disulfuro en la proteína nativa.

El fragmento 63-74 se ha seleccionado para el estudio de su conformación como continuación de los trabajos ya realizados. La presencia de un puente disulfuro muy próximo en la secuencia al giro β ofrece la posibilidad de estudiar el efecto de esta interacción en la conformación del péptido aislado. Por ello se han mantenido, además de los residuos del giro, el puente disulfuro y dos residuos más a cada lado. La estructura del péptido en disolución acuosa en sus formas reducida y oxidada se describe a continuación.

Resultados.

Fragmento 63-74 oxidado.

La región correspondiente a los protones amida del espectro monodimensional de este péptido se muestra en la figura 3.4.1. Se pueden distinguir algunas impurezas

aunque están en proporción muy pequeña. Las señales están bastante dispersas, la naturaleza cíclica del péptido debe producir entornos químicos diferentes para cada uno de los protones a través de estructuras preferentes. La señal de la Gln 69 es más ancha que las demás, por lo que se puede pensar que está directamente implicada en una estructura local plegada, las constantes de acoplamiento $^3J_{H\alpha-NH}$, salvo la de la Ala64, tienen valores típicos de péptidos con diferentes conformaciones en equilibrio. La asignación de todas las resonancias y las constantes de acoplamiento se encuentran en la tabla X del apéndice.

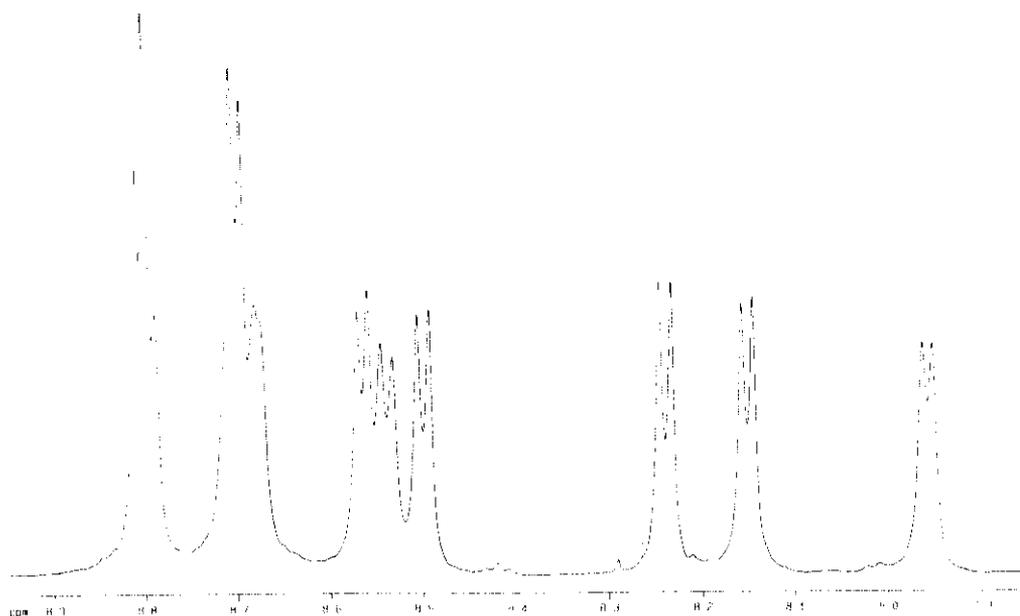


Figura 3.4.1. Espectro monodimensional del fragmento 63-74 de la ribonucleasa. Condiciones: 10mM, pH=3.3, 5°C.

Los espectros de dicroísmo circular en diferentes condiciones se muestran en la figura 3.4.2. A pH=3.0 se observa una banda positiva a 218nm que se desplaza ligeramente hacia el rojo en presencia de urea 6M y disminuye algo en intensidad al añadir NaCl 1M al medio. Estos cambios son pequeños y sugieren que la estructura del péptido es la misma en las tres condiciones.

En el espectro NOESY que se muestra en la figura 3.4.3, se observan dos NOEs $\alpha N(i,i+2)$ entre los residuos 67-69 y 70-72. Los coeficientes de temperatura de los protones amida de la Gln 69 y de la Cys72 se encuentran fuera del rango de los medidos en los tetrapéptidos modelo de péptidos sin estructura (tabla 3.4.I), indicando una accesibilidad reducida al disolvente de estos protones. Especialmente reducida es la de la Gln69 con un coeficiente de -2.1ppb/K. Estos resultados demuestran que el péptido forma dos giros β entre los residuos 66-69 y 69-72.

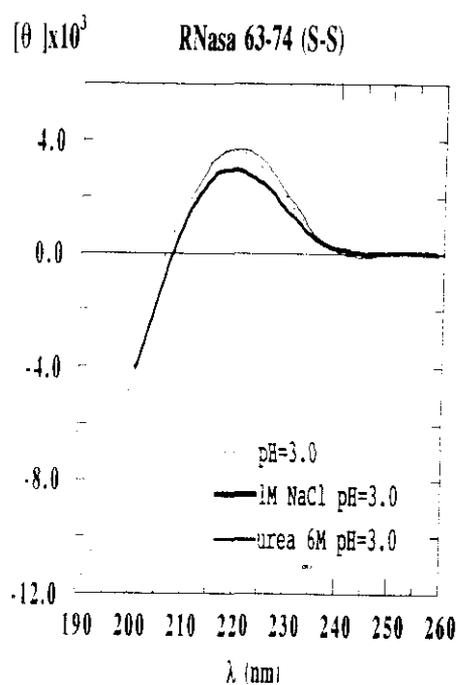


Figura 3.4.2. Espectros de dicroísmo circular a 5°C.

Tabla 3.4.1. Coeficientes de temperatura (α , en ppb/K) del fragmento 63-74 de la ribonucleasa A.

Residuo	Condiciones		
	forma oxidada H ₂ O, pH=3.0	forma reducida H ₂ O, pH=3.0	forma oxidada NaCl 0.2M, pH=4.0
Val63	---	---	---
Ala64	-6.9	-6.6	-6.8
Cys65	-8.8	-10.3	-8.9
Lys66	-7.4	-8.3	-7.7
Asn67	-7.8	-8.7	-7.8
Gly68	-6.9	-7.2	-7.1
Gln69	-2.1	-4.9	-2.3
Trh70	-8.6	-7.2	-8.8
Asn71	-6.1	-6.7	-6.4
Cys72	-4.2	-5.7	-4.3
Tyr73	-8.8	-7.3	-9.3
Gln74	-7.3	-6.4	-7.2

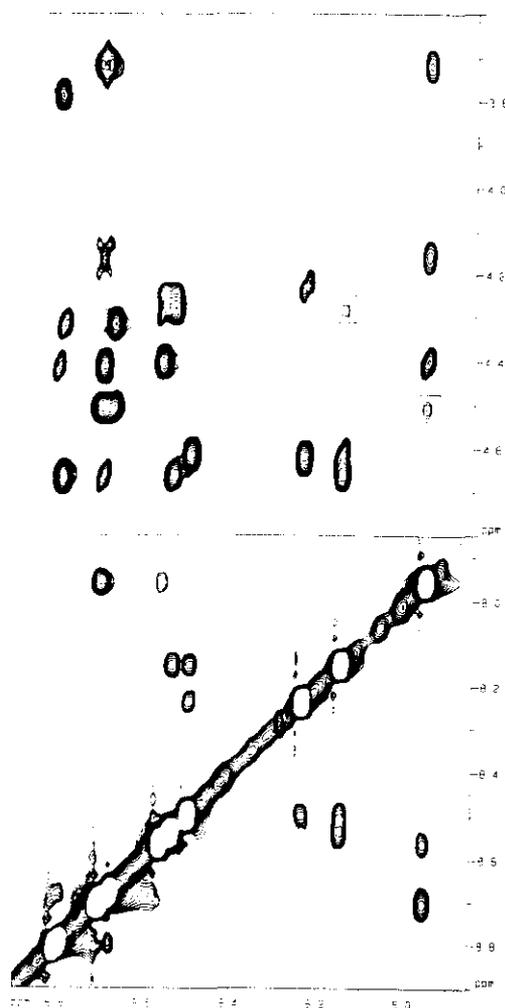


Figura 3.4.3. Espectro NOESY ($t_m=200ms$) del fragmento 63-74 de la ribonucleasa. Condiciones como en la figura 3.4.1.

En el péptido aislado no se observan NOEs del tipo $d\alpha\alpha(i,j)$ o $d\alpha N(i,j)$, con lo que parece que la lámina β no se forma. Sí se observan más NOEs consistentes con la estructura de giros β . En concreto se pueden ver NOEs del tipo $d\beta N(i,i+4)$ entre los residuos 65-69, $dN\beta(i,i+3)$ 66-69 y $d\beta\beta(i,i+4)$ 65-69, como se puede ver en el espectro ROESY de la figura 3.4.4. obtenido en las mismas condiciones en que se determinó la estructura tridimensional de la ribonucleasa (pH=4.0, NaCl 0.2M) y donde se ven los mismos NOEs que en agua a pH=3.3. La figura 3.4.5 resume los NOEs observados.

puentes disulfuro en proteínas (Glazer, 1975). En 1ml de tampón 50mM Tris, 2mM EDTA a pH=8.1, se disolvieron 7mgr de liofilizado (5.7 mgr de péptido) y se añadieron 19mgr de DTT (relación molar DTT:péptido = 20:1). La disolución se mantuvo a 25°C con burbujeo de N₂ y se siguió el avance de la reacción por HPLC. El cromatograma a los cinco minutos de añadir el DTT y a las tres horas es prácticamente el mismo (figura 3.4.6) aunque con el tiempo aparece un precipitado blanco. Se acidificó el medio con ácido trifluoroacético antes de cortar el burbujeo de nitrógeno, se añadieron 0.5ml de acetonitrilo para disolver el precipitado, y se procedió a la separación del péptido reducido. Esta se realizó en columna analítica con inyecciones de 60 a 100µl obteniéndose finalmente un liofilizado de 1.5mgr con el que se preparó una muestra 2.3mM para el estudio por RMN. A esta muestra se le añadió 0.1mgr de DTT (proporción molar péptido:DTT = 1:1), se ajustó el pH a 1.9 y se introdujo nitrógeno en el espacio libre del tubo de muestra para evitar la reoxidación del péptido.

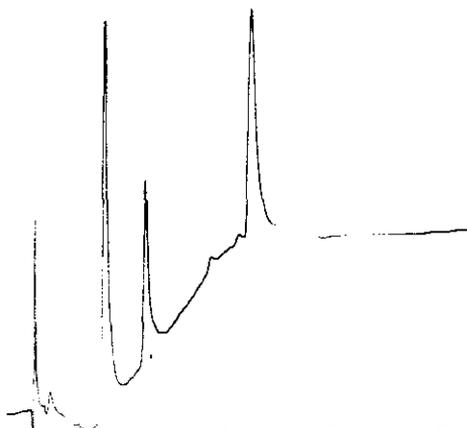


Figura 3.4.6. Cromatograma de HPLC a las dos horas de añadir el DTT. Los dos primeros picos son del DTT y el segundo corresponde al fragmento 63-74 reducido.

La figura 3.4.7 corresponde a la zona de los protones amida del espectro monodimensional del péptido reducido. Las señales son más estrechas que las del péptido ciclado, sobre todo la de la Gln69, y la dispersión es menor. La forma de la línea base indica que hay impurezas en la muestra. Los desplazamientos químicos se encuentran en la tabla XI del apéndice.

En la figura 3.4.8 se puede ver la región αN del espectro ROESY de este péptido. Además de NOEs secuenciales intensos y NOEs intra residuo, se observa un NOE del tipo αN(i,i+2) entre los residuos 67-69. Este NOE, junto con el coeficiente de temperatura del protón NH de la Gln69 (-4.9ppb/K), ligeramente por debajo del rango medido en los tetrapéptidos GGXA, indica que existe una población, pequeña pero significativa de conformaciones con estructura de giro β entre los residuos 66-69. En la figura 3.4.9 se puede ver el resumen de NOEs.

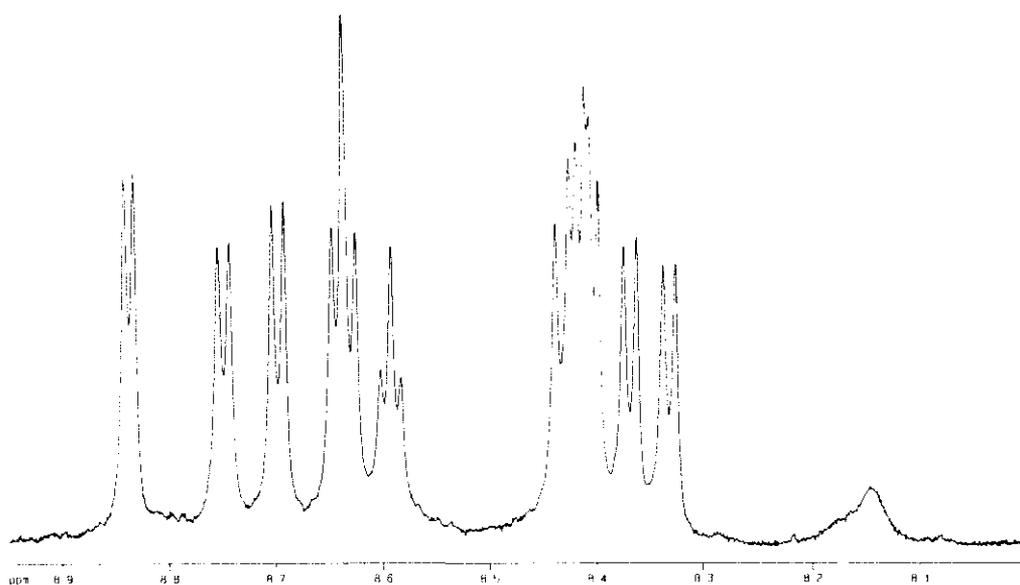


Figura 3.4.7. Espectro monodimensional del fragmento 63-74 reducido. Condiciones: 2.3mM, pH=1.9, 5°C.

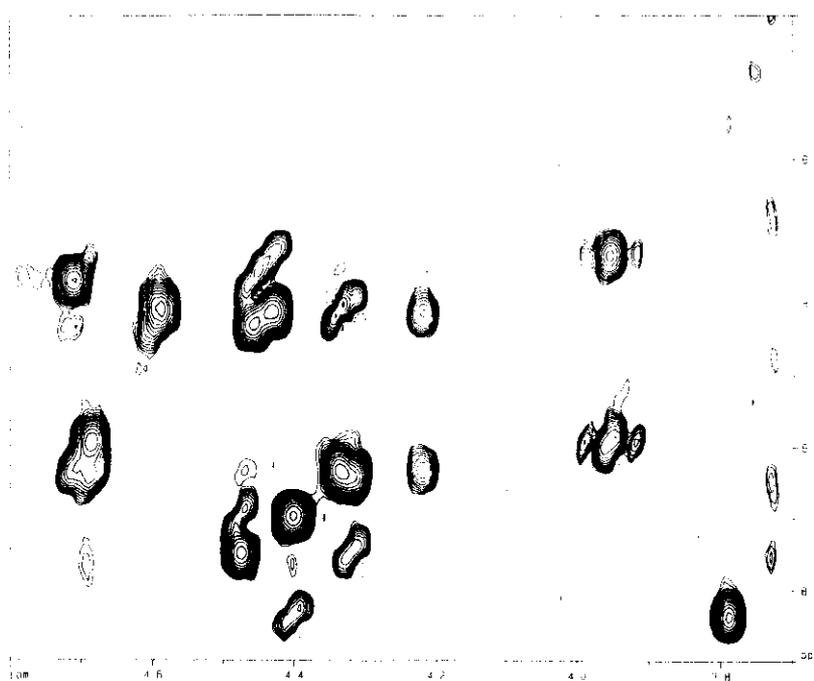


Figura 3.4.8. Espectro ROESY ($t_m=120ms$) del fragmento 63-74 reducido. Condiciones como en 3.4.7.

Discusión.

El puente disulfuro que contiene el fragmento en la proteína nativa, cierra un ciclo de siete aminoácidos y estabiliza fuertemente conformaciones plegadas en el péptido. Este hecho no es nada sorprendente, sin embargo, conviene destacar dos características relevantes en cuanto a las propiedades conformacionales intrínsecas de la secuencia de aminoácidos:

- la estructura del péptido no es rígida; existen varias conformaciones en equilibrio, de las cuales las más pobladas son las que incluyen dos giros β en los segmentos 66-69 y 69-72,

- la localización del giro más estable, 66-69, no coincide exactamente con el giro nativo (65-68), en las mismas condiciones, en las que se estudió la estructura de la proteína.

En su forma reducida, el péptido todavía tiene una preferencia significativa por formar un giro β entre los residuos 66-69, aunque su estabilidad es muy pequeña en comparación con la del péptido ciclado. El segundo de los giros no se forma en una proporción suficiente como para ser detectado.

Estos resultados indican que los determinantes de la formación del giro nativo se encuentran en la secuencia de aminoácidos local, el puente disulfuro estabiliza este giro y otras estructuras aunque en menor medida. La localización del giro en la estructura final, sin embargo, puede desplazarse un residuo como consecuencia del ajuste necesario para la adquisición de una estructura compacta.

3.5. Fragmento 245-260 de la termolisina.

Los lazos de las estructuras proteicas forman una clase de estructura secundaria no repetitiva muy heterogénea que sólo recientemente se ha estudiado con cierto detalle (Leszczynski, 1986; Ring, 1992). Estos elementos estructurales suelen estar en la superficie, participar en la función de la proteína y muchos de ellos son bastante compactos en las estructuras determinadas por difracción de rayos X. Una clasificación de estos lazos en tres grupos morfológicos sugieren la existencia de periodicidad en la hidrofobicidad de la secuencia y de preferencias posicionales, aunque no tan marcadas como en las hélices, láminas y giros β . Estas características han llevado a proponer que los lazos pueden ser importantes para el modelado de proteínas y que el estudio de sus propiedades conformacionales, aislados en disolución, podría revelar la presencia de estructuras nativas importantes para el plegamiento de la proteína.

El fragmento 245-260 de la termolisina conecta las dos primeras hélices del dominio C-terminal de la termolisina y forma un lazo de tipo Ω (nombre que hace referencia a su similitud morfológica con la letra griega omega) en el que los residuos 248 y 255 están próximos en el espacio (Leszczynski, 1986). Este fragmento aislado se ha estudiado en agua y en 30%TFE en un trabajo conjunto con las cuatro hélices del dominio C-terminal de la termolisina (Jiménez, 1992) encontrándose que su estructura es básicamente flexible, a diferencia de las cuatro hélices que adoptan grandes poblaciones de la estructura nativa.

Resultados.

La solubilidad de este péptido fue suficiente para preparar muestras de concentración 3.7mM. El espectro monodimensional de la figura 3.5.1 se puede ver la zona de los protones NH. La presencia de una impureza produce la señal intensa a 8.24ppm. otra señal ancha a 8.60ppm y a señales finas a 1.19 y a 3.20ppm. Esta y otras impurezas se localizaron durante el análisis de los espectros bidimensionales en diferentes condiciones para no confundir sus señales con las del péptido. Las manipulaciones excesivas de la muestra al justar el pH aumentaban su viscosidad. En los espectros se usó una preparada a pH=2.5 y la posible presencia de agregación se comprobó con una muestra 0.05mM donde no se observaron cambios significativos en los desplazamientos químicos ni en la anchura de línea.

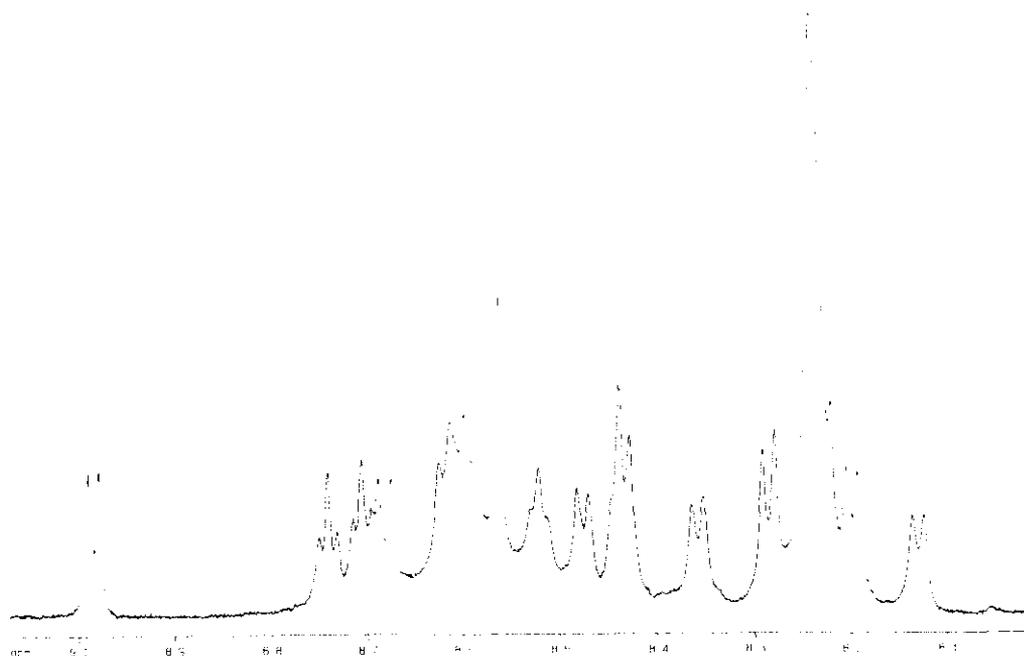


Figura.3.5.1. *Espectro monodimensional del fragmento 245-260 de la termolisina. Condiciones: 3.7mM, pH=2.5, 5°C.*

Los espectros de DC de éste péptido en diferentes condiciones se muestran en la figura 3.5.2. El espectro en agua a pH=2.5 ya 5°C es típico de péptidos sin estructura, y se afecta muy poco con la adición de urea y el aumento de temperatura.

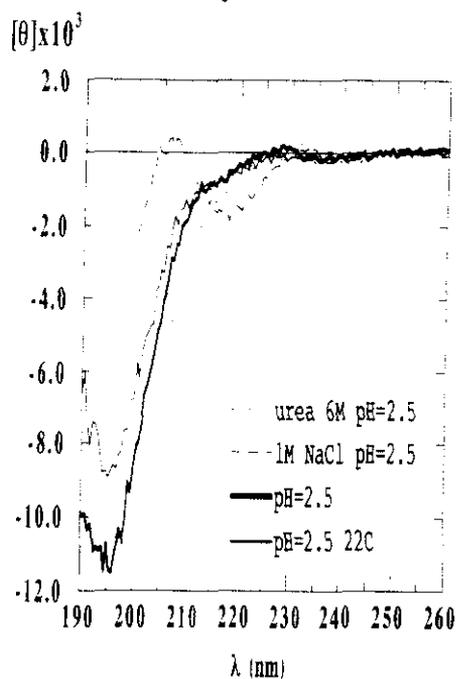


Figura 3.5.2. *Espectros de dicroísmo circular del fragmento 245-260 de la termolisina.*

Los coeficientes de temperatura de los protones amida están todos en el rango de valores típicos de péptidos sin estructura (tabla 3.5.I). Las relaciones de intensidad de los NOEs αN intrarresiduo y secuenciales son todas pequeñas. Un poco mayores que el resto son las del enlace 250-251 y 258-259, y las de los enlaces con Gly en primera posición (debido a que la Gly tiene dos protones $\text{H}\alpha$). En presencia de urea las intensidades de los NOEs los valores de los coeficientes de temperatura cambian muy poco como se puede ver en la tabla 3.5.I.

Tabla 3.5.I. Coeficientes de temperatura (α) y relaciones de intensidad de los NOEs secuenciales e intrarresiduo del fragmento 245-260 de la termolisina.

Residuo i	α_i (ppb/K)		$I_{\alpha\text{N}(i,i)}/I_{\alpha\text{N}(i,i+1)}$	
	H ₂ O	Urea 6M	H ₂ O	Urea 6M
Ser245	---	---		
Qln246	-6.7	-6.7	0.13	0.20
Gly247	-8.3	-8.3		
Gly248	-6.7	-6.0		
Thr249	-7.0	-7.3	0.18	0.18
His250	-7.3	-7.0	0.35	0.26
Tyr251	-8.0	-7.7	0.42	
Gly252	-7.3	-7.0	0.92	1.06
Val253	-7.7	-7.3	0.20	
Ser254	-8.7	-7.7	0.26	0.20
Val255	-10.0	-9.0	0.38	0.22
Val256	-8.7	-8.0	0.20	0.21
Gly257	-8.3	-7.7	1.40	0.85
Ile258	-9.0	-7.7	0.40	
Gly259	-8.3	-7.3	1.59	1.51
Arg260	-7.7	-7.3		

Discusión.

Los NOEs $\alpha\text{N}(i,i+2)$ observados, pueden interpretarse con la existencia de conformaciones de tipo giro β en la región 253-258. Sin embargo estos NOEs son extraordinariamente débiles, sólo algo más intensos que el ruido en el ROESY, lo que indica que ese giro está muy poco poblado. Las intensidades de los NOEs secuenciales e

intrarresiduo en promedio son típicas de péptidos sin estructura, con alguna excepción como las del enlace 250-251. Los contactos observados entre las cadenas laterales de los residuos 249-251 y 251-255 indican la presencia de conformaciones preferentes en esta región, pero no es posible relacionarlas con la estructura nativa que se caracteriza por la proximidad espacial entre los residuos 248-255.

Capítulo 4.

Estudio conformacional de péptidos con
secuencias diseñadas.

Introducción.

El diseño de péptidos y proteínas es una forma de avanzar en el conocimiento de las reglas del plegamiento y poner a prueba los conocimientos adquiridos (Richardson, 1989, Regan, 1991). Esta estrategia comenzó con los trabajos de Gutte y col. (1975), y ha recibido un gran impulso desde entonces con resultados muy esperanzadores.

En el diseño de proteínas hay varias líneas de trabajo:

- diseño asistido por plantillas, en el que se usan pequeños soportes (peptídicos y no peptídicos) que facilitan la interacción entre las cadenas ancladas a ellos (Mutter, 1989; Sasaki, 1989; Ghadiri, 1992),
- aproximación minimalista, que sigue una estrategia modular, optimizando la propiedades de plegamiento y asociación de un elemento de estructura secundaria con una secuencia muy simple, con sólo 5 o 6 tipos de aminoácidos (DeGrado, 1989),
- diseño de secuencias como las naturales, que busca reproducir los motivos estructurales observados en proteínas, con secuencias de composición de aminoácidos similar a las nativas (Richardson, 1987, Goraj, 1990).

Los resultados de estos trabajos han tenido un éxito relativo. En las proteínas diseñadas se ha encontrado gran cantidad de estructura secundaria compatible con los objetivos del diseño, pero la determinación de la estructura tridimensional no ha sido posible aún. Muchas de ellas se comportan como glóbulos fundidos, con una estructura muy flexible.

El diseño de péptidos, se ha empleado con los mismos fines que el de proteínas, le ha servido de base, y ha sido muy útil en aplicaciones prácticas como el desarrollo de péptidos con importantes funciones biológicas (DeGrado, 1988).

La experimentación con secuencias naturales y diseñadas, ha permitido llegar a un conocimiento incipiente de las características básicas que determinan la estabilidad de las hélices α (Baldwin, 1992), de tal forma, que el diseño de una secuencia que forme una población apreciable de hélice en disolución acuosa es relativamente sencillo.

En el caso del diseño de secuencias que formen láminas y giros β , los únicos éxitos se han conseguido con péptidos cíclicos de unos pocos aminoácidos. El diseño de láminas β aisladas, se ha visto dificultado por los problemas de solubilidad de las secuencias que tienden a formar agregados inespecíficos en disolución acuosa. En disolventes orgánicos se han conseguido caracterizar láminas β intermoleculares en moléculas pseudo-peptídicas modelo (Kemp, 1990). Péptidos cíclicos de cinco a seis aminoácidos han sido muy utilizados como modelos de giros β , y se ha obtenido

información valiosa acerca de la influencia de los aminoácidos en la geometría del giro, sin embargo los únicos péptidos lineales no naturales con alta población de estructura de giros β en disolución acuosa son modificaciones de la secuencia natural estudiada por Wright y col. (1988) que no forma un giro en la proteína nativa.

En los fragmentos de proteínas estudiados en esta tesis, se ha detectado la presencia de giros β con una localización muy próxima a la del giro nativo, sin embargo, la formación de la lámina β , antiparalela presente en la estructura nativa de la mayoría de ellos no se ha observado probablemente debido a la baja estabilidad de los giros. Con el objetivo de encontrar una secuencia capaz de formar un giro β estable, y comprobar su capacidad de dirigir el plegamiento del resto de la cadena hacia la formación de una lámina β antiparalela (estructura de horquilla β) se han diseñado dos péptidos con diferentes secuencias.

El primero de ellos tiene la secuencia **Ac-LKLKLGDSLKLLK-NH₂**, en la que los residuos centrales (GDS) se han encontrado un gran número de veces en giros β en proteínas en una estadística que relaciona patrones de secuencias de hasta cinco aminoácidos con la estructura secundaria en proteínas (Rooman, 1988), y los extremos siguen la regla básica del diseño de láminas β antiparalelas: la alternancia de residuos hidrofílicos e hidrofóbicos (Richardson, 1987). Las secuencias lineales alternantes de leucinas y lisinas son suficientemente solubles en agua y han podido ser estudiadas en disolución acuosa por dicroísmo circular encontrándose que forman láminas β intermoleculares en presencia de sales que apantallan las cargas de las lisinas (Barbier, 1989).

El segundo tiene la secuencia **YQNPDGSQA** (figura 4.1), que se ha construido reemplazando los residuos centrales del fragmento 15-23 del tendamistat (SWRY, los que forman el giro β en la proteína nativa) por los aminoácidos con la máxima probabilidad de ocupar cada una de las cuatro posiciones de un giro β de tipo I en proteínas (Wilmot, 1988). A este péptido nos referiremos de aquí en adelante como betamax (giro *beta* de máxima probabilidad).

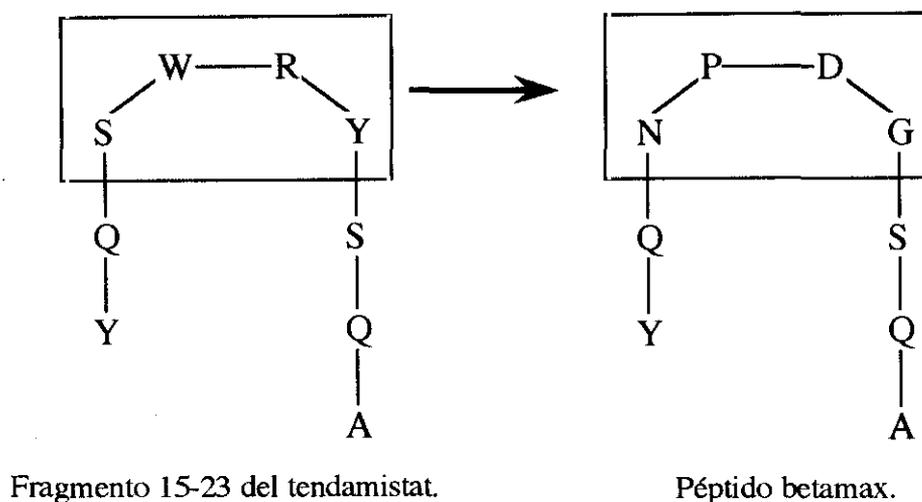


Figura 4.1. *Diseño del péptido betamax.*

Resultados.

Péptido Ac-LKLKLGDSLKCLK-NH₂.

El espectro monodimensional de este péptido se puede ver en la figura 4.2. La concentración de las 15 señales de los protones NH en un rango de 0.7ppm, hace pensar que el péptido está en un equilibrio conformacional sin estructuras plegadas significativamente pobladas. La solubilidad de este péptido fue suficiente para preparar muestras de concentración 10mM. Pequeñas adiciones de NaOH y HCl aumentaban la viscosidad de la muestra, lo que indica que la presencia de sal provoca la formación de agregados intermoleculares. En los espectros se usó una muestra disolviendo el péptido liofilizado en agua. La medida del pH dio un valor de 3.0. La asignación de todas las resonancias del espectro se puede ver en la tabla XIII del apéndice.

Los coeficientes de temperatura de las señales de los protones amida están todos en el rango de los medidos en los péptidos modelo de péptidos sin estructura (tabla XV del apéndice).

En los espectros NOESY y ROESY, se observan dos NOEs $d\alpha N(i,i+2)$ entre los residuos 8-10 y 9-11 y un NOE del tipo $d\alpha N(i,i+3)$ entre los residuos 8-11. Estos NOEs indican que en la región central del péptido se forman estructuras de tipo giro β o quizás una vuelta de hélice 3_{10} (por la presencia del NOE $d\alpha N(i,i+3)$), aunque el solapamiento de las señales impide ver NOEs del mismo tipo en otras regiones del péptido. Esto impidió también la integración de las intensidades de los NOEs intrarresiduo y secuenciales. El resumen de NOEs se muestra en la figura 5.3 y el espectro ROESY en la figura 5.4.

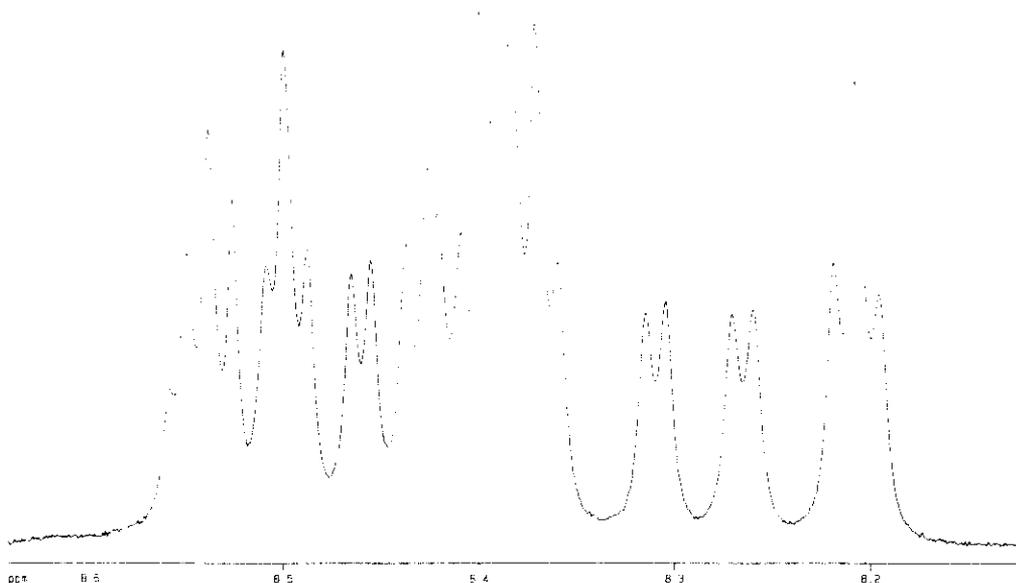


Figura 5.2 Espectro monodimensional del péptido *Ac-LKLKLGDSLKLLK-NH₂*.
Condiciones: 10mM, pH=3.0, 5°C, pH=3.0, 5°C.



Figura 5.3. Resumen de NOEs observados péptido *Ac-LKLKLGDSLKLLK-NH₂*.

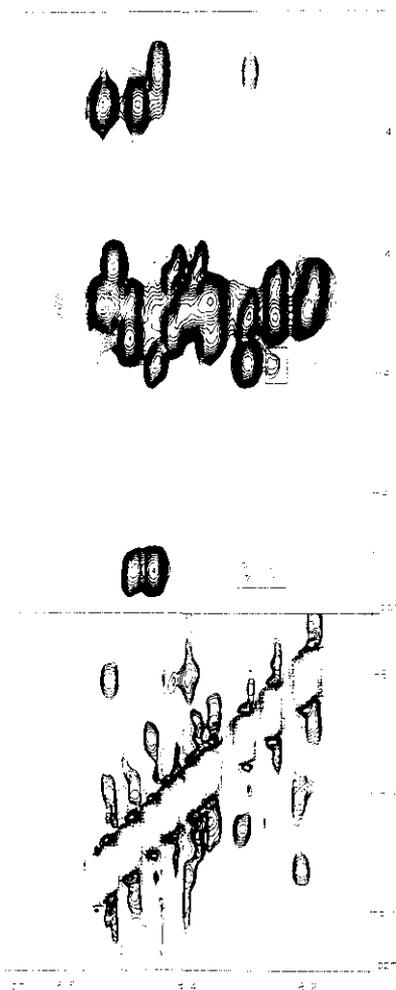


Figura 5.4. Espectro ROESY ($t_m=200ms$) del péptido *Ac-LKLKLGDSLKLLK-NH₂*. Condiciones: 10mM, pH=3.0, 5°C, pH=3.0, 5°C,.

Péptido betamax.

La figura 5.5 corresponde a la región de los protones NH del espectro monodimensional de este péptido, que están bastante dispersas. Se puede observar también un conjunto de señales de menor intensidad. Algunas de ellas corresponden al isómero cis del enlace Asn-Pro (un 7% aproximadamente del isómero trans) y otras pertenecen a impurezas que no se han podido identificar. Se intentó purificar el péptido por HPLC, pero, aun en condiciones isocráticas, no fue posible resolver la mezcla.

Los espectros de DC del péptido en diferentes condiciones se muestran en la figura 5.6. A pH=6.0 el espectro es típico de péptidos sin estructura. A pH=3.0 se observa la banda positiva a 230nm que ya se veía también en los fragmentos del tendamistat, y cambia ligeramente en presencia de urea. A pH=3.0 y 1M NaCl el espectro es como a pH=6.0 sin sal.

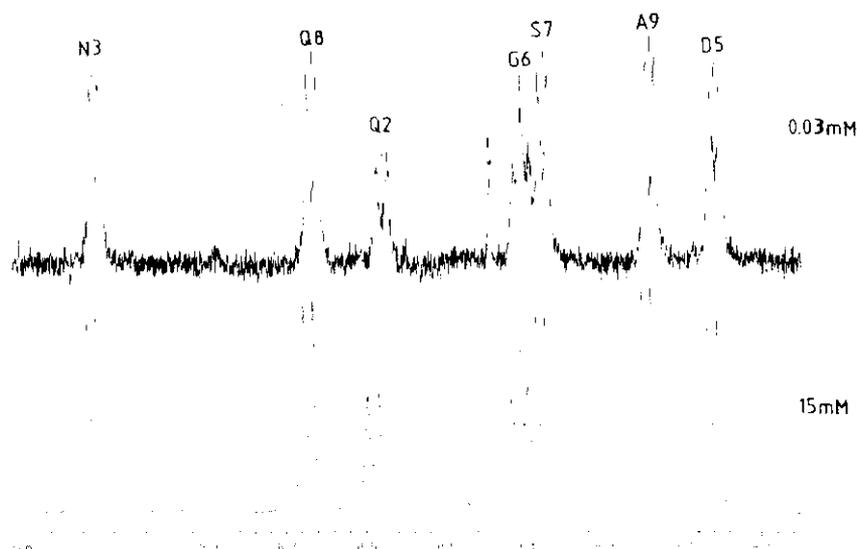


Figura 5.5. Espectros monodimensionales del péptido betamax a $\text{pH}=5.3$, 5°C .

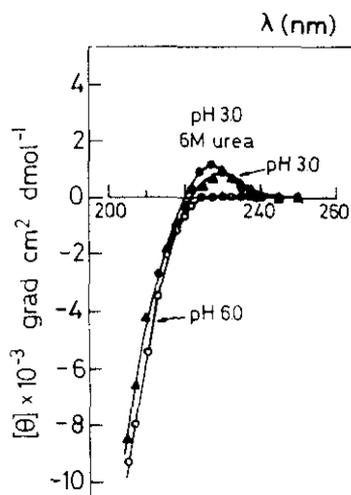


Figura 5.6. Espectros de dicroísmo circular del péptido betamax a 5°C .

El análisis de los espectros de RMN bidimensional de este péptido resultó muy complicado por la presencia de tres conjuntos de señales. La asignación del péptido mayoritario se realizó sin problemas, pero la del isómero cis requirió realizar espectros en diferentes condiciones de pH, temperatura y en presencia de urea. La combinación de estos diferentes espectros permitió también no confundir las señales de la impureza (de naturaleza peptídica, pues dan señales en las mismas regiones que el péptido mayoritario), con los NOEs no secuenciales del péptido debidos a estructuras plegadas. En los espectros NOESY y ROESY (figura 5.7) se observa un gran número de NOEs no secuenciales (hasta $i, i+8$) inusuales para un péptido lineal de nueve residuos.

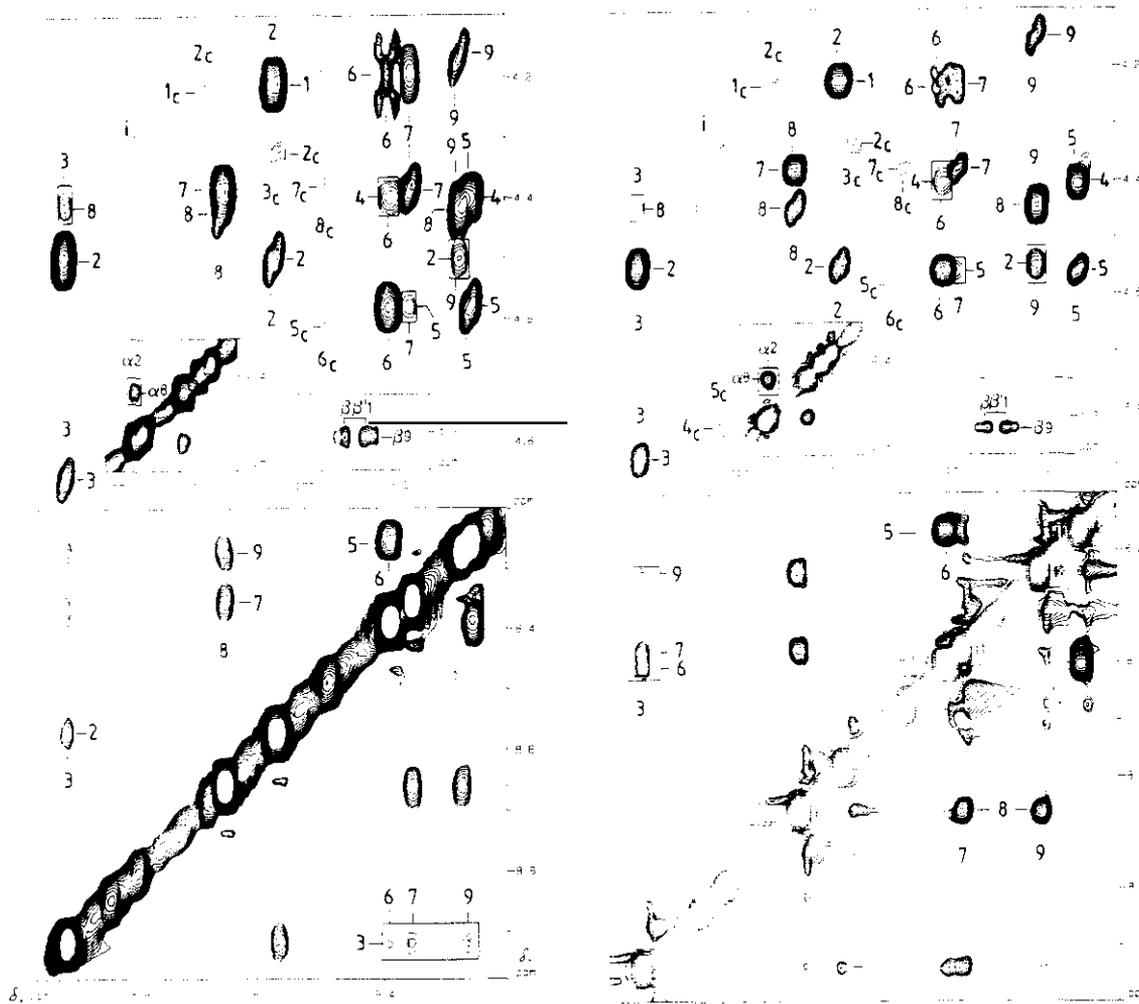


Figura 5.7. Espectros NOESY y ROESY del péptido betamax. Condiciones: 15mM, 5°C, a) NOESY $t_m=250ms$, pH=4.3, b) ROESY $t_m=200ms$, pH=5.3.

La presencia de un NOE del tipo $d\alpha N(i,i+2)$ entre los residuos 4-6 de intensidad media y un NOE secuencial $dNN(5-6)$ intenso indican que existe un giro β entre los residuos 3-6. Los NOEs $d\alpha N(2-9)$, $dN\alpha(3-8)$ y el $d\alpha\alpha(2-9)$ son típicos de láminas β antiparalelas y demuestran la formación de esta estructura. La existencia de contactos entre las cadenas laterales de los residuos 1-9 y 3-9 confirma que los extremos del péptido están próximos en el espacio y que el péptido adopta una estructura de tipo horquilla β . En la figura 5.8 se resumen los NOEs observados.

NOEs (violaciones $<0.2\text{\AA}$) con una RMSD de 2.2\AA para los átomos del esqueleto. Este resultado demuestra que los NOEs observados se pueden explicar con una sola conformación plegada, aunque ésta no sea la única y esté en equilibrio con un conjunto de estructuras desplegadas al azar.

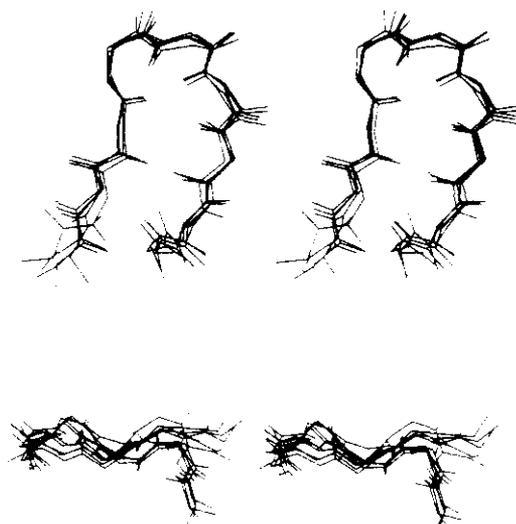


Figura 5.9. *Dos vistas de las cinco conformaciones de menor energía del péptido betamax.*

Con el fin de definir mejor la estructura del conformero plegado, se realizó otro cálculo en el que las intensidades de los NOEs no secuenciales se utilizaron como restricciones fuertes (distancia $>3\text{\AA}$). En las dieciseis estructuras obtenidas la forma global de la molécula no cambiaba pero en algunas de ellas se producían contactos de Van Der Waals no permitidos y no se cumplían doce de las treinta y seis restricciones de distancias incluídas. El cambio de la intensidad de los NOEs $d_{\alpha N(4-6)}$ y $d_{NN(3-6)}$ de fuerte a media (distancia $<4\text{\AA}$) en un nuevo cálculo dio como resultado diecinueve estructuras con una RMSD de 1.4\AA y con violaciones de NOEs $<0.2\text{\AA}$. Con estas estructuras se llevó a cabo una minimización de energía restringida. Las cinco estructuras de menor energía se muestran en la figura 5.9. En ellas se observa un giro β de tipo I en los residuos NPDG y una estructura de lámina β antiparalela en los extremos del péptido algo distorsionada en los residuos 7 y 8. Este resultado confirma la interpretación cualitativa de los NOEs observados que indica la presencia de una estructura de tipo horquilla β altamente poblada en equilibrio conformacional con estructuras extendidas.

A partir de estas estructuras se puede estimar la proporción de estructura plegada en disolución con un modelo de dos estados (horquilla β en equilibrio con cadena lineal extendida) y suponiendo un movimiento isotrópico de la molécula (Bradley, 1990;

Saulitis, 1990). Para ello se utilizaron las relaciones de intensidades que aparecen en la tabla 5.I, y se calculó la proporción de estructura de horquilla β .

Tabla 5.I. Estimación de la población de la conformación plegada.

Relación de intensidades	Porcentaje de estructura plegada
$I_{dNN(4-6)}/I_{d\alpha N(5-6)}$	82
$I_{d\alpha N(4-6)}/I_{d\alpha N(5-5)}$	75
$I_{d\alpha N(4-6)}/I_{d(2H-4H)Tyr1}$	63
$I_{d\alpha N(4-6)}/I_{d(\alpha\alpha)Gly6}$	154
$I_{dN\alpha(8-3)}/I_{d(2H-4H)Tyr1}$	7
$I_{dN\alpha(8-3)}/I_{d\alpha\alpha Gly6}$	17
$I_{d\alpha N(2-9)}/I_{d(2H-4H)Tyr1}$	10
$I_{d\alpha N(2-9)}/I_{d(\alpha\alpha)Gly6}$	25

Las distancias de referencia se toman de una hebra de lámina β y las de la conformación plegada de la distancias medias obtenidas en las cinco estructuras de la figura 5.9. Las estimaciones obtenidas de esta forma pueden mucho error debido al inherente a la integración de los NOEs y a las suposiciones que se han hecho, sin embargo indican claramente que la población del giro β es bastante elevada (entre un 60 y un 80%) mientras que la de la lámina es mucho menor (un 15% aproximadamente).

La estabilidad de esta estructura se ve muy afectada por el pH, de forma que a pH=3.0 los coeficientes de temperatura aumentan (en valor absoluto) y no cambian en presencia de urea (tabla 5.II). Los únicos que tienen valores relativamente pequeños son la Gly6 (-5.1ppb/K) y la Gln2(-4.7ppb/K). Éste último cambia bastante con la adición de urea probablemente debido a una reorientación del anillo aromático de la tirosina 3.

Tabla 5.II. *Coefficientes de temperatura (α , en ppb/K) del péptido betamax.*

Residuo	Condiciones		
	H ₂ O, pH=5.3	H ₂ O, pH=3.0	Urea 6M, pH=3.0
Tyr1	---	---	---
Gln2	-6.9	-4.7	-6.4
Asn3	-8.8	-8.7	-9.3
Pro4	-7.4	-8.3	-7.7
Asp5	-7.8	-5.7	-7.3
Gly6	-6.9	-5.1	-5.4
Ser7	-2.1	-5.7	-6.1
Gln8	-8.6	-8.0	-8.0
Ala9	-7.3	-7.0	-7.3

El único NOE no secuencial que se observa a pH=3.0 es el $\alpha\text{N}(4-6)$ pero de una intensidad 1.4 veces menor que el observado a pH=5.3. Teniendo en cuenta la dependencia de la intensidad del NOE con la distancia y la población estimada a pH=5.3, esto indicaría una población de un 10% de giro β .

El cambio de estructura con el pH se refleja en titulaciones anómalas para los protones NH de los residuos 2,3,7,6 y 8 cuyo desplazamiento químico aumenta al aumentar el pH (figura 5.10). Los protones NH₂ de la Asn3 también titulan anormalmente disminuyendo su desplazamiento en 0.10 y 0.16ppm entre pH=1.5 y 6.7, cuando en el tetrapéptido GGNA estos valores son de -0.04 y 0.03 (Jiménez, 1986). Esto está de acuerdo con el NOE observado entre los protones H β de la Ala9 y NH₂ de la Asn3, que indica una proximidad entre ellos.

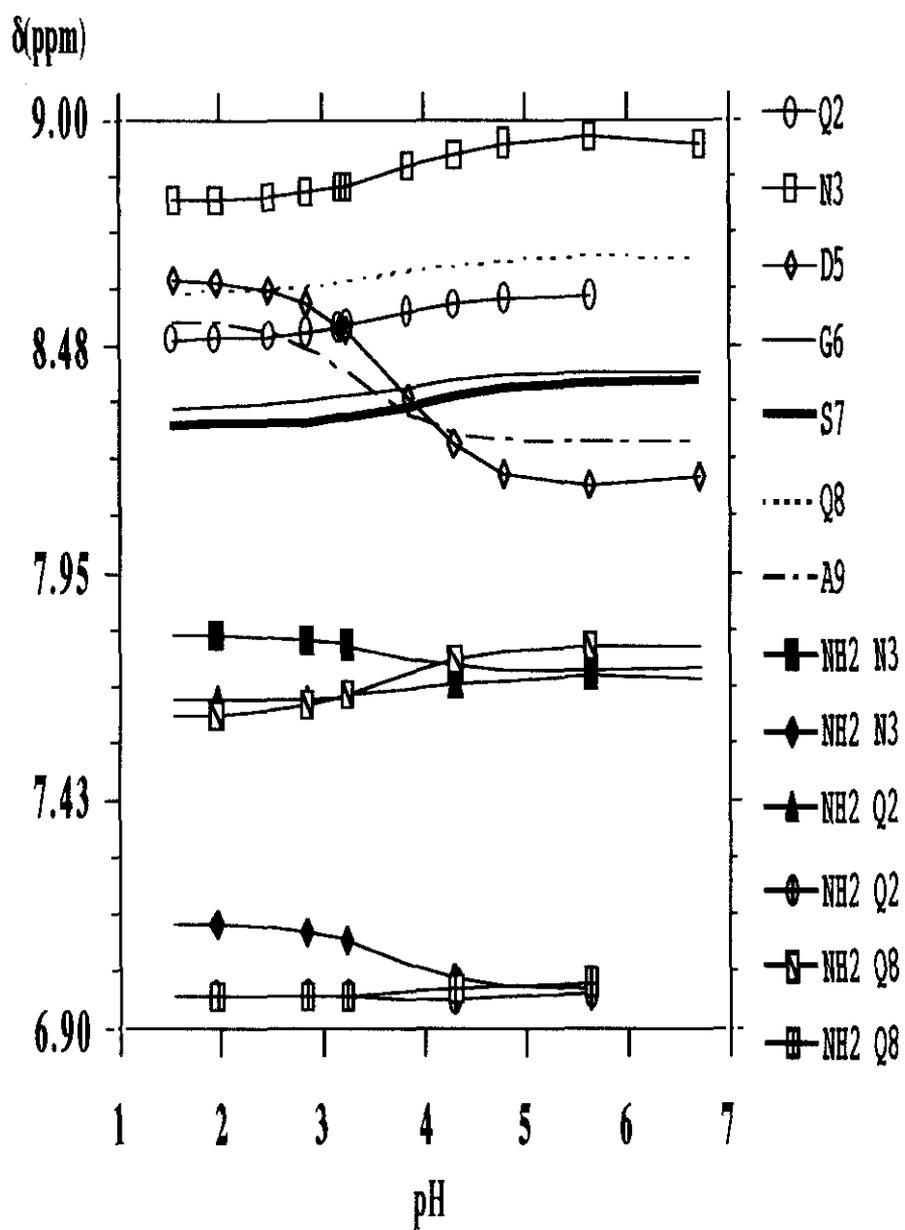


Figura 5.10. Curvas de titulación de los desplazamientos químicos de los protones NH y de los protones NH₂ de las cadenas laterales del péptido betamax.

Tabla 5.III.

Secuencias con alta probabilidad de formar giros β
 Péptido obtenidas con algoritmos de predicción de estructura secundaria.

	Método de Chou y Fasman (1978)	Método de Wilmot y Thornton (1988)
12-26	QADN (1.23)	ADNG (1.64)
15-23	no hay	no hay
[V ²¹]15-23	no hay	no hay
[S ¹⁸]15-23	SSRY (2.80)	SSRY (2.53)
Betamax	NPDG (17.3)	NPDG (23.8)

Entre paréntesis se indica la probabilidad calculada en múltiplos del valor umbral que decide la predicción del giro.

Discusión.

El diseño del péptido Ac-LKLKLGDSLKLLK-NH₂ no ha dado los resultados esperados. Aunque parece que se forman estructuras de tipo giro β en los residuos centrales, la estabilidad de este giro no es suficiente para promover la formación de una lámina intermolecular, y el péptido tiende a formar agregados en presencia de sal. Este diseño probablemente se puede mejorar introduciendo residuos que estabilicen el giro y modificando el resto de forma que se disminuya la tendencia a agregar inespecíficamente como la introducción de aminoácidos ramificados en el carbono β que se apareen con residuos no ramificados en la otra hebra (se favorecen las láminas antiparalelas con respecto a las paralelas) y cargas negativas (glutámicos, por ejemplo).

El péptido betamax, por el contrario, es capaz de formar una estructura más compleja como es la horquilla β . Es la primera vez que se apoya experimentalmente, la existencia de una horquilla β aislada en un péptido lineal corto en disolución acuosa (Blanco, 1992). El éxito obtenido con un diseño bastante simple como éste, es un tanto sorprendente. Las estadísticas de giros de proteínas (de donde se ha sacado la secuencia NPDG) predicen un giro β en estos residuos, sin embargo son incapaces de predecir los giros detectados en los fragmentos del tendamistat e, incluso, el giro nativo (SWRY) como se puede ver en la tabla 5.III. Aunque el método de Wilmot y Thornton (1988) utiliza una base de datos mayor y trata por separado los diferentes tipos de giros, los resultados son muy similares a los obtenidos por el método de Chou y Fasman (1978).

Las razones de la estabilidad de esta estructura en el betamax no parecen estar sólo en la tendencia de los residuos centrales a formar un giro β . Recientemente se ha publicado un estudio en el que tetrapéptidos con secuencias muy similares (NPDM) con alta probabilidad de formar giros, no dan lugar a NOEs u otras evidencias experimentales que indiquen su presencia con lo que su estabilidad debe ser muy pequeña (Liu, 1992). Por otro lado, la secuencia nativa forma giros β poco estables pero no hay indicios de que se forme la lámina. La estabilidad de la horquilla β en el betamax debe surgir de un efecto cooperativo de ambas secuencias gracias al cual se amplifican las propiedades conformacionales intrínsecas de cada una de ellas. Otra forma de racionalizar los resultados, es que la información necesaria para formar el giro no reside sólo en los cuatro aminoácidos que lo forman sino que existen señales de formación de giros β de un modo análogo a las señales inicio y terminación de hélices.

Capítulo 5.
Resumen y conclusiones.

5.1. Resumen.

El trabajo desarrollado en esta tesis ha tenido **tres objetivos** claramente diferenciados aunque convergentes:

- comprobar si las secuencias correspondientes a estructuras de tipo giro β en las proteínas se pliegan de la misma forma cuando se encuentran aisladas en disolución acuosa; en el caso de que la estructura nativa se mantenga sería posible proponer que estas secuencias constituyen centros de inicio del plegamiento y que son interacciones locales las que gobiernan las primeras etapas del mismo,

- analizar la relación entre la secuencia de aminoácidos y la estabilidad de los giros β formados, que permitirá obtener información acerca del código de plegamiento, si es que hay un código simple,

- diseñar secuencias formadoras de giros β estables, que sirvan para confirmar las conclusiones obtenidas del estudio de las secuencias nativas y se puedan utilizar en el futuro como modelos de giros β para el análisis de su estabilidad y el diseño de proteínas.

Con estos fines se han seleccionado varios **fragmentos de proteínas** con criterios basados en la información disponible sobre su estructura y estabilidad, y se han estudiado dos péptidos con **secuencias diseñadas** con gran probabilidad de formar giros β , según las estadísticas de proteínas.

Los péptidos se han estudiado en disolución acuosa por medio de espectroscopía de dicroísmo circular y espectrometría de **resonancia magnética nuclear** de protón. Prácticamente toda la información de interés estructural se ha obtenido a partir de los resultados obtenidos del estudio por RMN gracias a su gran poder de resolución que permite detectar conformaciones plegadas poco pobladas y caracterizarlas con detalle a nivel de residuo. La asignación de los espectros, necesaria para su análisis posterior, se ha llevado a cabo con la estrategia de asignación secuencial utilizando experimentos de RMN bidimensional.

La caracterización conformacional de estos péptidos ha sido posible gracias a la información acerca de la proximidad espacial de los protones de la molécula obtenida a partir de experimentos de RMN bidimensional de tipo NOESY y ROESY. Se ha tenido especial cuidado en la correcta interpretación de los espectros ya que, debido a la baja población de las estructuras plegadas en la mayoría de los fragmentos, las señales NOE son muy débiles y pueden ser fácilmente confundidas con artefactos, de los cuales el más peligroso es el de la difusión de espín. La utilidad del análisis conjunto de los espectros

NOESY y ROESY se ha puesto de manifiesto durante el trabajo desarrollado en esta tesis y se ha visto como la información obtenida de experimentos NOESY con tiempos de mezcla largos (utilizados con frecuencia en la literatura actual) puede dar lugar a conclusiones erróneas. Los NOEs entre residuos no contiguos en la secuencia se han utilizado para identificar las conformaciones preferentes de los péptidos estudiados, en su caso, y se ha apoyado con la cuantificación de los NOEs secuenciales e intrarresiduo entre los protones del esqueleto y otros parámetros espectrales, especialmente los desplazamientos químicos y los coeficientes de temperatura de las señales de los protones amida y su variación en presencia de urea.

Para conseguir los objetivos expuestos más arriba se han estudiado los siguientes fragmentos de proteínas:

- **fragmento 12-26 del tendamistat**, de secuencia VTLYQSWRYSQADNG, que corresponde a una estructura de horquilla β en la proteína completa con un giro β de tipo I en los residuos 17-20. Los resultados obtenidos indican que este péptido forma dos giros β en esta misma región, residuos 16-19 y 18-21, en equilibrio entre sí y con conformaciones mayoritarias al azar. La estabilidad de estos giros se afecta considerablemente al acortar el péptido por los extremos (fragmento 15-23) y con cambios puntuales en la secuencia. La sustitución de la Ser21 por valina desestabiliza selectivamente el segundo de los giros, como era de esperar según la abundancia de estos dos aminoácidos en los giros β en proteínas. La sustitución del Trp18 por serina desestabiliza ambos giros a pesar de que debería favorecer su estabilidad según las estadísticas. El residuo de triptófano parece ser clave para la formación de las estructuras plegadas; además, la desestabilización estructural en los cinco péptidos causada por la presencia de urea 6M sugiere que las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas laterales de los residuos son fuertemente determinantes de la estabilidad de estos giros,

- **fragmento 35-44 del tendamistat**, que corresponde a otra secuencia (VVYEDDTQGL) con estructura de horquilla β en la proteína completa con un giro β de de cinco residuos (37-41). Aunque el péptido es básicamente flexible, se han podido distinguir dos regiones con diferentes propiedades conformacionales. Mientras que el extremo N-terminal (residuos 35-38) tiene una clara preferencia por adoptar conformaciones extendidas, la región entre los residuos 39-44 adopta estructuras poco pobladas en la zona α_R del mapa de energía potencial de Ramachandran de tipo giro β o de hélice 3_{10} . La baja estabilidad de estas estructuras no se afecta por la presencia de urea ni por el estado de ionización de los residuos con grupos ionizables. Las secuencias mutantes estudiadas (Asn38, Trp41 y Gln42) se comportan de la misma forma, lo que sugiere que la secuencia es muy tolerante a cambios de un sólo aminoácido, o que los

cambios de estabilidad se producen sobre una estructura ya muy poco estable, con lo cual no son detectados experimentalmente

- **fragmento 2-19 del dominio de unión de la proteína G a la región F_c de inmunoglobulina G**, que forma una horquilla β en la proteína completa con un giro β de tipo I entre los residuos 9-12. Este péptido, de secuencia TYKLILNGKTLKGETTTE, presenta pocas preferencias conformacionales aunque es posible detectar estructuras locales poco pobladas que implican unos pocos residuos en diferentes regiones. Los NOEs observados indican la existencia de estructuras de tipo giro β entre los residuos 7-10 y 12-15 así como una interacción entre las cadenas laterales de los residuos Tyr3-Leu5. La estabilidad de estos giros aumenta ligeramente al subir el pH, ionización de los residuos ácidos, y la adición de urea disminuye su estabilidad pero no parece afectar a la estructura local en el extremo N-terminal. La presencia de un giro β en una región que solapa con la del giro nativo es el rasgo más importante de este péptido. Sin embargo la intensidad de los NOEs no secuenciales (muy débiles) y la existencia de otras conformaciones locales similares en regiones alejadas, no permiten asegurar que sea de una relevancia especial para el plegamiento de esta proteína.

- **fragmento 63-74 de la ribonucleasa A de páncreas bovino**, de secuencia VACKNGQTNCYQ, que forma un giro β de tipo I entre los residuos 65-68 en la ribonucleasa y que incluye un puente disulfuro entre las cisteínas 65 y 67. Este péptido se ha estudiado en su forma oxidada y reducida. Los resultados indican que se forman dos giros β entre los residuos 66-69 y 69-72 en equilibrio entre sí y con conformaciones extendidas. La estabilidad de estos giros es mucho menor sin el puente disulfuro aunque aún es posible detectar una población muy baja del primero de ellos. Este resultado creemos que tiene interés. Por un lado, aunque el puente disulfuro debe reducir bastante el espacio conformacional accesible del péptido, la estructura del péptido ciclado no es rígida, y por otro, en ausencia de esta interacción covalente aún es posible encontrar tendencias significativas a adoptar una conformación localmente plegada. Estos resultados indican que los determinantes de la formación del giro nativo se encuentran en la secuencia y el puente disulfuro puede surgir como una consecuencia del giro o del plegamiento posterior de la cadena estabilizando la estructura formada.

- **fragmento 245-260 de la termolisina (SQGTHYGVS VVGIGR)** que forma un lazo de tipo Ω (residuos 247-259) conectando las dos primeras hélices del dominio C-terminal de la termolisina. Aunque se han encontrado pequeñas preferencias conformacionales locales en la región central de la secuencia, no es posible relacionarlas con la estructura nativa, en la cual los residuos 245-246 están próximos en el espacio a los 256-257.

En los péptidos estudiados que incluyen secuencias con conformación de giro β en la proteína, se ha detectado la presencia de giros β con una localización casi coincidente con la del giro nativo aunque la estabilidad es variable y, en algunos de ellos muy pequeña. En los péptidos con estructura de horquilla β , **no se ha encontrado evidencia de la formación de la lámina β antiparalela**, que debería manifestarse en contactos entre los residuos que flanquean al giro, probablemente debido a la baja estabilidad de los giros en los péptidos lineales de corta longitud en general.

Con el objeto de conseguir péptidos lineales que formen giros β lo suficientemente estables como para ser estudiados en profundidad y que puedan estabilizar una lámina β intermolecular se han diseñado las dos secuencias siguientes:

- **LKLLKLGDSLKLLK**, en la cual los tres residuos centrales son muy abundantes en los giros β de proteínas y la secuencia alternante de residuos hidrofílico-hidrofóbico favorece la formación de láminas β . Los resultados indican que las preferencias conformacionales del péptido son muy pequeñas. Se observan indicios de la formación de un giro β o una vuelta de hélice en la secuencia GDSLK, pero no de la formación de la lámina,

- **péptido betamax**, de secuencia **YQNPDGSQA**, en la cual los residuos centrales del fragmento 15-23 del tendamistat han sido reemplazados por los aminoácidos con mayor probabilidad de ocupar cada una de las cuatro posiciones de un giro β . En este caso se ha podido observar, no sólo la presencia de un giro β de tipo I muy estable (un 80% aproximadamente de las conformaciones) sino también de la lámina β aunque menos poblada que el giro (alrededor de un 15%). La evidencia experimental de la formación de esta estructura incluye NOEs de largo alcance entre los extremos del péptido que indican claramente su proximidad espacial. El cálculo de un conjunto de estructuras compatibles con los datos de distancias confirma que los NOEs no secuenciales observados son consistentes con la formación de una estructura de tipo horquilla β con la lámina ligeramente distorsionada con respecto a la geometría de una lámina β regular. La secuencia nativa forma giros β poco estables pero no hay indicios de que se forme la lámina. Los residuos centrales por sí solos no parecen tener una gran tendencia a formar un giro β ya que secuencias muy similares (NPDM) han sido estudiadas por otros investigadores con resultados negativos. La razón de la estabilidad de esta estructura en el betamax, ha de hallarse en un efecto cooperativo entre la secuencia central y los residuos adyacentes más próximos de tal forma que las propiedades del conjunto amplifican las tendencias conformacionales intrínsecas de cada una de ellas. Este resultado se puede racionalizar con la hipótesis de la existencia de "señales" de inicio y final en la formación

de giros β de un modo análogo a las conocidas señales de inicio y terminación de hélices α .

5.2. Conclusiones.

Las conclusiones generales que surgen de los resultados anteriormente expuestos son las siguientes:

- las estructuras de tipo giro β presentes en las proteínas, se mantienen aunque con estabilidad muy reducida, en las secuencias nativas aisladas en ausencia de interacciones terciarias; este hecho, comprobado experimentalmente por primera vez en esta tesis, y en tres proteínas diferentes, merece una mayor exploración para confirmar su generalidad.

- La presencia de estructuras de tipo giro β en regiones coincidentes o muy próximas a la localización del giro nativo permite proponer que estas preferencias conformacionales actúan en el inicio del plegamiento reduciendo considerablemente la libertad conformacional de la cadena polipeptídica y dirigiendo las siguientes etapas al aproximar zonas distantes en la secuencia. El desplazamiento de uno o dos residuos de los giros observados con respecto a su localización en la proteína nativa, y la existencia de dos o más giros anidados no disminuye su relevancia en relación con el inicio del plegamiento, ya que el ajuste preciso de los elementos de estructura secundaria debe tener lugar en la etapa final una vez superado el estado de transición.

- las secuencias locales nativas contienen en sí mismas los determinantes de la formación de estructuras de tipo giro β presentes en las estructuras finales de las proteínas, es decir son interacciones locales, de unos pocos aminoácidos, las responsables de la formación del giro, aunque los resultados obtenidos sugieren que estos determinantes no residen exclusivamente en los cuatro o cinco aminoácidos que lo forman sino que es necesario el concurso de los residuos inmediatamente contiguos en la secuencia, que pueden constituir "señales" de inicio para la formación de giros β .

- Elementos estructurales más complejos como una horquilla β , compuesta de un giro β que conecta dos hebras de lámina β antiparalela, pueden ser suficientemente estables aislados en disolución acuosa. Aunque el presentado en esta tesis es el primer caso descrito por el momento, y corresponde a una secuencia híbrida nativa-diseñada, no hay razón para excluir un comportamiento similar en secuencias nativas. La búsqueda en este sentido resulta muy prometedora y, mientras tanto, el péptido betamax constituye un buen modelo para futuras manipulaciones e incluso para el modelado de nuevas proteínas.

Apéndice.

Tabla I. Desplazamientos químicos de las resonancias de protón (δ , en ppm respecto al TSP), constantes de acoplamiento H_α -NH ($^3J_{H\alpha NH}$, en Hz) y coeficientes de temperatura de los protones NH (α , en ppb/K) correspondientes al fragmento 12-26 del Tendamistat. Condiciones: <1 mM, pH=3.0, 10°C.

Residuo	δ_{NH}	δ_{H_α}	δ_{H_β}	δ_{H_γ}	δ_{H_δ}	δ_{otros}	$^3J_{H\alpha NH}$	α
Val 12	-----	3.88	2.20	0.99 1.00			-----	-----
Thr 13	8.75	4.33	4.06	1.11			7.7	-7.8
Leu 14	8.59	4.31	1.53 1.55	1.44	0.82 0.88		7.0	-9.0
Tyr 15	8.37	4.47	2.93			2,6H 7.06 3,5H 6.78	6.7	-9.0
Gln 16	8.28	4.12	1.68 1.75	2.13 2.18	6.94 7.54	δ_{NH_2} 7.53 6.93	7.1	-6.8
Ser 17	8.34	4.23	3.85 3.92				5.6	-7.8
Trp 18	8.00	4.57	3.23 3.32			2H 7.21 4H 7.51 5H 7.11 6H 7.22 7H 7.46 NH 10.16	5.7	-4.6
Arg 19	7.72	3.94	1.31 1.44	1.04	2.92	ϵ_{NH} 7.53 6.47 6.78	6.7	-2.8
Tyr 20	7.87	4.47	2.88 3.07			2,6H 7.09 3,5H 6.77	7.3	-5.2
Ser 21	8.06	4.37	3.80 3.86				6.8	-3.8
Gln 22	8.37	4.25	1.94 2.11	2.31	7.56 6.91		6.7	-6.2
Ala 23	8.30	4.24	1.37				5.7	-5.5
Asp 24	8.44	4.70	2.81 2.93				7.4	-6.2
Asn 25	8.42	4.76	2.75 2.84			γ_{NH_2} 7.63 6.94	7.9	-5.5
Gln 26	8.24	3.94					5.8 6.2	-5.8

Tabla II. Desplazamientos químicos de las resonancias de protón (δ , en ppm respecto al TSP), constantes de acoplamiento H_{α} -NH ($^3J_{H_{\alpha}NH}$, en Hz) y coeficientes de temperatura de los protones NH (α , en ppb/K) correspondientes al fragmento 15-23 del Tendamistat. Condiciones: 10 mM, H₂O/D₂O (9:1 en volúmen), pH=3.0, 5°C.

Residuo	δ_{NH}	$\delta_{H_{\alpha}}$	$\delta_{H_{\beta}}$	$\delta_{H_{\gamma}}$	$\delta_{H_{\delta}}$	δ_{otros}	$^3J_{H_{\alpha}NH}$	α
Tyr 15	-----	4.19	3.08			2,6H 7.08 3,5H 6.81	-----	-----
Gln 16	8.61	4.27	1.73	2.14		δ_{NH_2} 6.91 7.52	7.2	-6.0
Ser 17	8.58	4.32	3.91 3.83				6.1	-9.1
Trp 18	8.21	4.61	3.27 3.19			2H 7.18 4H 7.51 5H 7.08 6H 7.20 7H 7.45 NH 10.15	6.0	-6.6
Arg 19	7.86	4.04	1.48 1.35	1.10	2.94	ϵ_{NH} 7.04 6.47* 6.84*	6.8	-2.9
Tyr 20	8.01	4.43	3.01 2.87			2,6H 7.08 3,5H 6.78	6.0	-6.6
Ser 21	8.14	4.35	3.79 3.77				6.8	-4.6
Gln 22	8.39	4.28	2.10 1.94	2.33		δ_{NH_2} 6.95 7.62	7.1	-6.6
Ala 23	8.47	4.28	1.39				6.4	-7.7

* Grupo guanidino

Tabla III. Desplazamientos químicos de las resonancias de protón (δ , en ppm respecto al TSP), constantes de acoplamiento H_α -NH ($^3J_{H_\alpha NH}$, en Hz) y coeficientes de temperatura de los protones NH (α , en ppb/K) correspondientes al fragmento [S18] 15-23 del Tendamistat. Condiciones: 10 mM, H₂O/D₂O (9:1 en volúmen), pH=3.0, 5°C.

Residuo	δ_{NH}	δ_{H_α}	δ_{H_β}	δ_{H_γ}	δ_{H_δ}	δ_{otros}	$^3J_{H_\alpha NH}$	α
Tyr 15	-----	4.20	3.10			2,6H 7.11 3,5H 6.81	-----	-----
Gln 16	8.65	4.37	1.94 2.03	2.31		δ_{NH_2} 7.64 6.96	7.1	-6.0
Ser 17	8.68	4.41	3.87				6.1	-8.9
Ser 18	8.61	4.41	3.84 3.91				6.7	-8.6
Arg 19	8.45	4.22	1.65	1.39	3.18	ϵ_{NH} 7.13 6.87* 6.47*	6.9	-7.7
Tyr 20	8.27	4.61	2.90 3.10			2,6H 7.12 3,5H 6.84	7.1	-7.7
Ser 21	8.20	4.39	3.81 3.96				6.9	-6.9
Gln 22	8.45	4.32	1.98 2.13	2.39		δ_{NH_2} 7.65 6.98	6.9	-8.3
Ala 23	8.53	4.30	1.41				6.3	-8.6

* Grupo guanidino

Tabla IV. Desplazamientos químicos de las resonancias de protón (δ , en ppm respecto al TSP), constantes de acoplamiento H_{α} -NH ($^3J_{H_{\alpha}NH}$, en Hz) y coeficientes de temperatura de los protones NH (α , en ppb/K) correspondientes al fragmento [V21] 15-23 del Tendamistat. Condiciones: 1 mM, pH=3.0, 10°C.

Residuo	δ_{NH}	$\delta_{H_{\alpha}}$	$\delta_{H_{\beta}}$	$\delta_{H_{\gamma}}$	$\delta_{H_{\delta}}$	δ_{otros}	$^3J_{H_{\alpha}NH}$	α
Tyr 15	-----	4.21	3.09			2,6H 7.10 3,5H 6.82	-----	-----
Gln 16	8.56	4.28	1.74	2.16		δ_{NH_2} 6.89 7.50	7.1	-6.0
Ser 17	8.52	4.32	3.84 3.91				6.1	-9.5
Trp 18	8.12	4.61	3.22 3.30			2H 7.21 4H 7.54 5H 7.12 6H 7.22 7H 7.46 NH 10.15	6.1	-6.2
Arg 19	7.75	4.06	1.38 1.49	1.12	2.97	ϵ_{NH} 7.05 6.47* 6.83*	7.5	-2.1
Tyr 20	8.06	4.44	2.90 2.95			2,6H 7.08 3,5H 6.78	6.7	-6.9
Val 21	7.94	3.98	1.93	0.86			8.3	-5.9
Gln 22	8.46	4.26	1.97 2.06	2.38		δ_{NH_2} 6.96 7.61	6.3	-8.5
Ala 23	8.58	4.30	1.42				6.0	-9.9

* Grupo guanidino

Tabla V. Desplazamientos químicos de las resonancias de protón (δ , en ppm respecto al TSP), constantes de acoplamiento H_{α} -NH ($^3J_{H_{\alpha}NH}$, en Hz) y coeficientes de temperatura de los protones NH (α , en ppb/K) correspondientes al fragmento [Q42] 35-44 del Tendamistat. Condiciones: 10 mM, pH=3.0, 5°C.

Residuo	δ_{NH}	$\delta_{H_{\alpha}}$	$\delta_{H_{\beta}}$	$\delta_{H_{\gamma}}$	$\delta_{H_{\delta}}$	δ_{otros}	$^3J_{H_{\alpha}NH}$	α
Val 35	8.13	3.73	2.07	0.91 0.83			-----	-----
Val 36	8.55	4.11	2.06	0.92			8.0	-7.7
Tyr 37	8.68	4.56	2.91 2.99			2,6H 7.12 3,5H 6.78	7.3	-10.7
Glu 38	8.43	4.30	1.90 2.04	2.39			7.1	-6.3
Asp 39	8.62	4.64	2.86 2.94				6.9	-7.3
Asp 40	8.59	4.82	2.92 2.97				7.4	-7.0
Thr 41	8.23	4.32	4.29				7.8	-6.3
Gln 42	8.48	4.30	2.03 2.13	2.38		δ_{NH_2} 7.63 6.95	6.8	-6.7
Gly 43	8.50	3.94					5.9 5.9	-7.0
Leu 44	8.24	4.40	1.64 1.70	1.70	0.92 0.87		7.6	-7.3

Tabla VI. Desplazamientos químicos de las resonancias de protón (δ , en ppm respecto al TSP), constantes de acoplamiento H_α -NH ($^3J_{H_\alpha NH}$, en Hz) y coeficientes de temperatura de los protones NH (α , en ppb/K) correspondientes al fragmento 35-44 del Tendamistat. Condiciones: 4 mM, pH=3.0, 5°C.

Residuo	δ_{NH}	δ_{H_α}	δ_{H_β}	δ_{H_γ}	δ_{H_δ}	δ_{otros}	$^3J_{H_\alpha NH}$	α
Val 35	8.14	3.74	2.08	0.83 0.91			-----	-----
Val 36	8.56	4.12	1.97	0.90			8.1	-7.4
Tyr 37	8.69	4.58	2.92 3.00			2,6H 7.13 3,5H 6.79	7.2	-10.3
Glu 38	8.43	4.31	2.39	1.90 2.04			8.2	-6.1
Asp 39	8.61	4.64	2.84 2.94				7.2	-7.3
Asp 40	8.61	4.81	2.91 2.98				7.2	-6.8
Thr 41	8.25	4.32	4.30				7.4	-6.0
Gln 42	8.42	4.35	2.49	2.04 2.15			7.0	-6.3
Gly 43	8.49	3.94					5.8 5.9	-6.7
Leu 44	8.14	4.37	1.68 1.70	1.62	0.87 0.92		7.6	-6.6

Tabla VII. Desplazamientos químicos de las resonancias de protón (δ , en ppm respecto al TSP), constantes de acoplamiento H_{α} -NH ($^3J_{H_{\alpha}NH}$, en Hz) y coeficientes de temperatura de los protones NH (α , en ppb/K) correspondientes al fragmento [N38] 35-44 del Tendamistat. Condiciones: 10 mM, pH=3.0, 5°C.

Residuo	δ_{NH}	$\delta_{H_{\alpha}}$	$\delta_{H_{\beta}}$	$\delta_{H_{\gamma}}$	$\delta_{H_{\delta}}$	δ_{otros}	$^3J_{H_{\alpha}NH}$	α
Val 35	8.13	3.73	2.06	0.82 0.90			-----	-----
Val 36	8.54	4.11	1.97	0.90			8.4	-7.1
Tyr 37	8.71	4.57	2.89 3.01			2,6 7.12 3,5 6.78	7.5	-10.1
Asn 38	8.53	4.63	2.69 2.79			γNH_2 7.70 6.95	7.6	-5.8 -6.1 -4.6
Asp 39	8.56	4.64	2.86 2.91				7.0	-7.1
Asp 40	8.57	4.78	2.89 2.98				7.2	-5.5
Thr 41	8.22	4.32	4.30	1.20			7.3	-5.5
Glu 42	8.41	4.34	2.04 2.15	2.99			6.7	-5.9
Gly 43	8.48	3.93					5.8 5.9	-6.4
Leu 44	8.13	4.36	1.63 1.68	1.61		0.86 0.96	7.7	-6.5

Tabla VIII. Desplazamientos químicos de las resonancias de protón (δ , en ppm respecto al TSP), constantes de acoplamiento H_{α} -NH (${}^3J_{H_{\alpha}NH}$, en Hz) y coeficientes de temperatura de los protones NH (α , en ppb/K) correspondientes al fragmento [W41] 35-44 del Tendamistat. Condiciones: 3 mM, pH=3.0, 5°C.

Residuo	δ_{NH}	$\delta_{H_{\alpha}}$	$\delta_{H_{\beta}}$	$\delta_{H_{\gamma}}$	$\delta_{H_{\delta}}$	δ_{otros}	${}^3J_{H_{\alpha}NH}$	α
Val 35	8.12	3.72	2.04	0.81 0.89			-----	-----
Val 36	8.53	4.10	1.94	0.87 0.90			8.1	-7.0
Tyr 37	8.66	4.54	2.87 2.98			2,6H 7.07 3,5H 6.76	7.5	-10.2
Glu 38	8.39	4.27	1.86 2.01	2.34			7.1	-6.4
Asp 39	8.54	4.52	2.72 2.78				6.9	-7.2
Asp 40	8.46	4.69	2.80 2.89				7.5	-7.0
Trp 41	8.06	4.60	3.28 3.33			2H 7.27 4H 7.58 5H 7.14 6H 7.22 7H 7.47 NH 10.21	6.0	-4.8
Glu 42	8.12	4.12	1.72 1.91	2.01 2.13			6.9	-5.2
Gly 43	7.63	3.70 3.76					6.3 5.7	-0.4
Leu 44	8.03	4.33	1.64 1.68	1.62	0.86 0.92			-6.4

Tabla IX. Desplazamientos químicos de las resonancias de protón (δ , en ppm respecto al TSP), constantes de acoplamiento H_{α} -NH ($^3J_{H_{\alpha}NH}$, en Hz) y coeficientes de temperatura de los protones NH (α , en ppb/K) correspondientes al fragmento 2-19 del dominio de unión de la proteína G con inmunoglobulinas. Condiciones: 5 mM, pH=3.0, 5°C.

Residuo	δ_{NH}	$\delta_{H_{\alpha}}$	$\delta_{H_{\beta}}$	$\delta_{H_{\gamma}}$	$\delta_{H_{\delta}}$	δ_{otros}	$^3J_{H_{\alpha}NH}$	α
Tln 2	-----	3.84	4.10	1.29			-----	-----
Tyr 3	8.90	4.61	2.98 3.00	2,6 7.12 3,5 6,82			6.3	-8.2
Lys 4	8.26	4.20	1.62 1.68	1.28 1.32	1.62	ϵNH_3^+ 2.94 7.59	7.4	-5.0
Leu 5	8.30	4.26	1.52 1.56	1.56	0.90 0.95		6.7	-7.8
Ile 6	8.42	4.15	1.82	1.16 1.47	0.83	γNH_3^+ 0.86	7.9	-8.7
Leu 7	8.61	4.40	1.55 1.63	1.63	0.86 0.92		7.0	-8.7
Asn 8	8.68	4.67	2.80 2.87	NH_2 7.03 7.75			7.1	-8.7
Gly 9	8.56	3.90 3.90					5.7 6.1	-6.7
Lys 10	8.31	4.41	1.78 1.86	1.40 1.46	1.68	ϵNH_3^+ 2.99 7.61	6.6	-6.7
Thr 11	8.32	4.33	4.18	1.20			7.5	-7.8
Leu 12	8.47	4.37	1.59 1.63	1.63	0.87 0.92		7.5	-7.8
Lys 13	8.49	4.27	1.78 1.83	1.43 1.45	1.68	ϵNH_3^+ 2.98 7.61	6.3	-7.8
Gly 14	8.58	3.96					5.7 6.3	-7.8
Glu 15	8.33	4.48	2.02 2.15	2.48			6.9	-5.5
Thr 16	8.48	4.47	4.27	1.22			6.8	-7.8
Thr 17	8.42	4.47	4.27	1.21			8.6	-7.8
Thr 18	8.37	4.37	4.22	1.22			7.8	-7.3
Glu 19	8.48	4.36	1.97 2.19	2.46			7.0	-9.1

Tabla X. Desplazamientos químicos de las resonancias de protón (δ , en ppm respecto al TSP), constantes de acoplamiento H_{α} -NH (${}^3J_{H_{\alpha}NH}$, en Hz) y coeficientes de temperatura de los protones NH (α , en ppb/K) correspondientes al fragmento 63-74 de ribonucleasa A. Condiciones: 3.7 mM, pH=2.5, 5°C. Los valores de α medidos a pH=3.0.

Residuo	δ_{NH}	$\delta_{H_{\alpha}}$	$\delta_{H_{\beta}}$	$\delta_{H_{\gamma}}$	$\delta_{H_{\delta}}$	δ_{otros}	${}^3J_{H_{\alpha}NH}$	α
Val 63	-----	3.78	2.21	1.01				-----
Ala 64	8.80	4.41	1.39				5.7	-6.9
Cys 65	8.70	4.67	3.17 2.91				6.8	-8.8
Lys 66	8.79	4.31	1.84 1.74	1.47	1.68	ϵ 2.97 NH ₃ ⁺ 7.71	7.3	-7.4
Asn 67	8.68	4.50	2.84			NH ₂ 7.74 7.04	5.0	-7.8
Gly 68	8.80	4.15 3.71				NH ₂ 7.71 7.02	6.0 5.7	-6.9
Gln 69	7.96	4.40	2.21 2.09	2.42 2.37			6.9	-2.1
Thr 70	8.56	4.28	4.25	1.21			7.0	-8.6
Asn 71	8.54	4.66	2.82			NH ₂ 7.70 7.01	7.9	-6.1
Cys 72	8.15	4.18	2.09	0.94			7.5	-4.2
Tyr 73	8.50	4.59	2.92 3.10			2,6H 7.12 3,5H 6.82	7.8	-8.8
Gln 74	8.24	4.22	2.12 1.92	2,29		NH ₂ 7.59 6.95	7.5	-7.7

Tabla XII. Desplazamientos químicos de las resonancias de protón (δ , en ppm respecto al TSP), constantes de acoplamiento H_{α} -NH ($^3J_{H_{\alpha}NH}$, en Hz) y coeficientes de temperatura de los protones NH (α , en ppb/K) correspondientes al fragmento 245-260 de la Termolisina. Condiciones: 3.7 mM, pH=2.5, 5°C.

Residuo	δ_{NH}	$\delta_{H_{\alpha}}$	$\delta_{H_{\beta}}$	$\delta_{H_{\gamma}}$	$\delta_{H_{\delta}}$	δ_{otros}	$^3J_{H_{\alpha}NH}$	α
Ser 245	-----	4.18	4.00					-----
Gln 246	8.98	4.43	2.04 2.13	2.40		δ_{NH_2} 6.99 7.68	6.4	-6.7
Gly 247	8.74	4.01					6.0 5.7	-8.3
Gly 248	8.44	4.01					5.7 5.3	-6.7
Tln 249	8.23	4.23	4.01	1.07			7.4	-7.0
His 250	8.68	4.69	3.09 3.19			2H 8.57 4H 7.21	8.2	-7.3
Tyr 251	8.47	4.57	2.92 3.08			2,6H 7.12 3,5H 6.83	6.8	-8.0
Gly 252	8.52	3.92					5.4 5.7	-7.3
Val 253	8.13	4.18	2.09	0.94			7.7	-7.7
Ser 254	8.62	4.51	3.84				6.8	-8.7
Val 255	8.43	4.17	2.09	0.92			6.2	-10.0
Val 256	8.35	4.09	2.05	0.95			7.7	-8.7
Gly 257	8.59	3.96					6.2 5.8	-8.3
Ile 258	8.20	4.20	1.90		1.47 1.21	γCH_3 0.93	7.1	-9.0
Gly 259	8.70	3.95					5.4 5.7	-8.3
Arg 260	8.33	4.42	1.78 1.96	1.63	3.21	ϵNH 7.24 6.48* 6.93*	7.5	-7.7

Tabla XIV. Desplazamientos químicos de las resonancias de protón (δ , en ppm respecto al TSP), constantes de acoplamiento H_{α} -NH (${}^3J_{H_{\alpha}NH}$, en Hz) y coeficientes de temperatura de los protones NH (α , en ppb/K) correspondientes al péptido betamax. Condiciones: 15 mM, pH=4.3, 5°C.

Residue		δ_{NH}	$\delta_{H_{\alpha}}$	$\delta_{H_{\beta}}$	$\delta_{H_{\gamma}}$	$\delta_{H_{\delta}}$	δ_{otros}	${}^3J_{H_{\alpha}NH}$	α
Tyr	1	-	4.21 (4.22)	3.07 (3.07)			2,6 7.08 (7.11)	-----	-----
				3.14 (3.13)			3,5 6.84 (6.84)		
Gln	2	8.57 (8.69)	4.50 (4.32)	1.88 (1.93)	2.21 (2.30)		NH2 6.97 (na.)	8.1	-6.9
				1.96 (2.02)	2.27 (2.30)		7.70 (na.)		
Asn	3	8.92 (8.56)	4.86 (4.80)	2.73 (2.61)			NH2 7.02 (na.)	6.4	-9.6
				2.89 (2.79)			7.74 (na.)		
Pro	4	-	4.40 (4.83)	1.98 (2.18)	2.08 (1.86)	3.85 (3.50)		-----	-----
				2.36 (2.37)	2.10 (1.96)	3.95 (3.59)			
Asp	5	8.26 (8.85)	4.58 (4.62)	2.73 (2.83)				7.2	-2.0
				2.95 (2.83)					
Gly	6	8.39 (8.49)	3.81 (3.95)					5.1	-5.1
			4.20 (3.95)					5.3	
Ser	7	8.35 (8.49)	4.38 (4.36)	3.92 (3.95)				6.5	-4.9
				3.98 (3.95)					
Gln	8	8.66 (8.49)	4.42 (4.36)	1.97 (1.97)	2.41 (2.16)		NH2 6.99 (na.)	7.3	-8.9
				2.15 (1.97)	2.41 (2.35)		7.76 (na.)		
Ala	9	8.27 (2.22)	4.17 (4.14)	1.25 (1.36)				6.9	-8.0

Bibliografía.

- Anfinsen, C. B. (1973) *Science*, 181, 223.
- Anfinsen, C. B. and Scheraga, H. A. (1975) *Adv. Prot. Chem.*, 25, 205.
- Arai, M., Oouchi, N., Goto, A., Ogura, S. and Murao, S. (1985) *Agric. Biol. Chem.*, 49, 1523.
- Aue, W. P., Bartholdi, E. and Ernst, R. R. (1976) *J. Chem. Phys.*, 64, 2229.
- Baldwin, R. L. (1986) *TIBS*, 11, 6.
- Bax, A. and Davies, D. (1985a) *J. Magn. Reson.*, 65, 355.
- Bax, A. and Davies, D. G. (1985b) *J. Magn. Reson.*, 63, 207.
- Bax, A., Sklenár, V. and Summers, M. F. (1986) *J. Mag. Res.*, 70, 327.
- Billeter, M., Braun, W. and Wüthrich, K. (1982) *J. Mol. Biol.*, 155, 321.
- Blanco, F. J., Jiménez, M. A., Rico, M., Santoro, J., Herranz, J. and Nieto, J. L. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 182, 1491.
- Bodenhausen, G., Vold, R. L. and Vold, R. R. (1980) *J. Magn. Reson.*, 37, 93.
- Bothner-By, A. A., Stephens, R. L., Lee, J., Warren, C. D. and Jeanloz, R. W. (1984) *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 811.
- Bowie, J. U., Reidhaar-Olson, J. F., Lim, W. A. and Sauer, R. T. (1990) *Science*, 247, 1306.
- Bradley, E. K., Thomason, J. F., Cohen, F. E., Kosen, P. A. and Kuntz, I. D. (1990) *J. Mol. Biol.*, 215, 607.
- Bruix, M., Perello, M., Herranz, J., Rico, M. and Nieto, J. L. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 167, 1009.
- Bundi, A. and Wüthrich, K. (1979) *Biopolymers*, 18, 285.
- Bundi, A. and Wüthrich, K. (1979) *Biopolymers*, 18, 285.
- Chaffotte, A. F., Cadieux, C., Guillou, Y. and Goldberg, M. E. (1992) *Biochemistry*, 31, 4303.
- Chou, P. Y. and Fasman, G. D. (1978) *Ann. Rev. Biochem.*, 47, 251.
- Creighton, T. E. (1990) *Biochem. J.*, 270, 1.
- Degrado, W. F. (1988) *Adv. Prot. Chem.*, 39, 51.
- Degrado, W. F., Wasserman, Z. R. and Lear, J. D. (1989) *Science*, 243, 622.
- Dill, K. A. (1990) *Biochemistry*, 29, 7133.
- Dill, K. A. and Shortle, D. (1991) *Annu. Rev. Biochem.*, 60, 795.
- Dyson, H. J., Rance, M., Houghten, R.A., Lerner, R.A., Wright, P.E. (1988) *J. Mol. Biol.*, 201, 161.
- Dyson, H. J., Satterthwait, A. C., Lerner, R. A. and Wright, P. E. (1990) *Biochemistry*, 29, 7828.
- Dyson, H. J. and Wright, P. E. (1991) *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 20, 519.
- Dyson, H. J., Merutka, G., Jonathan, P.W., Lerner, R.A., Wright, P.E. (1992) *J. Mol. Biol.*, 226, 795.

- Dyson, H. J., Sayre, J.R., Merutka, G., Shin, H.C., Lerner, R.A., Wright, P.E. (1992) *J. Mol. Biol.*, 226, 819.
- Ernst, R. R., Bodenhausen, G. and Wokaun, A. (1987) *Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions*, Oxford University Press, New York.
- Fairman, R., Shoemaker, K. R., York, E. J., Stewart, J. M. and Baldwin, R. L. (1990) *Biophys. Chem.*, 37, 107.
- Farmer II, B. T., Macura, S. and Brown, L. R. (1987) *J. Mag. Res.*, 72, 347.
- Finkelstein, A. V., Ptitsyn, O.B. (1987) *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, 50, 171.
- Fischer, G. and Schmid, F. X. (1990) *Biochemistry*, 29, 2205.
- Gilliland, G. L., Svensson, L. A., Dill, J. and Sjolín, L. (1990) in *2nd International Meeting on Structure, Mechanism and Function of Ribonucleases.*, Sant Feliu de Guíxols, Spain.
- Goraj, K., Renard, A. and Martial, J. A. (1990) *Prot. Engineer.*, 3, 259.
- Gronenborn, A. M., Filpula, D. R., Essig, N. Z., Achari, A., Whitlow, M., Wingfield, P. T. and Clore, G. M. (1991) *Science*, 253, 657.
- Güntert, P., Braun, W., Billeter, M. and Wüthrich, K. (1989) *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 3997-4004.
- Hahn, U., Deshai-Hahn, R. and Rüterjans, H. (1985) *Eur. J. Biochem.*, 146, 705-712.
- Hahn, U. and Rüterjans, H. (1985) *Eur. J. Biochem.*, 152, 481-491.
- Hammes, G. G. and Roberts, P. B. (1969) *J. Am. Chem. Soc.*, 91, 1812.
- Havel, T. F., Kuntz, I. D. and Crippen, G. M. (1983) *Bull. Math. Biol.*, 45, 665.
- Hirayama, K., Takahashi, R., Akashi, S., Fukuhara, K., Oouchi, N., Murai, A., Arai, M., Murao, S., Tanaka, K. and Nojima, I. (1987) *Biochemistry*, 26, 6483.
- Jardetzky, O. and Roberts, G. C. K. (1981) in *NMR in Molecular Biology*. Academic Press, New York. London, pp. 333-345.
- Jiménez, M. A., Nieto, J. L., Rico, M., Santoro, J., Herranz, J. and Bermejo, F. J. (1986) *J. Mol. Struct.*, 143, 435.
- Jiménez, M. A., Nieto, J. L., Herranz, J., Rico, M. and Santoro, J. (1987) *FEBS Lett.*, 221, 320.
- Jiménez, M. A., Rico, M., Herranz, J., Santoro, J. and Nieto, J. L. (1988) *Eur. J. Biochem.*, 175, 101.
- Jiménez, M. A., Rico, M., Herranz, J., Santoro, J. and Nieto, J. L. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, 1038, 322.
- Jiménez, M. A., Bruix, M., González, C., Blanco, F. J., Nieto, J. L., Herranz, J. and Rico, M. (1992) *Eur. J. Biochem.*, (in press),
- Jiménez, M. A., Blanco, F. J., Rico, M., Santoro, J., Herranz, J. and Nieto, J. L. (1992) *Eur. J. Biochem.*, 207, 39.
- Karplus, M. (1969) *J. Chem. Phys.*, 30, 11-15.

- Kartha, G., Bello, J. and Harker, D. (1967) *Nature*, 213, 842.
- Kemp, D. (1990) *Trends Biotechnol.*, 8, 249.
- Kim, P. S. and Baldwin, R. L. (1982) *Ann. Rev. Biochem.*, 51, 459.
- Kim, P. S. and Baldwin, R. L. (1990) *Annu. Rev. Biochem.*, 59, 631.
- Kline, A. D., Braun, W. and Wüthrich, K. (1986) *J. Mol. Biol.*, 189, 377.
- Kline, A. D. and Wüthrich, K. (1986) *J. Mol. Biol.*, 192, 869.
- Lane, A. N. (1990) *Biochem. Biophys. Acta*, 189.
- Leszczynski, J. F. and Rose, G. D. (1986) *Science*, 234, 849.
- Lewis, P. N., Momany, F. A. and Scheraga, H. A. (1971) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 68, 2293.
- Lian, L. Y., Yang, J. C., Derrick, J. P., Sutcliffe, M. J., Roberts, G. C. K., Murphy, J. P., Goward, C. R. and Atkinson, T. (1991) *Biochemistry*, 30, 5335.
- Macura, S. and Ernst, R. R. (1980) *Mol. Phys.*, 41, 95.
- Marion, D. and Wüthrich, K. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 113, 967.
- Mattice, W. L. (1989) *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 18, 93.
- Mayo, K. H., Parra-Diaz, D., McCarthy, J. B. and Chelberg, M. (1991) *Biochemistry*, 30, 8251.
- Mutter, M. and Vuilleumier, S. (1989) *Angew. Chemie*, 28, 535.
- Neuhaus, D. and Williamson, M. (1989) *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, VCH Publishers, Inc., New York.
- Nieto, J. L., Rico, M., Santoro, J. and Bermejo, F. J. (1985) *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 25, 47.
- Nomenclature, I.-I. C. o. B. (1970) *Biochemistry*, 9, 3471-3479.
- Olejniczak, E. T., Gampe, J., R.T. and Fesik, S. W. (1986) *J. Mag. Res.*, 67, 28.
- Orban, J., Alexander, P. and Bryan, P. (1992) *Biochemistry*, 31, 3604.
- Pace, C. N. (1990) *TIBS*, 15, 14.
- Pardi, A., Billeter, M. and Wüthrich, K. (1984) *J. Mol. Biol.*, 180, 7431.
- Perczel, A., Hollósi, M., Foxman, B. M. and Fasman, G. D. (1991) *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 9772.
- Pflugrath, J. W., Wiegand, G. and Huber, R. (1986) *J. Mol. Biol.*, 189, 383.
- Pincus, M. R. (1992) *Biopolymers*, 32, 347.
- Ptitsyn, O. B. (1987) *J. Prot. Chem.*, 6, 273.
- Ptitsyn, O. B. (1991) *FEBS Lett.*, 285, 176.
- Redfield, C. and Dobson, C. M. (1987) *Biochemistry*, 27, 122-136.
- Reed, J., Hull, W. E., Lieth, C. W., Kübler, D., Suhai, S. and Kinzel, V. (1988) *Eur. J. Biochem.*, 178, 141.
- Regan, L. (1991) *Current Opinion Biotech.*, 2, 544.
- Richardson, J. (1981) *Adv. Prot. Chem.*, 34, 167-339.

- Richardson, J. S. and Richardson, D. C. (1989) *TIBS*, 14, 304.
- Rico, M., Nieto, J. L., Santoro, J., Bermejo, F. J. and Herranz, J. (1983) *Org. Mag. Res.*, 21, 555.
- Rico, M., Bruix, M., Santoro, J., González, C., Neira, J. L., Nieto, J. L. and Herranz, J. (1989) *Eur. J. Biochem.*, 183, 623.
- Rico, M., Santoro, J., González, C., Bruix, M., Neira, J. L., Nieto, J. L. and Herranz, J. (1991) *J. Biomol. NMR.*, 1, 283-298.
- Ring, C. S., Kneller, D. G., Langridge, R. and Cohen, F. E. (1992) *J. Mol. Biol.*, 224, 685.
- Rooman, M. J. and Wodak, S. J. (1988) *Nature*, 335, 45.
- Rose, G. D., Winters, R.H., Wetlaufer, D.B. (1976) *FEBS Lett.*, 63, 10.
- Scholtz, J. M. and Baldwin, R. L. (1992) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 21, 95.
- Segawa, S. I., Fukuno, T., Fujiwara, K. and Noda, Y. (1991) *Biopolymers*, 31, 497.
- Shirley, B. A., Stanssens, P., Hahn, U. and Pace, C. N. (1992) *Biochemistry*, 31, 725.
- Skolnick, J. and Kolinski, A. (1990) *Science*, 250, 1121.
- Smith, J. A. and Pease, L. G. (1980) *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 8, 315.
- Stradley, S. J., Rizo, J., Bruch, M. D., Stroup, A. N. and Gierasch, L. M. (1990) *Biopolymers*, 29, 263.
- Stroup, A. N. and Gierasch, L. M. (1990) *Biochemistry*, 29, 9765.
- Tobias, D. J., Sneddon, S. F. and Brooks III, C. L. (1990) *J. Mol. Biol.*, 216, 783.
- van_Gunsteren, W. F. and Berendsen, H. J. C. (1987) *Groningen Molecular Simulation (GROMOS) Library Manual*, BIOMOS, Groningen. The Netherlands.
- Vértesy, L., Oeding, V., Bender, R., Zepf, K. and Neemann, G. (1984) *Eur. J. Biochem.*, 141, 505.
- Williamson, M. P. (1990) *Biopolymers*, 29, 1423.
- Wilmot, C. M. and Thornton, J. M. (1988) *J. Mol. Biol.*, 203, 221.
- Wright, P. E., Dyson, H.J., Lerner, R.A. (1988) *Biochemistry*, 27, 7167.
- Wüthrich, K., Billeter, M. and Braun, W. (1984) *J. Mol. Biol.*, 180, 715.
- Wüthrich, K. (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York.