

Tesis Doctoral

La proteína no-estructural NS1 exclusiva del virus respiratorio sincicial: mecanismo de plegamiento y ensamblado quasi-espontáneo de oligómeros esféricos estables

Pretel, Miguel Esteban

2014

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Pretel, Miguel Esteban. (2014). La proteína no-estructural NS1 exclusiva del virus respiratorio sincicial: mecanismo de plegamiento y ensamblado quasi-espontáneo de oligómeros esféricos estables. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Pretel, Miguel Esteban. "La proteína no-estructural NS1 exclusiva del virus respiratorio sincicial: mecanismo de plegamiento y ensamblado quasi-espontáneo de oligómeros esféricos estables". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

“La proteína no-estructural NS1 exclusiva del virus respiratorio sincicial: mecanismo de plegamiento y ensamblado *quasi*-espontáneo de oligómeros esféricos estables”.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área
Química Biológica

Méd. Miguel Esteban Pretel

Director: Dr. Gonzalo de Prat Gay

Consejero de Estudios: Dra. Ángeles Zorreguieta

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Estructura-Función e Ingeniería de Proteínas,
Fundación Instituto Leloir e IIBBA-CONICET, Buenos Aires Argentina.

Buenos Aires, 2014

Resumen

Título: “La proteína no-estructural NS1 exclusiva del Virus Respiratorio Sincicial: mecanismo de plegamiento y ensamblado quasi-espontáneo de oligómeros esféricos estables”.

Los Paramixovirus son una familia diversa de virus ARN de cadena negativa pertenecientes al orden de los Mononegavirales. Estos virus han evolucionado diversas estrategias para bloquear los mecanismos de respuesta inmune innata del huésped en el curso de un proceso infeccioso. El virus respiratorio sincicial (RSV) es la mayor causa de enfermedad pediátrica en el mundo. Este virus, contiene a dos proteínas no estructurales (NS1/NS2) la cuáles sólo se encuentran en RSV y no muestran homología con ninguna otra proteína. NS1 y NS2 han sido postuladas como los principales factores de virulencia de RSV, interviniendo en el bloqueo de la respuesta inmune inducida por el virus. Se han identificado múltiples blancos celulares que interactúan con NS1 y NS2, principalmente relacionados a las vías de inducción y respuesta a interferón. En este trabajo de tesis, se realizó el estudio de la conformación de NS1 en solución, haciendo uso de métodos bioquímicos y biofísicos para su estudio. Como primera medida, se desarrolló un protocolo de expresión y purificación que permitió obtener un rendimiento de 10 mg/L de proteína homogénea en solución. Se determinó que NS1 es un monómero plegado globular, el cual contiene regiones flexibles que presentan intercambio conformacional. La temperatura induce cambios estructurales que llevan a la formación de oligómeros esféricos solubles (NS1SOs) los cuales presentan propiedades amiloides. Se analizó la cinética de formación de estos oligómeros, a partir de lo cual se propone un modelo de ensamblado identificando eventos clave para el proceso. Por otro lado, estudios de plegamiento al equilibrio indican que NS1 se despliega cooperativamente en un proceso reversible de dos estados (Nativo – Desplegado), mientras que NS1SOs primero se disocia a monómeros nativos y luego se despliega. Estudios de cinética de plegado de NS1, indican que mientras que el despliegado de la proteína es relativamente sencillo, su plegado es complejo y limitado cinéticamente por la presencia de múltiples intermediarios, compatible con heterogeneidad cis/trans de prolinas en el estado desplegado. En resumen, en el presente trabajo se describe la diversidad conformacional de la proteína NS1. Esta proteína se encuentra en cuasi-equilibrio con oligómeros esféricos y estables, los cuales se forman en condiciones compatibles con un entorno celular. Estos estudios constituyen los primeros en analizar los equilibrios conformacionales para esta proteína y podrían explicar sus múltiples blancos y funciones reportadas.

Palabras claves: Virus respiratorio sincicial, NS1, plegamiento, oligómeros esféricos, amiloides.

Abstract

Title: “The non structural protein NS1 exclusive from RSV: folding mechanism and quasi-spontaneous assemble of stable spherical oligomers”

Paramixoviruses are a diverse family of negative-strand RNA viruses that belong to the order of Mononegavirales. These viruses evolved different strategies in order to block the host innate immunity during infection. Respiratory Syncytial Virus (RSV) is the major infectious agent that causes pediatric respiratory disease worldwide. RSV contains the two non structural proteins (NS1 and NS2) which are unique to RSV and show no homology to any other protein in relation to its primary structure. These two proteins were postulated as the RSV major virulence factors, and play a central role in blocking the immune response induced by the virus. Multiple cellular targets have been reported for NS1 and NS2, mainly related to the interferon pathways. In this thesis, we studied the NS1 conformation in solution, making use of different biochemical and biophysical techniques. First, we developed an expression and purification protocol which allowed us to obtain 10 mg/L of highly purified protein. We observed that NS1 is a folded and globular monomer which contains some flexible regions subject to slow conformational motions. Temperature induces a cooperative structural change leading to soluble and spherical oligomers (NS1SOs) with amyloid properties. We performed a kinetic analysis which allowed us to propose a model in relation to oligomer formation, identifying key events of the process. Equilibrium folding studies revealed that NS1 unfolds following a two-state reaction, in a fully reversible process, whereas NS1SOs first dissociates into native monomers and them unfolds. On the other hand, kinetic folding studies indicated that although unfolding is a rather simple process, refolding is complex, limited by multiple kinetic intermediates, compatible with prolyl cis/trans heterogeneity in the unfolded state. In summary, the present work describes the conformational diversity of the NS1 protein. NS1 exists in quasi-equilibrium with stable and spherical oligomers, which are formed in conditions compatible with a cellular environment. This work represents the first study in relation to conformational equilibria of the NS1 protein and may explain its multiple binding partners and functions reported.

Keywords: Respiratory Syncytial Virus, NS1, folding, spherical oligomers, amyloids.

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar esta sección agradeciendo a Gonzalo por abrirme las puertas del laboratorio, permitirme siempre explorar con libertad, guiarme y ayudarme a resolver los diferentes problemas que se fueron planteando.

A todos mis compañeros del lab 209, con quienes compartí muchas horas de trabajo, discusión de resultados y tantas cosas. Porque fueron clave para mi doctorado, apoyando en los momentos difíciles y ayudaron a superar la mayoría de las dificultades experimentales. Por todas las salidas que compartimos y porque considero que representan un equipo genial para trabajar. A Lu, Sol, Leo, Gabi, Gabi N, Marikena, Tamara, Silvina, Julia, Ivana. A los que ya no están en el lab: Seba, Mariano, Nacho, Ángeles, Clara, Mariángeles, Karina, Diana, Laura, Santi, Paula.

Al Instituto Leloir, la gente de biblioteca, droguero, administración, mantenimiento, que facilitan mucho el trabajo de cada día. A mi comité de seguimiento de tesis integrado por la Dra. Andrea Gamarnik y los doctores Ricardo Wolosiuk y Luis Ielpi, por las buenas sugerencias y críticas constructivas.

A mi familia y personas que están conmigo, por el apoyo a lo largo de estos años.

PUBLICACIONES

- Pretel E., Camporeale G. y Prat Gay G. de (2013). The non-structural NS1 protein unique to respiratory syncytial virus: a two-state folding monomer in quasi-equilibrium with a stable spherical oligomer. Plos One, 8(9):e74338.
- Pretel E., Chemes L.B., Sanchez I.E., Fassolari M. y Prat Gay G. de (2014) Folding and oligomerization mechanism of the NS1 protein from human respiratory syncytial virus. A ser enviado.

ÍNDICE

	Página
CAPÍTULO I: Introducción	
I.1 Paramixovirus: Familia y sus Características Principales	15
I.2.1 Virus respiratorio Sincicial humano	16
I.2.2 Relevancia Clínica	16
I.2.3 Genoma y Proteínas Virales	16
I.2.4 Ciclo de Vida	18
I.3.1 Proteínas no estructurales: NS1 y NS2	20
I.3.2 Las Vías de Inducción y Respuesta a Interferón	21
I.3.3 Bloqueo de las Vías de Interferón por NS1 y NS2	22
I.3.4 NS1 interactúa con Múltiples Blancos Celulares	24
I.3.5 Funciones Independientes del Bloqueo de las vías de Interferón	25
I.4 Bloqueo de las Vías de Interferón por otros Paramixovirus	25
I.5 vacunas contra HRSV Y Las proteínas no estructurales	27
I.6 Objetivos de la tesis	30
CAPÍTULO II: Clonado, expresión recombinante y purificación de NS1	
II.1. Clonado y sistemas de expresión utilizados	34
II.2. Pruebas realizadas para la expresión de NS1	35
II.3.1 Desarrollo de un protocolo de purificación 6xHis-NS1	38
II.3.2 Expresión soluble de 6xHis-NS1	39
II.3.3 Precipitación fraccionada con Sulfato de Amonio	39
II.3.4 Purificación por cromatografía de afinidad a metales divalentes (IMAC)	39
II.3.5 Corte con Trombina y cromatografía de exclusión molecular	40
II.4.1 1 Desarrollo de un protocolo de purificación MBP-NS1	41
II.4.2 Expresión soluble de MBP-NS1	41
II.4.3 Precipitación fraccionada con Sulfato de Amonio	42
II.4.4 Columna de afinidad por maltosa	42
II.4.5 Corte con Trombina y cromatografía de exclusión molecular	43
II.5. Expresión de MBP-NS1 en medio mínimo para su marcación ¹⁵ N/ ¹³ C	44
II.6 Rendimiento de protocolos desarrollados para la expresión a escala de NS1	45

II.7. CONCLUSIONES	47
CAPÍTULO III: Estudio de las propiedades conformacionales de NS1 en solución	
III.1 Caracterización de NS1 y su conformación en solución	51
III.2 Efecto del pH sobre la estructura y conformación de NS1	53
III.3.1 Efecto de la temperatura sobre la estructura de NS1	55
III.3.2 Efecto de la temperatura a 0.2 M de cloruro de sodio	55
III.3.3 Efecto de la temperatura a baja fuerza iónica	56
III.4 Estudio del efecto de cosolventes sobre NS1	58
III.5 análisis del Estado de oxidación de NS1	59
III.6 análisis conformacional por Proteólisis limitada	62
III.7 Estudio conformacional por RMN	63
III.8 Discusión	66
CAPÍTULO IV: Mecanismo de Plegado de NS1	
IV.1 Estabilidad y plegamiento al equilibrio	72
IV.1.1 Desnaturalización de NS1 con cloruro de guanidinio	72
IV.2 Estudio cinético del proceso de desplegado	75
IV.2.1 Cinética de desplegado	75
IV.3 Estudio cinético del proceso de plegamiento	80
IV.3.1 Cinética de plegamiento	80
IV.3.2 Gráfico de “Chevron”	85
IV.3.3 Análisis de los datos de replegado	87
IV.4 Discusión	91
CAPÍTULO V: Mecanismo de ensamblado de NS1SOs	
V.1 Propiedades conformacionales de NS1SOs	98
V.1.1 Morfología de los oligómeros obtenidos por tratamiento térmico	98
V.1.2 Unión a Tioflavina T, Rojo Congo y ANS de NS1SOs	99
V.2 Estabilidad de NS1SOs	99
V.3 Análisis cinético del ensamblado de NS1SOs	101
V.4.1 Mecanismo de oligomerización de NS1SOs	104
V.4.2 Estudios de dependencia de concentración	104

V.4.3 Determinación del tamaño del núcleo y orden de la reacción	106
V.4.4 Determinación de la etapa irreversible	108
V.5 Discusión	110
CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN GENERAL	113
MATERIALES Y MÉTODOS	123
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139
ANEXO	145

ABREVIATURAS

AFM	Microscopía de fuerza atómica
ANS	Acido 1-anilino, 8-naftalensulfónico
ASA	Superficie accesible al solvente
BSA	Albúmina sérica bovina
CD	Dicroísmo circular
CSM	Centro de masa espectral
DLS	Dispersión de luz dinámica
DO	Densidad óptica
DTNB	5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzólico)
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
Gdm.Cl	Cloruro de guanidinio
Glc	Glucosa
HRSV	Virus respiratorio sincical humano
HSQC	Correlación heteronuclear cuántica simple
IMAC	Cromatografía de afinidad a metales divalentes
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
MALDI-TOF	Desorsión/ionización láser asistida por matriz
MBP	Proteína de unión a maltosa
MM	Medio mínimo
MRW	Elipticidad molar
NS1	Proteína no estructural 1
NS1SOs	Oligómeros esféricos de NS1
NS2	Proteína no estructural 2
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
RC	Rojo congo
RMN	Resonancia magnética nuclear
SDS	Dodecilsulfato sódico
SLS	Dispersión de luz estática
TFE	Trifluoro-etanol
TNB	Acido trinitrilo benzoico
UA	Unidades arbitrarias
UV	Ultra violeta
TCEP	Tris (2-carboxyethyl) fosfina
ThT	Tioflavina T
TSE	Colección de moléculas del estado de transición
2BME	2 beta-mercapto-etanol

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

I.1 PARAMIXOVIRUS: Familia y sus Características Principales

La familia *Paramixoviridae*, perteneciente al orden de los Mononegvirales, está formada por un grupo grande de virus causantes de enfermedades en animales y humanos. Según la clasificación actual, se encuentra subdividida en dos subfamilias: *Paramyxovirinae* y *Pneumovirinae*. La subfamilia *Paramyxovirinae* contiene al virus Sarampión (uno de los virus de mayor prevalencia y poder infeccioso), al virus Parainfluenza (grupo de virus que son causa importante de enfermedades respiratorias en humanos y animales), el Mixovirus parotiditis (causante de la llamada paperas, por afección de una o ambas glándulas parótidas) y al virus de la enfermedad Newcastle (produce una enfermedad zoonótica que afecta a aves de corral), entre otros [1]. La subfamilia *Pneumovirinae* está principalmente integrada por el virus respiratorio sincicial y metapneumovirus con sus variantes que afectan a humanos y animales, siendo causantes de enfermedades respiratorias en el mundo entero [2,3].

La clasificación de los paramixovirus en dos grandes subfamilias se realiza en función de su morfología, organización del genoma y proteínas codificadas. Sin embargo, todos tienen en común el hecho de ser virus con envoltura de membrana donde su material genético esta formado por una única cadena de ARN, no segmentada y de polaridad negativa.

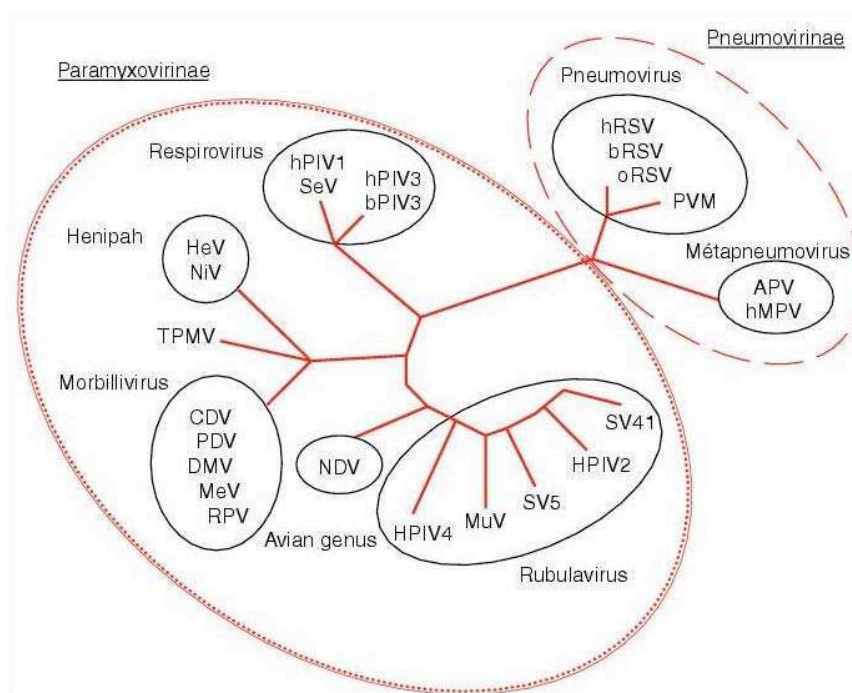


Figura 1.1 Árbol filogenético de la familia *Paramixoviridae*. Se muestran los principales integrantes de las subfamilias *Pneumovirinae* y *Paramyxovirinae*: hRSV (virus respiratorio sincicial humano), bRSV y oRSV (virus respiratorio sincicial bovino y ovino), PVM (virus de la neumonía murina), hMPV (metapneumovirus humano), APV (pneumovirus aviarios), hPIV1, hPIV2, hPIV3 y hPIV4 (virus parainfluenza 1, 2, 3 y 4 humanos, nótese que pertenecen a diferentes géneros), SV41 (virus pParainfluenza de simio 41), SV5 (virus parainfluenza de simio 5 también llamado PIV5), MuV (virus parotiditis), MeV (virus sarampión), NDV (virus de la enfermedad Newcastle). SeV (virus sendai). Figura tomada de referencia [4].

I.2.1 VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL HUMANO

I.2.2 Relevancia Clínica

El Virus Respiratorio Sincicial Humano (HRSV, de sus siglas en inglés) es uno de los paramixovirus de mayor prevalencia a nivel mundial. De hecho, HRSV es la principal causa de enfermedad respiratoria severa en niños menores de 1 año, siendo el principal agente causal de bronquiolitis y neumonía [2]. Estudios epidemiológicos mostraron que alrededor del 70% de lactantes menores a un año y del 100% de niños menores a 2 años habían experimentado infección por HRSV [2]. La organización mundial de la salud, estima una mortalidad anual de 160.000 individuos en todo el mundo [2]. Estudios realizados en nuestro país sugieren que HRSV es la principal causa de infección respiratoria que lleva a enfermedad severa y hospitalización en niños pequeños con patología de base (cardíaca o pulmonar) [5,6]. A su vez, HRSV es una causa importante de morbilidad en adultos, principalmente ancianos y pacientes inmunocomprometidos, para los cuales en todos los casos representan re-infecciones con cuadros clínicos con severidad entre moderada y alta [7]. Típicamente, el mayor porcentaje de casos se producen durante los meses de otoño-invierno, en el marco de brotes epidémicos. Es importante destacar que no existe hasta el momento un tratamiento específico efectivo o vacuna disponible para HRSV y que el uso de antivirales como la Ribavirina tiene resultados discutibles [8]. Con fines inmuno-profilácticos en lactantes de alto riesgo como prematuros o con cardiopatías congénitas, se utiliza el anticuerpo monoclonal *Palivizumab* (Synagis), el cual no previene de la infección pero restringe la replicación del virus lo suficiente como para limitar la enfermedad y su uso se encuentra limitado por su alto costo [8,9,10].

I.2.3 Genoma y Proteínas Virales

HRSV es un virus con envoltura de membrana, con un genoma de ARN de simple cadena negativa no segmentado, de 15.2 kilobases [2]. Como todos los Mononegavirales, la replicación del genoma implica la formación de una copia exacta y complementaria, llamada antígenoma. Tanto el genoma como el antígenoma se encuentran encapsidados con la proteína N viral, tanto en células infectadas como en el virión. El genoma contiene 10 genes que son transcritos secuencialmente en el sentido 3' a 5' a ARN_m subgenómicos independientes (Figura 1.2, A). Estos genes se encuentran interpuestos entre secuencias de iniciación y terminación, que son reconocidos por el complejo polimerasa viral. Cada ARN_m contiene un sólo marco de lectura abierto, a excepción del gen M2 el cual presenta dos marcos abiertos de lectura superpuestos que codifican para las proteínas M2-1 y M2-2. Por lo tanto, de los 10 genes, se expresan 11

proteínas virales (ver Tabla 1.1). Cuatro de ellas pertenecen a la nucleocápside: proteína N, fosfoproteína P, factor de elongación de la transcripción M2-1, y la subunidad mayor de la ARN polimerasa, L. Posee tres proteínas transmembrana en la envoltura: la proteína de Fusión F, la glicoproteína de unión G, y la proteína hidrofóbica pequeña, SH; una proteína de matriz M de función esencial en la infección, y M2-2, un factor regulatorio del ARN viral. Posee además dos proteínas no estructurales (NS1 y NS2) implicadas en el bloqueo de la inmunidad innata y las cuales son exclusivas de RSV, por lo que no se encuentran en ningún otro virus de la familia (ver más abajo).

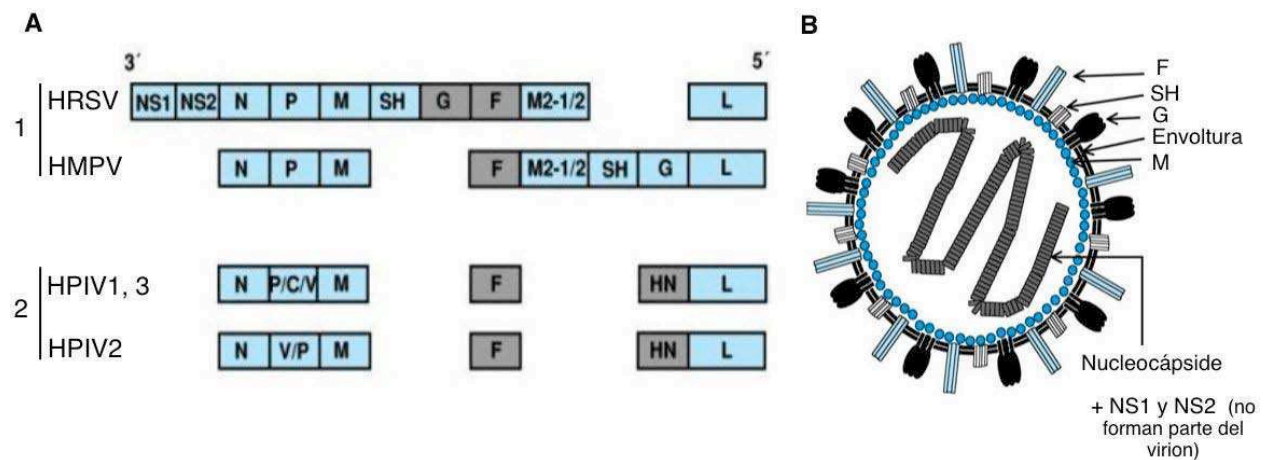


Figura 1.2 Organización de genoma en HRSV y otros paramixovirus. A) Se muestra la organización del genoma de HRSV en comparación con el genoma de Metapneumovirus humano (de la misma sub-familia: *Pneumovirinae*, en 1) y con los genomas del virus Parainfluenza 1 y 3 y del virus Parainfluenza 2 (correspondientes a la subfamilia *Paramixovirinae*, en 2). B) Esquema de la estructura propuesta para el virión de HRSV. Figura adaptada de referencia: [2].

En base a la reactividad contra determinantes antigénicos de las proteínas G y F mediante la utilización de anticuerpos monoclonales, HRSV puede ser clasificado en 2 sub-grupos, HRSV-A y HRSV-B [11]. A partir de variaciones en la secuencia del gen G, las cepas del sub-grupo A pueden ser sub-clasificadas en 8 genotipos (GA1-GA7 y SAA1) al igual que las cepas del sub-grupo B (BA, GB1-GB4 y SAB1-3) [12]. El genotipo GA3 del subgrupo A ha sido relacionado con enfermedad severa, aunque no es la cepa de mayor prevalencia a nivel mundial [13,14]. Los genotipos de mayor prevalencia a nivel mundial lo constituyen el genotipo GA2 del subgrupo A y en genotipo BA (de Buenos Aires, por ser originalmente identificado en esta ciudad) del sub-grupo B.

El virión de RSV es heterogéneo en tamaño, con un diámetro de aproximadamente 150 nm de promedio, en su forma esférica. No obstante, frecuentemente se encuentra en forma filamentosa. Posee una nucleocápside helicoidal y simétrica, envuelta en una bicapa lipídica

proveniente de la célula huésped, que contiene a las glicoproteínas G, F y SH. Se cree que la proteína M forma una capa en la cara interna de la envoltura. (Figura 1.2, B).

Tabla 1.1 Principales funciones de la proteínas del Virus Respiratorio Sincicial

Proteínas de HRSV	
Proteína	Principal función reportada
Nucleoproteína (N) ⁺	Componente principal de la nucleocápside. N es una proteína que se encuentra íntimamente unida al ARN viral.
Fosfoproteína (P) ⁺	Cofactor esencial de la polimerasa. Su estructura tetramérica y fosforilación serían esenciales para su función.
M2-1 ⁺	Componente del complejo polimerasa. Promueve la procesividad de la transcripción actuando como un factor elongador y antiterminador.
Polimerasa (L) ⁺	Asociado a la nucleocápside, es el componente principal del complejo polimerasa.
Matriz (M) ⁺	Importante en la morfogénesis del virus por dirigir el ensamblado del los componentes del virión.
Fusión (F) ⁺	Glicoproteína de transmembrana de la envoltura, importante para la unión y entrada del virus a la célula.
Gliocoproteína G	Glicoproteína de transmembrana de la envoltura. Participa en la unión del virus a la célula.
Pequeña e Hidrofóbica (SH)	Proteína de transmembrana de la envoltura, no esencial y de función poco conocida.
M2-2	Participa en la regulación en la síntesis de ARN, mediando el cambio entre transcripción y replicación.
NS1	Participa en el bloqueo de la vía de inducción y respuesta a interferón alfa y beta.
NS2	Participa en el bloqueo de la vía de inducción y respuesta a interferón alfa y beta.

+ Se consideran proteínas esenciales para la viabilidad del virus. Tabla adaptada de referencia: [2].

I.2.4 Ciclo de Vida

El Virus Respiratorio Sincicial se une a la superficie de células ciliadas del epitelio respiratorio a través de la fusión con la membrana plasmática, unión que se realiza entre glicosaminoglicanos de la célula huésped y las proteínas G y F de la envoltura del virus [2]. La entrada del virus es mediada por la proteína F (de fusión). Una vez dentro de la célula la transcripción y replicación se llevan a cabo en el citoplasma. La transcripción se produce en forma de gradiente desde el extremo 3' de la cadena de ARN, lo que da origen a ARN_m

subgenómicos a partir del reconocimiento de la polimerasa de las secuencias de iniciación y terminación de la transcripción de cada gen. La proteína M2-2 gobierna la transición entre transcripción y replicación para la producción de ARN genómico. Para esto último, la ARN polimerasa cambia a un modo de lectura directa, donde las secuencias de iniciación y terminación no son reconocidas, llevando a la producción de una copia positiva de ARN complementaria (antigenoma), la cual sirve como molde para la síntesis del ARN genómico. La proteína M regula el ensamblado por interacción con las glicoproteínas F y G (se localizan en la membrana plasmática de la célula), y con las proteínas de la nucleocápside (N, P, L y M2-1). A modo de brotes, se produce la liberación por la cual se adquiere la envoltura a partir de la membrana plasmática (Figura 1.3). La expresión de la proteína F en la membrana plasmática de células infectadas (como las células ciliadas del epitelio respiratorio) lleva a la fusión de membranas contiguas, lo que produce la formación de sincicios (de ahí el nombre del virus) que llevan a la muerte celular [2,3].

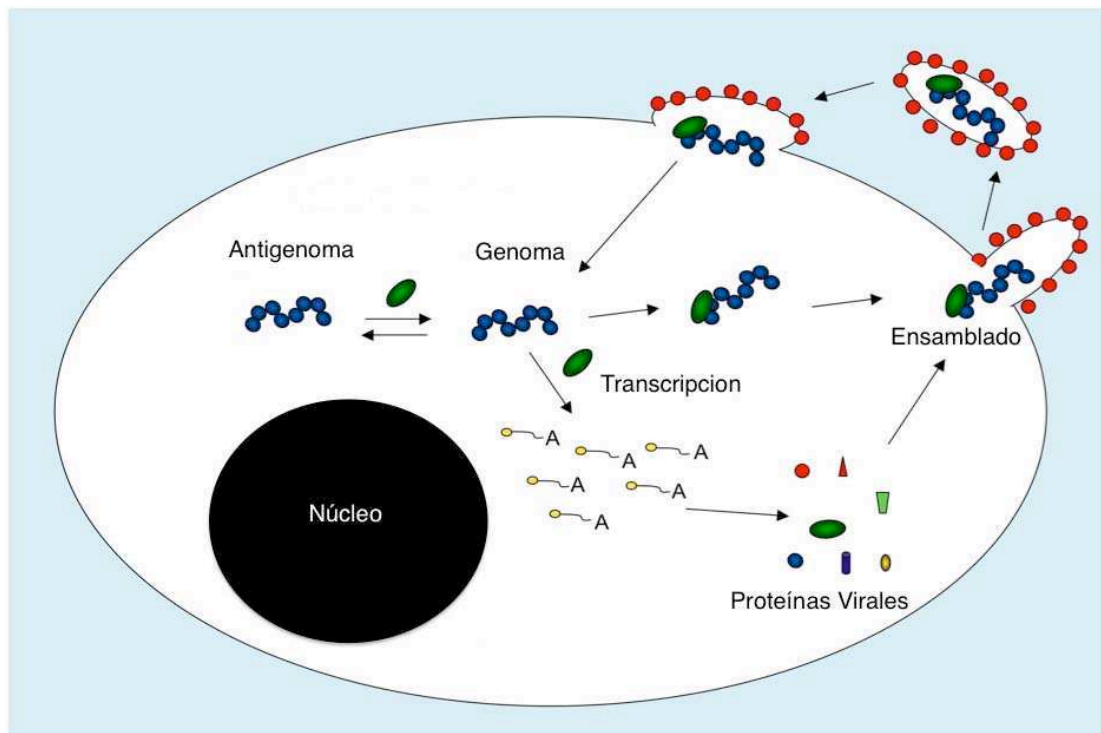


Figura 1.3 Ciclo de vida del HRSV. El virus se une a la superficie celular a través de las proteínas de la envoltura. Luego de la fusión de la envoltura con la membrana plasmática de la célula, la nucleocápside es liberada al citoplasma. A partir del genoma se transcriben ARN_m individuales para cada gen. Posteriormente a la síntesis de una copia de ARN de cadena positiva (antigenoma) se realiza la síntesis de ARN genómico. El ensamblado da origen a la partícula viral, la cual es liberada en forma de brotes.

I.3.1 PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES: NS1 Y NS2

Las proteínas no estructurales NS1 y NS2 de HRSV como se mencionó, son únicas de este virus, y no se ha encontrado homología en su estructura primaria con ninguna otra proteína conocida [2]. NS1 es una proteína de 139 aminoácidos y 15.6 KDa. Al comienzo del trabajo correspondiente a la presente tesis doctoral, se disponía sólo de un antecedente donde se realizó una caracterización biofísica inicial, indicando la dificultad para su obtención recombinante y sus principales propiedades en solución, como ser que: 1) NS1 se encuentra en forma monomérica en solución; 2) su estructura secundaria analizada por dicróismo circular indica la presencia de estructuras de tipo alfa-hélice y láminas beta con un porcentaje importante de regiones sin definir su estructura (Figura 1.4) [15].

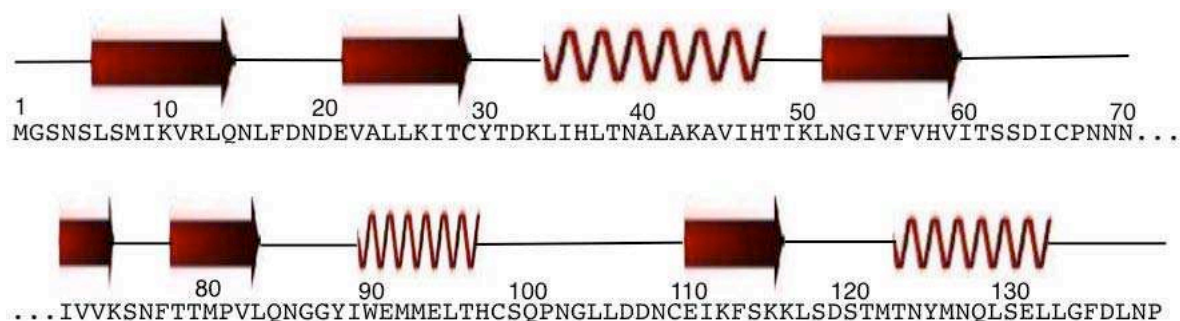


Figura 1.4 Estructura primaria de NS1 y su estructura secundaria predicha utilizando el programa Jpred (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>).

Por otra parte, NS2 también es una proteína pequeña de 14.7 KDa y 124 residuos aminoácidos, de la cual no se disponen datos en relación a su conformación en solución. Al comparar la estructura primaria de ambas proteínas del subtipo A con sus homólogas del subtipo B, bovinas y murinas (virus llamado “*pneumonie virus of mice*, del inglés el cual se abrevia PVM), se observó que hay una alta homología de secuencia entre los dos subtipos humanos (87% para NS1 y 92% para NS2). La homología de secuencia sigue siendo alta al comparar el subtipo A con variantes bovinas (69% para NS1 y 84% para NS2). Por último, la identidad de secuencia baja considerablemente al comparar la secuencia del subtipo A con proteínas de ratón donde, se observó que la identidad de secuencia baja al 16% para NS1 y al 20% para NS2 (Tabla 1.2) [2,3]. Para visualización de alineamientos entre subtipos A y B y alineamientos de distintas especies para NS1 ver figuras suplementarias A1-A2 en Anexo.

Tabla 1.2 Porcentaje de identidad de secuencia entre las proteínas NS1 y NS2 de HRSV-A con HRSV-B, y homólogas de RSV bovino y murino (PVM).*

	% IDENTIDAD DE SECUENCIA	
	NS1	NS2
HRSV-B	87	92
RSV Bovino	69	84
PVM	16	20

* Tabla adaptada de referencia: (2).

Para ambas proteínas han sido reportadas múltiples funciones, que se resumen esquemáticamente en la figura 1.5. La función principal y más estudiada para las proteínas NS1 y NS2 de HRSV se centra en el bloqueo de los mecanismos de inmunidad innata, mayormente afectando las vías de producción y señalización de interferón (ver más abajo).

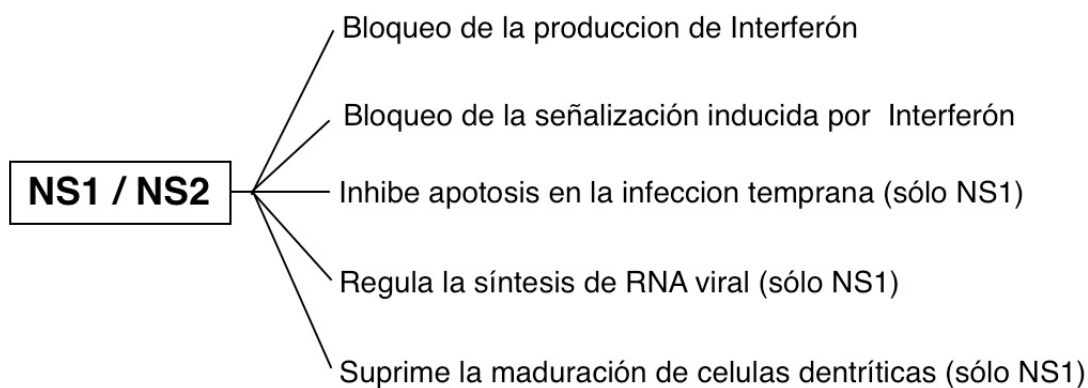


Figura 1.5 Esquema donde se indican las principales funciones de las proteínas no estructurales: NS1 y NS2.

I.3.2 Las Vías de Inducción y Respuesta a Interferón

En las etapas tempranas de la infección viral se desencadenan mecanismos inmunes innatos y adaptativos que tienen como fin limitar la propagación del virus. La primera línea de defensa frente a la infección la constituye la activación de las vías de interferón [16,17,18,19]. Luego de ingresar a la célula huésped, la síntesis de ARN viral da origen a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs del inglés, por “*pathogen-associated molecular patterns*”) que se unen a determinados receptores de estos patrones [20,21]. El ARN viral induce la activación de dos vías relacionadas a los receptores de reconocimiento de ARN viral. Por un lado los sensores de ARN viral MDA5 y RIG-I al tomar contacto con productos de la síntesis de RNA del virus, promueven la interacción del dominio CARD (del inglés por “*capase recruitment*”

domain”) de estos receptores con el dominio de igual nombre de la proteína MAVS, presente en la membrana externa de la mitocondria (también llamada IPS-1-VISA o CARDIF) [20,22]. La interacción RIG-I o MDA-5 con MAVS, induce la oligomerización de MAVS que da lugar a estructuras filamentosas con la capacidad de amplificar la cascada de señales que llevan a la producción de interferón [23]. Brevemente, la formación de estructuras filamentosas por MAVS lleva a la activación de TRAF-3 y un conjunto de quinasas llamadas IKK ϵ y TBK1. Estas quinasas median la fosforilación del factor IRF3, el cual una vez fosforilado homodimeriza y se trasloca al núcleo donde en cooperación con IRF-7 fosforilado, AP-1 y NF κ B, activa a los promotores de los genes de interferón tipo I, para la producción de interferón α y β [24,25]. Por otro lado, el receptor tipo toll -3 (TLR3, del inglés “*toll like receptor 3*”) luego de reconocer productos de la síntesis de ARN viral lleva a la activación de las quinasas IKK ϵ y TBK1 a través de la proteína adaptadora TRAF3, convirtiendo a TRAF3 en un punto de integración entre ambas vías [26]. Se cree que la vía de TLR3 sería más relevante en células dendríticas, y la vía mediada RIG-I/MDA5 tendría un rol principal en células epiteliales respiratorias [27,28].

Una vez que el Interferón ha sido producido y liberado, el mismo actúa de manera autócrina y parácrina. Interferón α y β se unen a sus receptores en la membrana celular, activando la vía de las JAK/STAT del inglés: “*Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*”, [29,30]. Se promueve particularmente la activación de STAT1 y STAT2 a través de su fosforilación. Una vez activadas, estas proteínas llevan a la activación de la transcripción de genes estimulados por interferón como la quinasas PKR, MxA o la 2'-5' oligoadenilato sintetasa, las cuales participan de la resistencia de la célula a la infección [31].

I.3.3 Bloqueo de las Vías de Interferón por NS1 y NS2

Aún no ha sido aclarado por completo el mecanismo por el cual HRSV evade el sistema inmune, aunque se sabe que este rol estaría mediado por las proteínas no estructurales NS1 y NS2. Estas proteínas actuarían en varios niveles de las vías de interferón, disminuyendo la expresión y el efecto de interferón α y β (Figura 1.6) [32,33,34,35,36]. Aunque no son esenciales para la replicación del virus *in-vitro*, experimentos realizados *in-vivo* con virus recombinantes con los genes de NS1 y NS2 eliminados del genoma, demostraron que el virus se comporta en forma atenuada con un menor efecto supresor de la vía de interferón, permitiendo niveles más altos de estas citoquinas [37,38,39]. En cuanto a su localización dentro la célula, NS1 y NS2 se encuentran principalmente en el citoplasma en la infección temprana, con una fracción importante asociada a mitocondrias, aunque también se encontraron localizadas en el núcleo, en menor proporción [33,40,41]. Se reportó que la proteína NS2 interactúa con el sensor

de ARN viral RIG-I, lo que evitaría la interacción MAVS-RIG-I y la cascada de señales que ésta interacción induce [42]. Por otro lado se observó co-localización de NS1 con la proteína asociada a mitocondria MAVS [41]. La expresión de NS1 disminuye los niveles de TRAF3 y la quinasa IKK ϵ que fosforila al factor IRF3. Esto se traduce en niveles bajos de IRF3 fosforilado, factor responsable de la activación de los promotores que regulan la transcripción de interferón α y β [40,43,44]. Por otro lado, se observó que ambas proteínas median la degradación vía proteosoma de STAT2, bloqueando la vía de respuesta a interferón, posiblemente formando parte de un complejo oligomérico con actividad E3 ligasa [45,46].

En un estudio reciente se determinó que las proteínas NS1 y NS2 forman parte de un complejo macromolecular heterogéneo al cual estarían asociados muchos de los blancos asociados a estas proteínas como ser: RIG-I, TRAF3, IRF3, IRF7 y STAT-2. Este complejo fue llamado “degradosoma”, por contener actividad degradativa y proteasas de la subunidad 20S del proteosoma. El complejo degradosoma se encontró asociado a mitocondrias y su actividad degradativa se vió incrementada en presencia de la proteína MAVS [47].

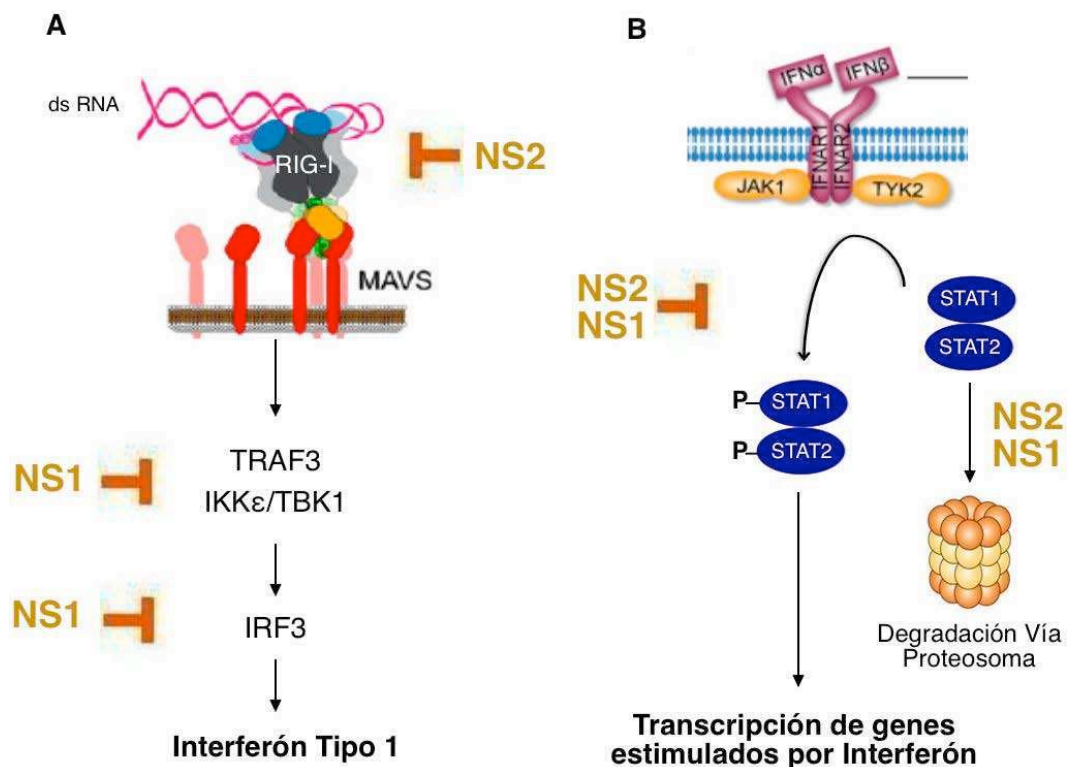


Figura 1.6 Esquema simplificado de activación de las vías de producción (en A) y señalización (en B) de Interferón α y β . Productos de la síntesis de ARN viral interactúan con RIG-I activando una cascada de señales que lleva a la traslocación de IRF3 al núcleo. Se producen diferentes tipos de interferón tipo I (alfa y beta) los que una vez liberados, se unen a su receptor y activan una vía de señalización que lleva a la transcripción de genes regulados por interferón. Estas cascadas de señales pueden ser inhibidas en múltiples niveles por las proteínas NS1 y NS2 de HRSV.

I.3.4 NS1 interactúa con Múltiples Blancos Celulares

NS1 establece múltiples interacciones, ya sea con otras proteínas virales, así como diferentes blancos celulares, principalmente con los relacionados a las vías de interferón. Se postula que NS1 interactúa con NS2, con la proteína de Matriz y el dominio C-terminal de la proteína P, del RSV[40,48]. Estudios a nivel proteómico proponen una larga lista de proteínas que interactúan con NS1 o se ven reguladas por su expresión, muchas relacionadas a las vías de interferón, pero también otras relacionadas a la regulación del ciclo celular y regulación de la transcripción de genes, entre otras [49,50,51]. En la tabla 1.2 se lista a modo de ejemplo, algunas de las proteínas para las cuáles se ha observado interacción con NS1 o se vieron reguladas por su expresión. Es difícil imaginar que una proteína pequeña pueda interactuar específicamente con una lista de más de 200 blancos, sin embargo esto podría indicar que muchas de las proteínas reportadas podrían ser el resultado de interacciones que se realizan en forma indirecta. De cualquier manera, las múltiples interacciones observadas confirman la multifuncionalidad de éstas proteínas.

Tabla 1.2 Proteínas que interactúan con NS1 o se ven reguladas por su expresión

Blancos Virales*	Función de la interacción
P	Desconocida.
M	Desconocida.
NS2	Bloqueo de las vías de inducción y respuesta a interferón.
Blancos Celulares*	Función de la interacción
MAP1B	Desconocida. Podría fijar a NS1 a receptores mitocondriales o a proteínas blanco.
Culin-2, Elongin C	Formaría parte de un complejo E3 ligasa junto NS2.
TRAF3	Bloqueo de la vía de inducción o producción de interferón.
IKKε	Bloqueo de la vía de inducción o producción de interferón.
STAT-2	Bloqueo de la vía de respuesta o señalización de interferón.
MAVS	Bloqueo de la vía de inducción o producción de interferón.
Histona H2BD	Desconocida. Posible regulación epigenética de genes.
Histona H4F	Desconocida. Posible regulación epigenética de genes.
RNA Polimerasa II	Desconocida. Posible regulación de la transcripción de genes.
ATR	Desconocida. Posible implicancia en el arresto de células en fase G ₀ /G ₁ .
SOD-2	Desconocida. Su expresión es regulada por NS1.
SERPINB9	Desconocida. Su expresión es regulada por NS1.
ISG15	Desconocida. Su expresión es regulada por NS1.
G6PD	Desconocida. Su expresión es regulada por NS1.

* Blancos celulares de interacción con NS1 o regulados por su expresión. Extraídos de referencias: [43,48,49,50,51].

I.3.5 Funciones Independientes del Bloqueo de las vías de Interferón

Se demostró que ambas proteínas, NS1 y NS2, inhibirían la apoptosis celular en las fases iniciales de la infección, por un mecanismo no dependiente de interferón, en una vía que parecería involucrar a la activación de NFκB [52]. A su vez, NS1 es capaz de suprimir la maduración de células dendríticas y la respuesta a células T [53,54]. Estudios realizados utilizando mini replicones mostraron que NS1 regula la síntesis de ARN [55]. Asimismo, virus recombinantes sin los genes de NS1/NS2 replicaron en menor cantidad que el virus con su genoma completo, incluso en células deficientes de interferón, indicando que estas proteínas desempeñan funciones para la replicación del virus, no relacionadas con su efecto antagónico de interferón [39].

I.4 BLOQUEO DE LAS VÍAS DE INTERFERÓN POR OTROS PARAMIXOVIRUS

Diferentes proteínas no estructurales de otros virus de la familia muestran efectos antagónicos a interferón, como la proteína V de muchos paramixovirus (como el virus parainfluenza 5, PIV5), o la proteína C de algunos respirovirus (como el virus sendai) y mobilivirus (virus sarampión). La proteína V es la más estudiada de este grupo de proteínas. La misma es traducida a partir de transcritos del gen de la proteína P a la cual se le han insertado 2 guaninas (proceso de edición de ARN), lo cual altera el marco de lectura y permite la producción de V [1,56]. El dominio C-terminal (CTD) de V, es muy conservado en miembros de la familia de paramixovirus y contiene un motivo no canónico de unión a zinc, formado por siete cisteínas y una histidina que coordinan dos átomos de zinc. El dominio N-terminal es menos conservado y se asume es más flexible con regiones parcialmente desplegadas [57,58].

Existen numerosos reportes que indican el hecho que la proteína V bloquea la inmunidad innata en varios niveles (Figura 1.7) [59,60,61]. Brevemente, la unión de esta proteína al factor IRF3 previene su traslocación al núcleo, inhibiendo su acción como factor de transcripción [62]. A su vez, se ha descrito la inhibición de las kinasas IKKε y TBK1 por parte de proteínas V. Se ha observado la unión de estas proteínas al sensor de ARN MDA5, lo que bloquearía la cascada de señales que lleva a la producción de interferón [61,63].

Por otro lado, se ha reportado que proteínas V de algunos paramixovirus unen y secuestran STAT1 y STAT2, previniendo su acumulación nuclear [64]. En algunos paramixovirus como PIV5, la inhibición de STAT1/2 es mediada por un mecanismo indirecto a través de la unión de V con STAT1/2 y la proteína adaptadora DDB1, que se relaciona con la maquinaria del complejo ubiquitina ligasa DDB1-Cul4A, lo cual lleva a la formación de

especies oligoméricas macromoleculares y esféricas, dirigiendo la degradación de STAT vía proteosoma [65].

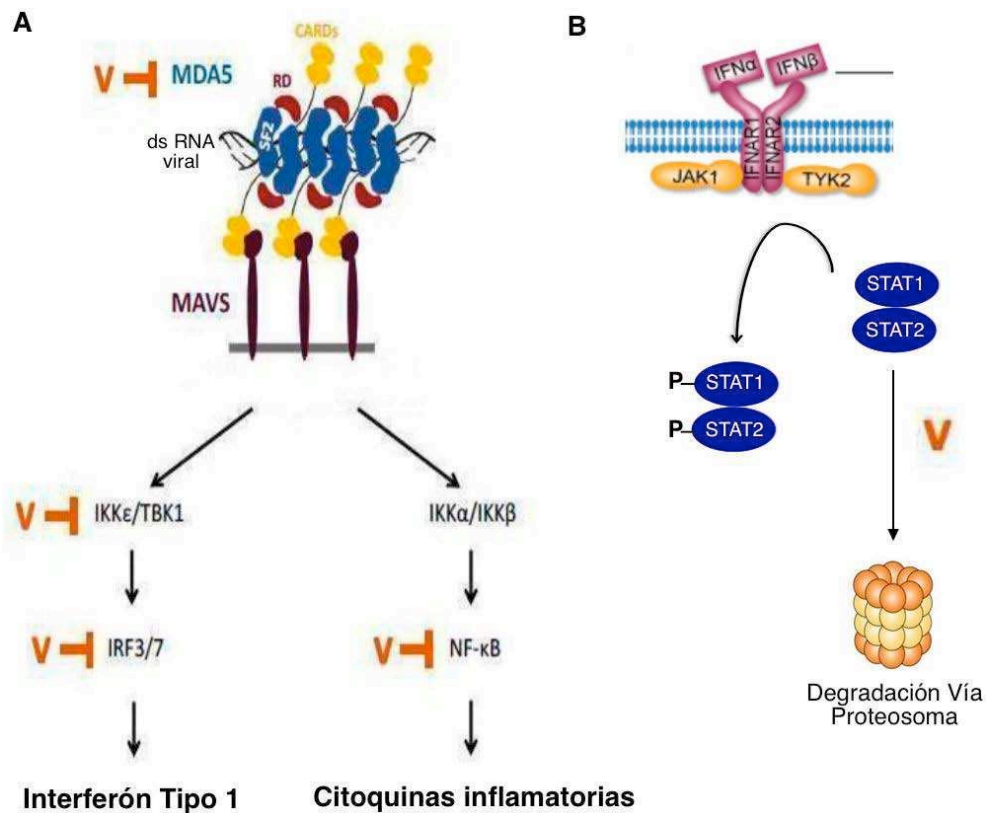


Figura 1.7 Ilustración simplificada del bloqueo de las vía de Interferón por la proteína V de PIV5. Las vías de inducción para la producción de interferón (A) y de señalización inducida por interferón α y β pueden ser inhibidas por diferentes mecanismos como el bloqueo de la polimerización del receptor de reconocimiento de ARN MDA5 o inhibición de la activación de STAT1/2 (B) por mediar su degradación vía proteosoma.

El análisis de las estructuras cristalográficas de la proteína V de PIV5 completa unida a DDB1 y de su dominio C-terminal unida MDA5 revelan los siguientes aspectos principales: 1) V unida a DDB1 es una proteína globular con un alto contenido de estructuras beta y regiones flexibles; 2) la interacción de V con DDB1 se produce a través de su dominio N-terminal [58]; 3) la interacción de V con MDA5 es diferente y se produce a través de su dominio C-terminal (Figura 1.8, a la izquierda); 4) la interacción del CTD de V con MDA5 implicaría un cambio conformacional de la estructura de V-DDB1, donde la horquilla beta debe ser expuesta [66] (en la estructura de V-DDB1, el CTD se encuentra protegido por el dominio N-terminal, Figura 1.8, a la derecha). Todo esto habla de la flexibilidad y plasticidad estructural de estas proteínas, lo que les permite adaptarse para la interacción con diferentes blancos en relación a su función como antagonistas del sistema de inmunidad innata.

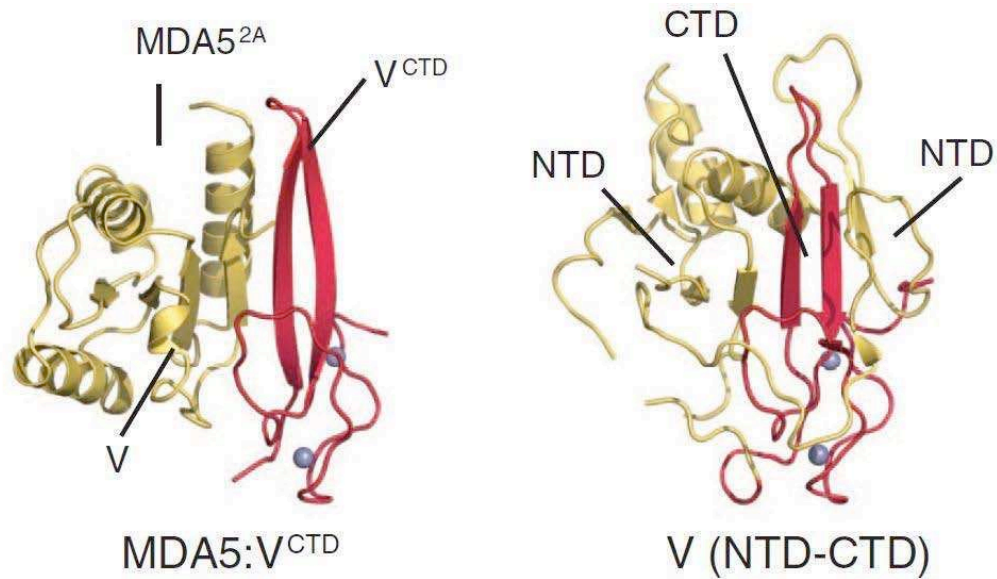


Figura 1.8 Estructuras cristalográficas para la proteína V de PIV5 en diferentes complejos. A derecha se muestra la estructura completa de V obtenida del complejo DDB1-V (código PDB: 2HYE, DDB1 no se muestra). A la izquierda se muestra el dominio C-terminal de V en complejo con la proteína MDA5 (código PDB: 4I1S, sólo se muestra el dominio de interacción 2A). NTD: dominio N-terminal; CTD: dominio C-terminal. Figura tomada de referencia: [66].

I.5 VACUNAS CONTRA HRSV Y LAS PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES

Hasta el momento no existe una vacuna disponible en el mercado contra HRSV. En la década de 1960 se realizaron pruebas clínicas con una vacuna contra HRSV realizada con virus inactivados por formalina [67]. Sin embargo, alrededor del 80% de los vacunados tuvieron que ser hospitalizados y algunos niños experimentaron enfermedad pulmonar severa luego de ser infectados por el virus, en contraposición con niños no vacunados que presentaron síntomas moderados [67]. En ese momento se propuso, que la causa de la falla en el desarrollo de una respuesta inmune adecuada fue que esta vacuna indujo una respuesta alérgica contra el virus, promoviendo una respuesta inflamatoria exacerbada en contactos posteriores [68]. Luego, se determinó que esta vacuna falló por su reducida capacidad para favorecer la maduración de la afinidad de los anticuerpos inducidos por la vacunación, dada su baja estimulación de receptores tipo Toll [69]. Estos anticuerpos eran deficientes para neutralizar al virus, pero al unirse a sus antígenos se formaban complejos antígeno-anticuerpo que activaban las vías de complemento, favoreciendo su depósito y por lo tanto contribuyendo a empeorar la enfermedad.

Una estrategia empleada actualmente para el desarrollo de vacunas es a partir de virus atenuados. Vacunas a virus atenuados no producen enfermedad exacerbada luego de vacunación o de una infección natural. Otra estrategia para el desarrollo de vacunas es utilizar virus

recombinantes producidos a partir de sistemas de genética reversa. Este método confiere la posibilidad de crear diferentes clones con mutaciones específicas y/o eliminar ciertos genes. Muchos de estos virus recombinantes fueron probados en ensayos clínicos [70]. Sin embargo, hasta el momento, con ninguna de estas técnicas se obtuvo una vacuna lo suficientemente atenuada e inmunológicamente adecuada.

Se observó en modelos animales utilizando virus recombinantes con los genes de NS1 y NS2 eliminados, que los mismos inducen inmunidad protectora frente a HRSV silvestre [39]. Ensayos clínicos realizados con vacunas a virus recombinante en ausencia del gen de NS2 (como rRA2cp Δ NS2 y rA2cp248/404 Δ NS2) resultaron sobre-atenuados en adultos, pero insuficientemente atenuados en niños, lo que desaconsejó su uso [71]. Estudios realizados con virus recombinante carentes del gen de que codifica para NS1, mostraron que podría ser un buen candidato ya que es suficientemente atenuado e inmunogénico *in-vivo* [39]. Sin embargo, el hecho de que replique poco *in-vivo* podría significar un problema a la hora de producción del virus a escala.

I.6 OBJETIVOS DE LA TESIS

OBJETIVO GENERAL

NS1 es una proteína multifuncional, para la cual se disponen de muy pocos datos en relación a sus propiedades en solución y no hay una estructura disponible. Dado que se han identificado numerosos blancos de interacción para esta proteína, nos propusimos determinar cuáles son las características de NS1 que le permitan realizar esta amplia gama de interacciones. Comprender la relación entre estructura-función es fundamental para entender el modo de acción de este importante antagonista de interferón.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

OBJETIVO 1: Clonado, expresión recombinante y purificación de la proteína NS1 de RSV.

Hasta el momento no existen métodos publicados que indiquen un alto rendimiento de NS1. Nos propusimos desarrollar un método que nos permita obtener cantidades significativas de proteína purificada para realizar los experimentos planeados.

OBJETIVO 2: Estudio de las propiedades conformacionales de NS1 en solución.

Nos propusimos estudiar las propiedades conformacionales de NS1 en solución, haciendo uso de métodos bioquímicos y biofísicos. A su vez, se plantea como objetivo estudiar los equilibrios conformacionales en NS1.

OBJETIVO 3: Estudio del mecanismo de plegado de NS1

Utilizando diferentes técnicas espectroscópicas, nos propusimos analizar el plegado de NS1 tanto al equilibrio como su mecanismo de formación. Estos estudios nos permitirán determinar como NS1 adquiere su estructura nativa e inferir aspectos importantes en relación a éste estado.

OBJETIVO 4: Estudio de la conformación, estabilidad y del mecanismo de ensamblado de oligómeros de NS1 obtenidos en el capítulo I.

CAPÍTULO II

CLONADO, EXPRESIÓN RECOMBINANTE Y PURIFICACIÓN DE NS1 hRSV

Para el estudio de aspectos relacionados a estructura y función de una proteína, a través de ensayos biofísicos y bioquímicos es necesario disponer de la mayor cantidad de proteína posible (en el orden de los miligramos). En relación a NS1, al momento de inicio de este trabajo de tesis existía un solo antecedente disponible en la literatura donde se muestra su expresión y purificación, utilizando un sistema de expresión que genera una proteína de fusión entre Ubiquitina y NS1 [15]. Mediante este sistema se obtuvieron cantidades que resultarían insuficientes para este trabajo, con un rendimiento final de la purificación de ~ 1 mg por litro de cultivo. Dado el bajo rendimiento de este sistema y al no existir otros métodos publicados, fueron planteados los siguientes objetivos:

OBJETIVO 1: Clonado, expresión y purificación recombinante de la proteína NS1 de RSV.

- Como primer objetivo nos propusimos realizar el clonado del gen de NS1 en diferentes sistemas de expresión. El diseño de diferentes estrategias utilizando distintos vectores de expresión, permite explorar un amplio rango de condiciones para lograr niveles de expresión óptimos.
- Como segundo objetivo para este capítulo, nos propusimos desarrollar un protocolo de purificación a escala preparativa que nos permita obtener cantidades suficientes para los experimentos propuestos.
- Como último objetivo de esta sección, nos propusimos desarrollar un protocolo de expresión en medio mínimo, que nos permita marcar a NS1 con los heteronúcleos ^{15}N y ^{13}C , para realizar estudios de resonancia magnética nuclear.

II.1. CLONADO Y SISTEMAS DE EXPRESIÓN UTILIZADOS

Como punto de partida de este trabajo, se realizó un clonado del gen que codifica para la proteína NS1 correspondiente al subtipo viral A₂ del Virus Respiratorio Sincicial Humano (HRSV) a partir de un gen sintético (GenScript Corp), con codones optimizados para su expresión en células de *E. coli*. Se utilizaron los vectores pTZ18U, pET-15b y pMAL-c, los cuales implican diferentes estrategias para la expresión recombinante de la proteína NS1 y su posterior purificación (Figura 2.1). El plásmido pTZ18U expresa a la proteína sin fusión a péptidos u otra proteína, siendo que los plásmidos pET-15b y pMAL-c expresan a NS1 unida a una secuencia de poli-histidinas (6xHis) o fusionada a la proteína de unión a maltosa (MBP, de sus siglas en inglés), respectivamente, en ambos casos separados por un sitio de corte para la proteasa trombina (secuencia LVPRGS). Los tres plásmidos confieren resistencia al antibiótico ampicilina, lo cual es útil para su selección.

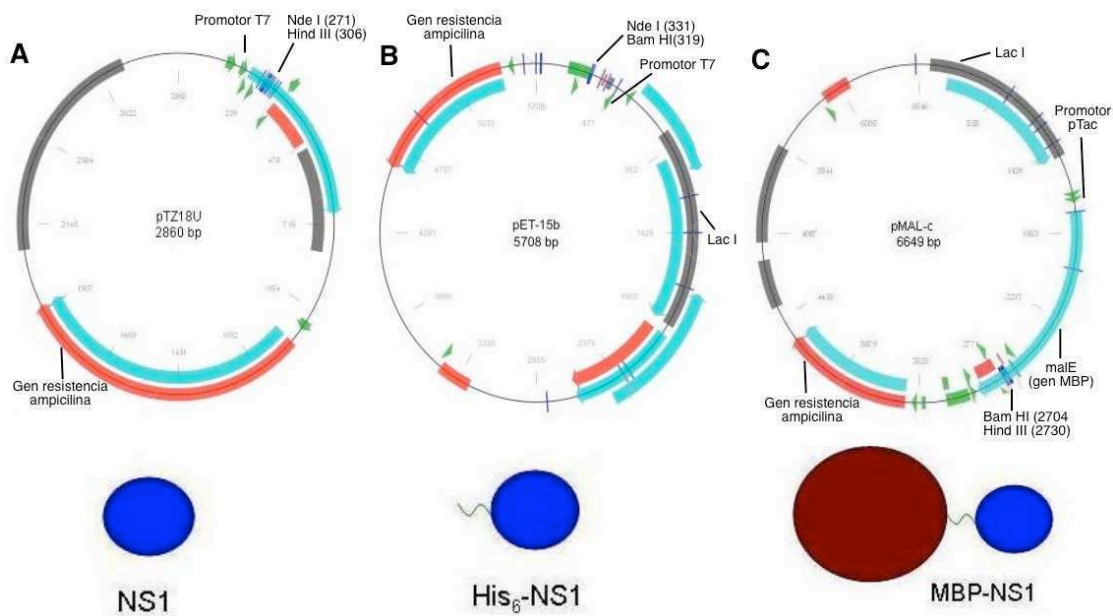


Figura 2.1. Esquema de vectores utilizados para el clonado de NS1. En cada vector se muestran sus principales elementos que lo componen y los sitios de corte utilizados. A) pTZ18U. B) pET-15b. C) pMAL-c. Este vector codificaba originalmente un sitio de corte para Enteroquinasa, el cual fue reemplazado por un sitio de corte para Trombina. Debajo de cada plásmido se representa un esquema del producto de la expresión del gen de NS1 según cada estrategia (mapa de vectores tomado y modificado de Addgene.org).

Los plásmidos pTZ18U y pET-15b se utilizaron en las cepas de expresión BL21(DE3) pLysS, JM109(DE3) pLysS y C41(DE3) dado que son capaces de expresar genes regulados por el promotor T7. Todas estas cepas contienen el lisógeno de bacteriófago lambda DE3 el cual

codifica para la T7 ARN polimerasa bajo el control del promotor *lacUV5*. BL21(DE3) pLysS y JM109(DE3) pLysS contienen el plásmido pLysS el cual codifica para la proteína Lisozima del fago T7. La Lisozima disminuye los niveles de expresión basal de genes regulados por el promotor T7, inhibiendo la actividad de la T7 ARN polimerasa. Esto es particularmente útil para el caso de expresión recombinante de proteínas que puedan resultar tóxicas para las bacterias, inhibiendo la expresión hasta que se desee su inducción, mediante el agregado de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) al cultivo. A su vez el plásmido pLysS confiere resistencia al antibiótico cloranfenicol (Cam^R), añadiendo un elemento más para su selección en cultivo.

La expresión de proteínas tóxicas frecuentemente causa la pérdida del plásmido. Por lo que las bacterias que ha perdido el vector de expresión, crecen más rápido que aquellas que aun lo retienen, lo cual tiene un efecto negativo sobre los niveles de expresión finales. C41 (DE3) es una cepa derivada de BL21 (DE3), en la cual se observó una mayor estabilidad plasmídica en comparación con BL21 (DE3). C41(DE3) contiene mutaciones no caracterizadas, que han sido seleccionadas fenotípicamente [72], resultando más resistentes a la expresión de proteínas recombinantes tóxicas.

El vector de expresión pMAL-c contiene al promotor pTac el cual también es inducible por IPTG. Todos estos vectores contienen al gen lacI^q el cual codifica para el represor Lac, disminuyendo los niveles de expresión basal. El vector pMal fue utilizado en las cepas TB1, JM109(DE3)pLysS y C41(DE3).

II.2. PRUEBAS REALIZADAS PARA LA EXPRESIÓN DE NS1

Se ensayó la expresión de NS1 en los vectores pTZ18U, pET-15b y pMAL-c utilizando las cepas bacterianas BL21(DE3) pLysS, JM109(DE3) pLysS, TB1 y C41(DE3), incubando a diferentes temperaturas y medios de cultivo para determinar las condiciones de óptima expresión.

Para llevar a cabo estas pruebas iniciales de expresión, células de cada cepa fueron transformadas con los diferentes vectores de expresión y fueron incubadas a 37 °C en cultivos de 2 ml a una agitación de 200 rpm. Al alcanzar la fase de crecimiento exponencial, aproximadamente a una densidad óptica (DO) a 600 nm \sim 0.6, la expresión fue inducida mediante el agregado de 0.3 mM IPTG, prolongando su incubación por 16 horas luego de la inducción a una temperatura de 37 °C. Al analizar la expresión de NS1 en geles de

poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) se observaron buenos niveles de expresión para las tres estrategias diseñadas: NS1 sin fusión, NS1 fusionada a un tag de histidinas y NS1 fusionada a la proteína MBP (Figura 2.2).

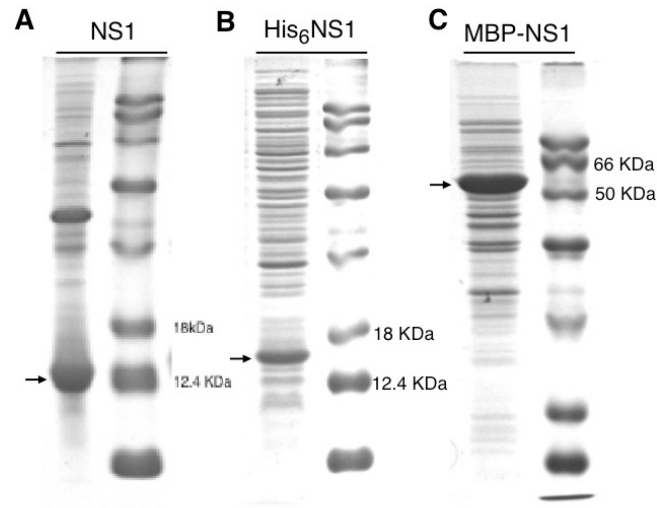


Figura 2.2. Expresión de NS1 en C41(DE3) a 37 °C en fracciones totales de cultivo, analizada en geles SDS-PAGE. A) Expresión de C41(DE3) transformada con el vector pTZ18U. B) Expresión de C41 transformada con el vector pET-15b. C) Expresión de C41(DE3) transformada con el plásmido pMAL-c.

En la figura 2.2 se muestran los niveles de sobre-expresión obtenidos incubando la cepa C41(DE3) a 37 °C, la cual fué transformada con 3 vectores de expresión. Al realizar una prueba de expresión no sólo es deseable obtener los mayores niveles de proteína posibles, sino que a su vez es conveniente que la proteína sea soluble (especialmente si se desconoce la estructura de la proteína en estudio). Alícuotas de las pruebas de expresión a 37 °C recién descritas fueron sometidas a ruptura mecánica por sonicación y separadas las fracciones solubles e insolubles (Figura 2.3). Sólo se observó proteína en la fracción soluble para MBP-NS1, encontrándose NS1 sin fusión y 6xHis-NS1 por completo en el insoluble (cuerpos de inclusión).

Al tomar la decisión de elegir uno u otro sistema de expresión en general es preferible utilizar estrategias que produzcan proteína sin fusión a péptidos u otra proteína, por lo que se evaluaron condiciones que favorezcan la expresión de NS1 soluble. Una variable que frecuentemente es utilizada para promover la expresión soluble de proteínas recombinantes es la incubación post-inducción a temperaturas inferiores a 37 °C. El uso de temperaturas inferiores a la de crecimiento óptimo para *E. coli*, en algunos casos puede reducir respuestas metabólicas indeseables para la síntesis de proteínas recombinantes, mejorando su rendimiento y/o solubilidad. A su vez, permite disminuir la sobreproducción de estas proteínas y así disminuir la

sobrecarga en la maquinaria transcripcional, lo que para algunas proteínas se traduce en la formación de cuerpos de inclusión.

Para probar si la disminución de la temperatura favorece la expresión soluble de NS1, se realizaron nuevas pruebas de expresión en donde las diferentes cepas fueron transformadas con los plásmidos pTZ18U, pET-15b y pMAL-c. Se crecieron cultivos de 2ml a 37 °C y a una DO 600 nm de 0.6 se realizó la inducción con 0.3 mM IPTG. Luego de la inducción, los cultivos fueron transferidos a temperaturas entre 25 y 20 °C, analizando la expresión en la fracción soluble a las 16 h post-inducción (Figura 2.3).

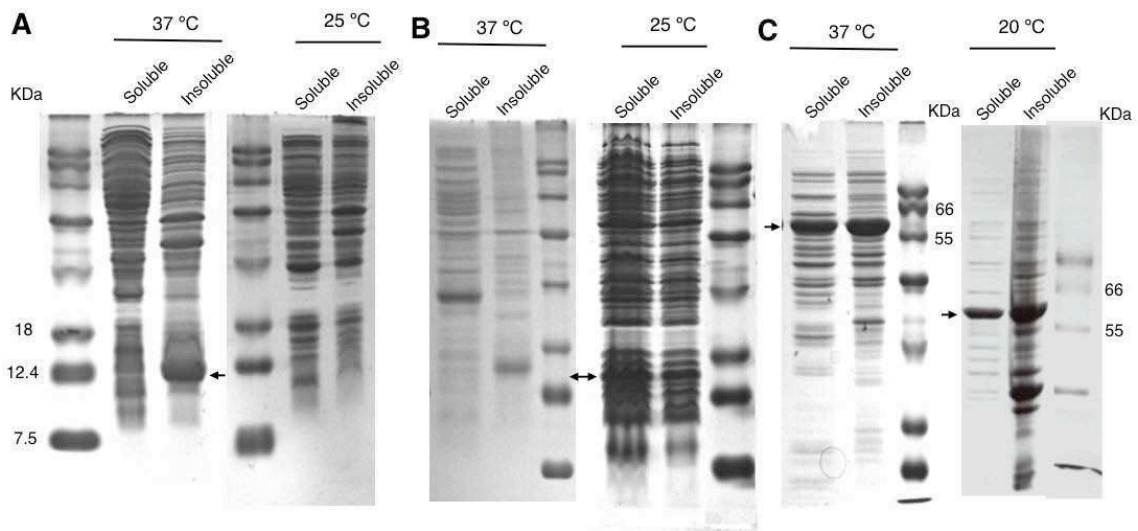


Figura 2.3. Análisis comparativo de expresión soluble de NS1 incubando a diferentes temperaturas. A) Bacterias C41 transformadas con el plásmido pTZ18U, incubadas a 37 ó 25 °C por 16 h post-inducción. Se observa la fracción soluble e insoluble. B) Fracciones soluble e insoluble de bacterias C41 transformadas con el plásmido pET-15b, incubadas a 37 ó 25 °C por 16 h post-inducción. C) Fracciones soluble e insoluble de bacterias C41 transformadas con el plásmido pMAL-c incubadas a 37 ó 20 °C por 16 h post-inducción. La flecha indica la expresión de NS1 según cada construcción (NS1 sin fusión en A, 6xHis-NS1 en B y MBP-NS1 en C).

Al comparar la DO a 600 nm final alcanzada por los cultivos de las distintas cepas se observó lo siguiente: los cultivos de bacterias JM109(DE3)pLysS transformadas con el plásmido pET-15b alcanzaron una DO de 2.6 a las 16 h post-inducción a 37 °C, mientras que su control sin inducción de expresión con IPTG alcanzó una DO 600 nm de 4.1. Esto indicó que la expresión de 6xHis-NS1 resultó tóxica para estas bacterias, disminuyendo su tasa de crecimiento. Por otro lado, el descenso de la temperatura post-inducción a 25 °C favoreció la expresión soluble de 6xHis-NS1 en JM109(DE3)pLysS pero con una expresión máxima a las 4 h luego del agregado de IPTG, siendo que cuando fue incubada por 16 hs no se observó banda de sobre-expresión (no se muestra). Esta es otra evidencia de la toxicidad de NS1 para esta cepa. Estas pruebas se realizaron en medio rico LB, pruebas en otros medios, como 2TY o TB

resultaron poco reproducibles. Por otro lado, la utilización de la cepa C41 utilizando el medio rico LB, permitió alcanzar niveles de DO a 600 nm similares a los controles sin inducción, con un valor de 4.0 para C41 transformada con pET-15b e incubada por 16 h post-inducción, indicando mayor resistencia al efecto tóxico de la sobre-expresión NS1, sin que se pierda esta expresión en incubaciones mas largas. De modo similar, se observó que las bacterias C41 transformadas con el vector pMAL-c, alcanzaron valores de DO a 600nm mayores que JM109(DE3) pLysS y TB1 cuando fueron incubadas por 16 h post-inducción a 37 °C, con valores de 4.9, 3.2 y 3.8, respectivamente. Por todo esto, se decidió utilizar la cepa C41 para la expresión de NS1.

En la figura 2.3 se muestra en forma comparativa el efecto de la temperatura sobre la expresión soluble de NS1 utilizando la cepa C41. En el caso de la expresión de NS1 sin fusión, se observó que la disminución de la temperatura no sólo no favoreció la expresión soluble, sino que tampoco se observa banda de sobre-expresión. Esto sí ocurrió al analizar la expresión de 6xHis-NS1 en donde la incubación a baja temperatura favoreció la expresión de proteína soluble observando niveles de proteína similares tanto en la fracción soluble como en la insoluble. MBP-NS1 expresa tanto en forma soluble e insoluble a 37 °C. Su expresión soluble se vio incrementada al disminuir la temperatura a 20 °C.

II.3.1 DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN PARA 6xHis-NS1

II.3.2 Expresión soluble de 6xHis-NS1

Dado que no se pudo obtener expresión soluble para NS1 sin fusión, y a pesar que se realizaron diferentes pruebas de replegado a partir de cuerpos de inclusión, y estas resultaron negativas (no se muestra) se optimizó la expresión de 6xHis-NS1 en cultivos de un litro. Para esto y a partir de los resultados en escala pequeña se desarrolló la expresión a escala utilizando la cepa C41(DE3) incubando a baja temperatura (Figura 2.4).

Se partió de transformaciones frescas utilizando el vector pET-15b, a partir de las cuales se crecieron dos pre-cultivos de 5 ml de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) a 37 °C por 16 h, con una agitación de 200 rpm. Al día siguiente los 5 ml de cada precultivo fueron transferidos a dos erlenmeyer de 500 ml de LB suplementado con ampicilina (para mantener una relación 1/100). Se incubaron los cultivos de 500 ml a 37°C hasta alcanzar una DO 600 nm de 0.6, luego de lo cual fueron transferidos a 20 °C e inducidos con IPTG 0.3 mM. Luego de 16 h de incubación a 20 °C el cultivo alcanzó un DO 600 nm de 3.8 (Figura 2.4, A),

luego de lo cual se realizó la cosecha. La pasta de bacterias fue resuspendida en tampón conteniendo 20 mM Tris-HCl pH 8, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA y 2 mM β -mercaptoetanol (2BME). Luego se realizó la ruptura de las bacterias por sonicación en dos rondas, centrifugando y recuperando la fracción soluble. Se tomaron alícuotas a las 3 y 16 h, para ser analizadas por gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE, Figura 2.4, B).

II.3.3 Precipitación fraccionada con Sulfato de Amonio

El primer paso de purificación consistió en la precipitación fraccionada de NS1 con sulfato de amonio. Se determinó la concentración mínima en que precipite la mayor cantidad de NS1 cuando es incubada con sulfato de amonio. Para esto se tomaron alícuotas de la fracción soluble del lisado de bacterias, que fueron incubadas a 4 °C con concentraciones crecientes de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por 4 h, las cuales luego fueron centrifugadas recuperando el “pellet”. El resultado se evaluó en un gel SDS-PAGE (Figura 2.4, C). Se determinó que la condición mas adecuada para precipitar la mayor cantidad de proteína minimizando contaminantes fue al incubar con sulfato de amonio al 50% (p/v). Luego se repitió este experimento a escala obteniendo resultados similares.

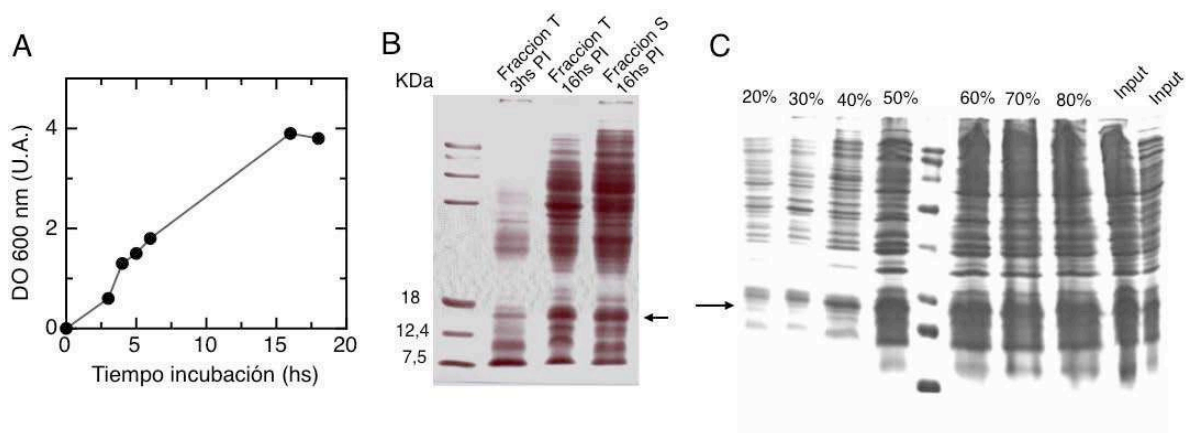


Figura 2.4. Expresión a escala de 6xHis-NS1. A) Curva de DO a 600 nm de cultivo 500 ml de C41(DE3) inducido a una DO ~ 0.6 y cosechado a las 16 h post-inducción. B) Gel SDS-PAGE 15 % de fracciones totales (T) y solubles (S) tomadas a las 3 y 16 h post-inducción. C) Prueba piloto de precipitación fraccionada con sulfato de amonio. Sobre cada calle se indica cada concentración en % (p/v) ensayada. Las calles de la derecha corresponden a muestra sin precipitar en dos diluciones al medio. Las flechas en B y C indican la banda de expresión de 6xHis-NS1.

II.3.4 Purificación por cromatografía de afinidad a metales divalentes (IMAC)

Luego de precipitar la proteína con sulfato de amonio, al pellet que resultó luego de centrifugar, se lo resuspendió en tampón Tris-HCl 10 mM pH 8, 0.2 M NaCl y 2BME 2 mM para luego dializarla contra el tampón de equilibrado de la columna IMAC, el cual contiene 10

mM Tris-HCl pH 8 y 0.2 M NaCl. La muestra fue inyectada en la columna a un flujo de 0.5 ml/min siendo previamente cargada con NiCl₂. Luego se realizó un lavado con 10% de solución de elución. La elución se realizó a través de un gradiente de 10 a 100 % de solución de elución (solución de equilibrado + 0.5 M Imidazol), a 1 ml/min en 40 min. En el perfil de elución se obtuvieron dos picos, siendo el segundo (55% del gradiente) correspondiente a 6xHis-NS1 (Figura 2.5).

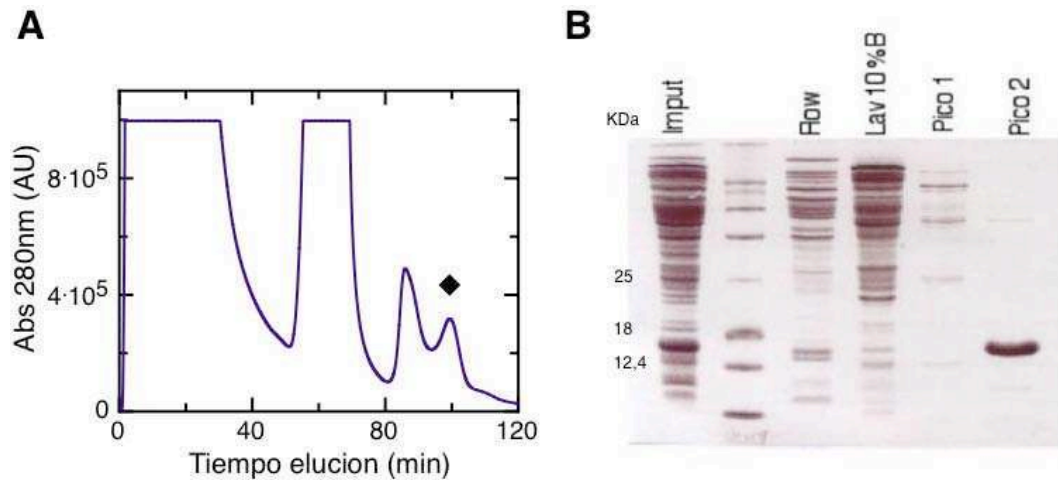


Figura 2.5. Cromatografía de afinidad a metales divalentes (IMAC). Cromatograma de la purificación: los primeros 40 minutos corresponden al *flow*; entre los minutos 50-80 corresponde al lavado con 10 % de buffer de elución y finalmente el gradiente de 10 a 100 % de buffer de elución, donde el pico correspondiente a 6His-NS1 se marcó con un asterisco. B) Gel SDS-PAGE 15 % donde se muestran las fracciones obtenidas.

II.3.5 Corte con Trombina y cromatografía de exclusión molecular

Luego de la IMAC la fracción correspondiente a NS1 fue concentrada y sujeta a corte del tag de histidinas con la proteasa trombina. Para esto, primero se optimizaron las condiciones de corte en cuanto a cantidad de enzima y temperatura de incubación. Se determinó que la mejor condición en donde se obtuvo corte completo fue utilizando 0.25 NIH U/2mg de proteína incubando a 4 °C por 16 h en tampón acuoso conteniendo 10 mM Tris-HCl, 0.2M NaCl, 2BME 2 mM suplementado con CaCl₂ 1 mM.

Como último paso de purificación, se realizó una filtración por tamiz molecular Superdex-75 equilibrada en tampón Tris-HCl 10 mM pH 8, 0.2 M NaCl y 1mM DTT (Figura 2.6). Además esta columna sirvió para evaluar el estado de oligomerización de NS1. NS1 eluye mayoritariamente como un monómero, encontrándose en homogeneidad en solución. El rendimiento de esta purificación fue de entre 1.5 y 2.0 mg/L de cultivo.

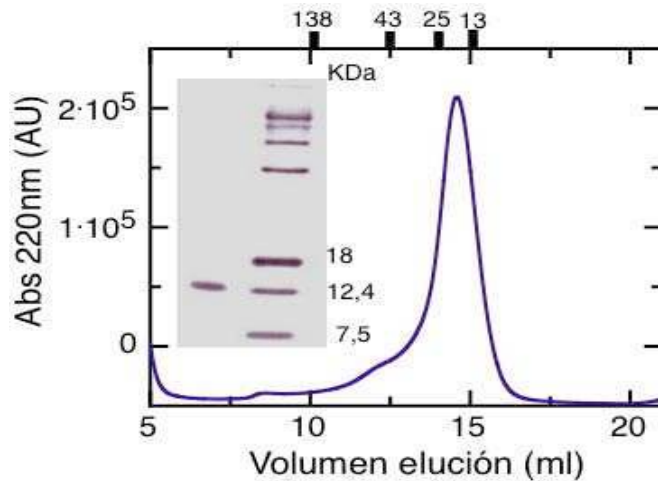


Figura 2.6. Cromatografía de exclusión molecular S-75 analítica. Se muestra el cromatograma de la muestra concentrada luego de ser tratada con la proteasa trombina. En el eje x superior se muestra el perfil de elución de diferentes proteínas globulares estándar. En el inserto, se muestra un gel SDS-PAGE 15% de NS1 purificada.

II.4.1 DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN PARA MBP-NS1

II.4.2 Expresión soluble de MBP-NS1

Un rendimiento de entre 1-2 mg/L puede resultar suficiente para realizar ensayos bioquímicos analíticos de una proteína, pero tiene la desventaja de requerir realizar nuevas preparaciones con períodos de tiempo relativamente cortos. Por lo que, con el fin de obtener un mayor rendimiento de NS1 purificada decidimos desarrollar un protocolo de expresión-purificación a escala utilizando el vector que expresa a NS1 fusionada a MBP.

Utilizamos transformaciones frescas del vector pMAL-c en la cepa C41(DE3), bacterias que fueron crecidas en dos pre-cultivos de 5 ml cada uno en medio LB con el agregado de ampicilina (100 µg/ml) a 37 °C por 16 h y con una agitación de 200 rpm (ver Materiales y Métodos). Luego, los pre-cultivos fueron transferidos cada uno a un erlenmeyer de 500 ml de medio LB con ampicilina. Los cultivos de 500 ml se dejaron crecer a 37 °C con una agitación de 200 rpm hasta lograr una DO 600 nm de 0.6, luego de lo cual se llevó la temperatura a 20 °C y se indujo la expresión con IPTG 0.3 mM. Se incubó por 16 h a 20 °C con una DO 600 nm final de ~ 4.6, luego de lo cual se realizó la cosecha del cultivo. De modo similar que en el protocolo anterior para 6xHis-NS1 se utilizó una solución del tampón químico Tris-HCl 20 mM pH 8, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA y 2 mM 2BME para resuspender la pasta de bacterias y realizar la ruptura celular por sonicación (Figura 2.7, A).

II.4.3 Precipitación fraccionada con Sulfato de Amonio

La purificación se inició con una precipitación fraccionada con sulfato de amonio, para lo cual primeramente se determinó la concentración mínima de sal requerida para precipitar la mayor cantidad de MBP-NS1 posible, con menor grado de impurezas. Para ello se utilizaron alícuotas de la fracción soluble obtenida en el paso anterior, a las que se les adicionó concentraciones crecientes de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Luego de una incubación de 4 horas a 4 °C, se centrifugó y corrió al precipitado en un gel SDS-PAGE 12.5 % (Figura 2.7, B). El resultado de este experimento, en línea con el protocolo anterior, indicó que con una concentración de sulfato de amonio entre 40-50 % (p/v) se precipitan cantidades significativas de MBP-NS1 logrando separar impurezas que se encuentran presentes a mayores concentraciones de sal.

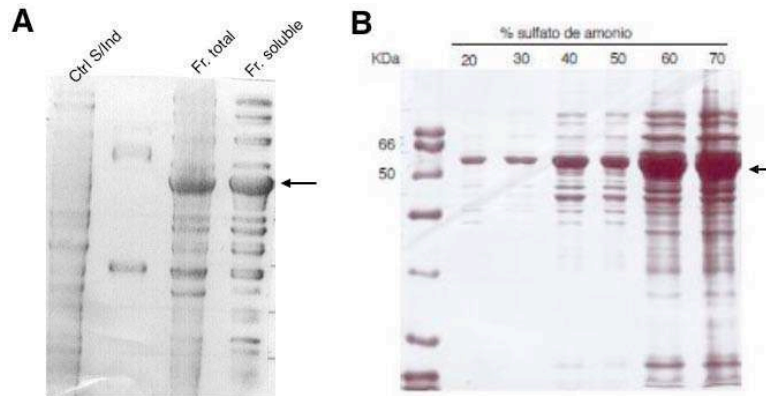


Figura 2.7 Expresión soluble de MBP-NS1 a escala. A) Se muestra un gel SDS-12.5 % correspondiente a fracciones totales de la cepa C41 sin inducir (calle 1, se suprimió la expresión basal con el agregado de glucosa 10 %) y con expresión de MBP-NS1 (calle 3). En la calle 4 se muestra la fracción soluble obtenida luego de la ruptura de bacterias. B) Precipitación fraccionada con sulfato de amonio. Por encima de cada calle se indica la concentración de sal ensayada. La flecha muestra la banda correspondiente a MBP-NS1.

II.4.4 Columna de afinidad por maltosa

Como segundo paso de purificación se ensayaron diferentes alternativas para separar a MPB-NS1 de proteínas bacterianas contaminantes. Estas pruebas incluyeron: pasos en columnas de intercambio aniónico, las cuales por el poco pegado de NS1 a la columna o baja separación no fueron incluidos en el protocolo de purificación, y pruebas de incubación de la fracción soluble a temperaturas entre 50 y 70 °C, las cuales se dejaron de lado al observar que la temperatura produce modificaciones conformacionales en NS1 (no se muestra, ver capítulo III y V). Entonces, se recurrió a una columna de afinidad por maltosa (Amilosa) que puede unir selectivamente a MBP-NS1, separándola de proteínas contaminantes, para luego ser eluída

mediante el agregado de maltosa que compite por los sitios de unión de MPB-NS1 a la resina, despegándola.

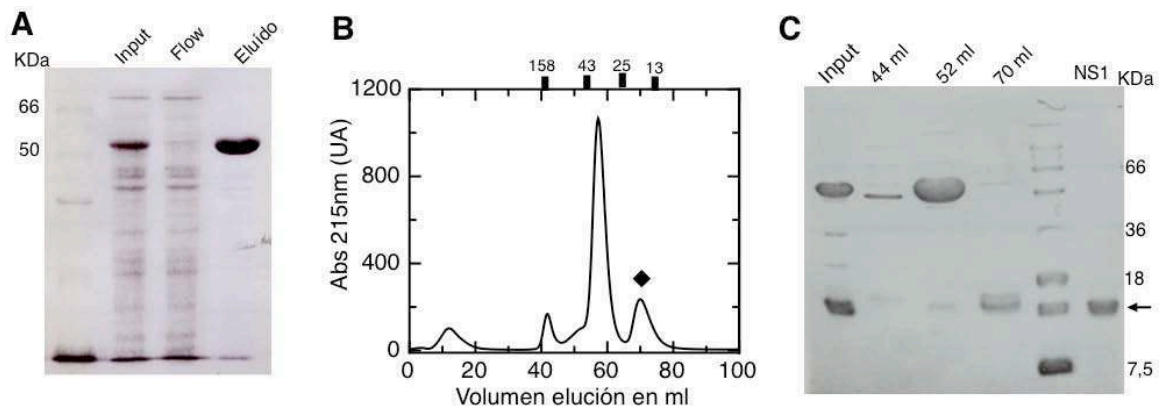


Figura 2.8 Purificación de NS1 a partir de su fusión con MBP. A) Gel SDS-PAGE 12.5 % purificación utilizando la resina Amilosa. Las calles muestran el *input* que se inyectó en la columna, el percolado y la proteína eluída. B) Cromatograma de purificación por filtración molecular S-75 preparativa de NS1 luego del tratamiento con Trombina. En el eje x superior se muestra el perfil de elución de diferentes proteínas globulares estándar. El asterisco indica el pico correspondiente a NS1 cortada de MBP. C) Gel SDS-PAGE 12.5 % donde se muestran las diferentes fracciones colectadas de la columna S-75. La flecha indica la banda correspondiente a NS1 separada de MBP.

La proteína precipitada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fue resuspendida en tampón Tris-HCl 10 mM pH 8.0, 0.2 M NaCl, 2 mM 2BME y luego dializada contra la misma solución para eliminar restos de sulfato de amonio (ver Materiales y Métodos). Posteriormente se inyectó la muestra en la columna, realizando luego extensivos lavados. La elución se realizó con la misma solución suplementada con 20 mM maltosa (Figura 2.8, A). Luego de repetir el procedimiento con el percolado por al menos 3 veces, se obtuvieron cantidades significativas de MBP-NS1 con alto grado de pureza.

II.4.5 Corte con Trombina y cromatografía de exclusión molecular

Al eluido obtenido por la columna de afinidad por maltosa se lo concentró e indujo el corte de MBP y NS1 con la proteasa trombina, habiendo previamente determinado una cantidad necesaria de enzima de 0.25 unidades por cada 3 mg de proteína de fusión cuando es incubada a 4 °C por 16 hrs. en *buffer* conteniendo 10 mM Tris-HCl pH 8, 0.2M NaCl, 2BME 2 mM suplementado con CaCl_2 1 mM. La muestra resultante del corte con trombina fue inyectada en una columna de filtración molecular en donde se obtuvieron 3 picos mayoritarios correspondientes a MPB-NS1 oligomérica a los 44 ml, MBP monomérica a los 52 ml y NS1 monomérica a los 70 ml (Figura 2.8, B y C). La pureza de la muestra obtenida fue > a 95 %,

calculado por SDS-PAGE mientras que la identidad de la proteína fue confirmada por espectrometría de masa MALDI-TOF (Figura 2.9). Como resultado final de este protocolo se obtuvo a NS1 sin MBP en alto grado de pureza logrando un rendimiento de ~ 10 mg/L cultivo.

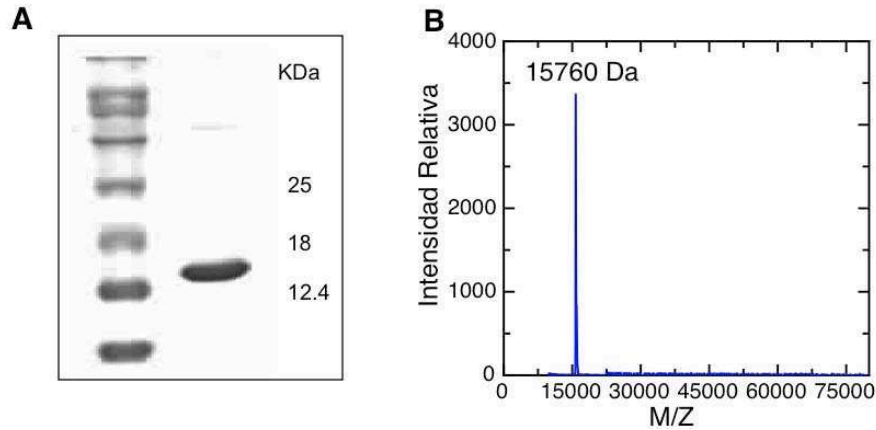


Figura 2.9 Identificación por espectrometría de masa MALDI-TOF. A) Se muestra un gel SDS-PAGE 15 % con NS1 purificada. B) El análisis por espectrometría MALDI-TOF muestra un pico del peso molecular esperado, acorde a la secuencia de aminoácidos.

II.5. EXPRESIÓN DE MBP-NS1 EN MEDIO MM SU PARA MARCACIÓN CON $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$

Con el fin realizar estudios por resonancia magnética nuclear (RMN) debemos marcar a NS1 con los isótopos no radiactivos ^{15}N y ^{13}C . Para ello es necesario expresar la proteína en un medio mínimo (MM) al cual se le adicione una fuente de carbono como glicerol o glucosa marcado con ^{13}C y una fuente de nitrógeno, como cloruro de amonio o sulfato de amonio marcado con ^{15}N .

Se utilizó el medio mínimo M9 siguiendo el protocolo de expresión desarrollado para MBP-NS1 con algunas modificaciones. Para determinar la mejor condición de expresión se debió ensayar primero el volumen de precultivo óptimo para lograr la mayor DO posible así como la cantidad de glucosa como fuente de carbono, necesaria para lograr una buena sobre-expresión (sobre todo en el caso de requerir glucosa marcada, dado el costo de la misma). Con ese objetivo se probaron diferentes condiciones de precultivo como ser: para mantener diferentes relaciones precultivo/cultivo o realizando el precultivo en medio mínimo o en medio rico. A su vez, se ensayaron distintas concentraciones de glucosa con el fin de evaluar su relación con el nivel de expresión (Figura 2.10). De esta forma se determinó que realizando un precultivo en MM M9 suplementado con ampicilina para una relación precultivo/cultivo final de 1/50 y utilizando 2 g/L de glucosa marcada con ^{13}C se obtienen los valores de mayor DO 600

nm (2.0) y con mayor nivel de expresión, en comparación a realizar un precultivo en medio mínimo o medio rico para una relación 1/25 donde se observó menor o escasa expresión. A su vez, manteniendo la relación medio mínimo/medio mínimo 1/50, utilizando 1.5 g/L de glucosa se observó buena expresión de MBP-NS1, con una DO 600 nm final de 1.4, siendo esta condición utilizada para las preparaciones de proteína doblemente marcada. El protocolo de expresión y purificación continuó con los mismos pasos mencionados en la sección de medio rico (Materiales y Métodos).

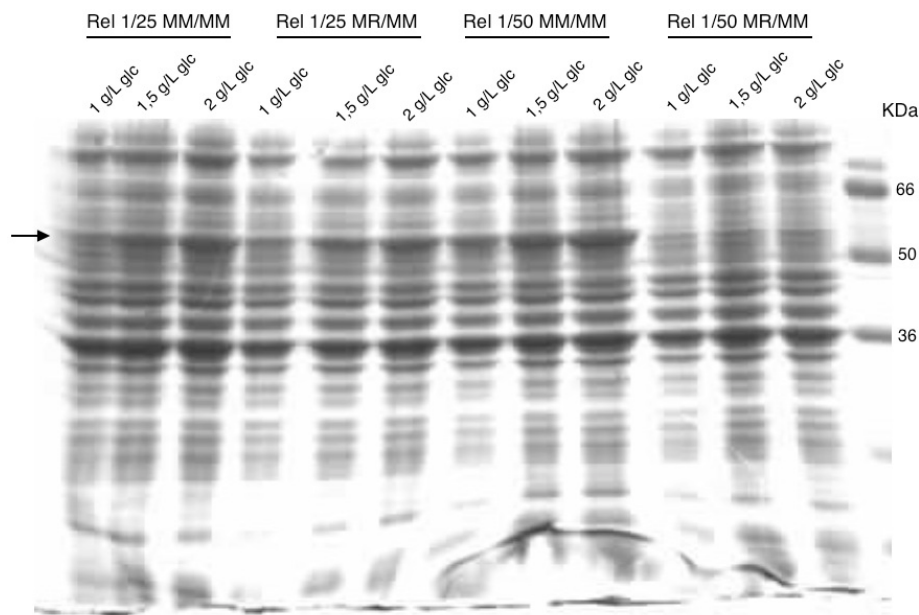


Figura 2.10 Expresión de MBP-NS1 en MM M9 en diferentes condiciones de precultivo y cantidad final de glucosa. Se realizaron pre-cultivos para mantener una relación 1/25 ó 1/50 con el cultivo final, partiendo de medio mínimo (MM) o medio rico (MR). Para cada una de estas condiciones se ensayaron cantidades de 1, 1.5 y 2 gramos por litro de glucosa en el cultivo final. La flecha indica la banda de expresión de MBP-NS1.

Se logró obtener cantidades significativas de NS1 separada de MBP y pura en solución. Con el desarrollo del protocolo descrito se logró un rendimiento de ~2 mg/L de NS1 marcada con ^{15}N y un rendimiento de ~1.5 mg/L de NS1 marcada con ^{15}N y ^{13}C .

II.6 Rendimiento de protocolos desarrollados para la expresión a escala de NS1

La tabla II.1 muestra el rendimiento obtenido para los diferentes protocolos de expresión y purificación de NS1 desarrollados, utilizando dos sistemas de expresión diferentes en medio rico o medio mínimo para marcación con Nitrógeno 15 ó Carbono 13. En forma comparativa se muestra la DO 600 nm final alcanzada y el grado de pureza parcial y final obtenidos.

Tabla II.1 Rendimiento de la purificación de NS1 obtenida diferentes protocolos a escala preparativa.

Protocolo utilizado (P/ 2 litros de cultivo)	DO 600nm Final	Rendimiento Parcial: columna de afinidad		Pureza Parcial (%)	Rendimiento Final: NS1		Pureza Final (%)
		mg	mg/L		mg	mg/L	
6xHis-NS1 en MR	3.8	6 (6xHis-NS1)	3 (6xHis-NS1)	> 80	4	2	> 95
MBP-NS1 en MR	4.6	80 (MBP-NS1)	40 (MBP-NS1)	> 85	20	10	> 95
MBP-NS1 en MM (s/ marca)	2.2 (2g glc/L)	s/d	s/d	> 85	4	2	> 95
MBP-NS1 en MM: ¹⁵ N	2.1 (2g glc/L)	s/d	s/d	> 85	4	2	> 95
MBP-NS1 en MM: ¹⁵ N y ¹³ C	1.4 (1.5g glc/L)	14	7	> 85	3	1.5	> 95

Estos resultados indicaron que en todos los casos, luego de realizar un paso de purificación utilizando una columna de afinidad, la pureza de la muestra obtenida fue superior al 80%. Además, mediante la expresión de MBP-NS1 se logró un rendimiento parcial de 40 mg por litro de cultivo de proteína de fusión y un rendimiento final de NS1 cortada de MBP de ~ 10 mg/L de cultivo, unas 10 veces el rendimiento del único antecedente publicado [15], y cinco veces mayor al rendimiento de la purificación de 6xHis-NS1. El rendimiento de la purificación de NS1 que fue expresada en MM M9 resultó ser altamente satisfactorio, siendo el rendimiento de NS1 marcada con Nitrógeno 15 similar a la prueba a escala sin marca (~ 2mg/L) y ligeramente superior al rendimiento de NS1 doblemente marcada.

II.7. CONCLUSIONES

Expresión recombinante en medio rico

- Se realizó el clonado del gen de NS1 de RSV correspondiente al subtipo viral A2. Se utilizó un gen sintético con codones optimizados para expresión en células procariotas, el cual fue introducido en 3 sistemas de expresión: uno de no fusión, otro que expresa a NS1 con un tag de histidina y por último otro sistema que expresa a NS1 fusionada a la proteína MBP.
- Se logró sobre-expresión para los 3 sistemas propuestos. La disminución de la temperatura, previo a la inducción con IPTG resultó clave para obtener niveles altos de expresión soluble. La excepción a esto lo constituye la expresión de NS1 sin fusión donde no se pudo obtener proteína soluble y la solubilización de los cuerpos de inclusión y replegado resultó negativa.
- Se desarrollaron dos protocolos de expresión a escala y purificación de NS1. El rendimiento del proceso de purificación, a partir de la expresión de NS1 fusionada a la proteína MBP fue de ~ 10 mg por litro de cultivo, un valor muy superior al único antecedente disponible en la literatura. La proteína se obtuvo en homogeneidad y con un alto grado de pureza.

Expresión recombinante en medio mínimo

- Se logró buena expresión en medio mínimo utilizando la cepa C41 y al vector que expresa la fusión MBP-NS1. Al protocolo general establecido para medio rico se debió ajustar condiciones como volumen y tipo de precultivo y cantidad final de glucosa en el cultivo para obtener los mayores niveles de expresión.
- A partir de este protocolo se pudieron obtener cantidades significativas de proteína purificada simplemente marcada con ^{15}N y doblemente marcada con ^{15}N y ^{13}C para ser utilizada en estudios de caracterización estructural por RMN.

CAPÍTULO III

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES CONFORMACIONALES DE NS1 EN SOLUCIÓN

Como se menciona en la introducción, NS1 es una proteína para la cual se han reportado múltiples blancos celulares y que tiene un rol clave en el mecanismo de inmuno evasión de RSV en la infección temprana. Es una proteína pequeña de 15.6 KDa, con un alto grado de conservación en su secuencia aminoacídica entre las diferentes variantes humanas. Se ha descrito un 87 % de identidad de secuencia entre proteínas del subtipo A con las del subtipo B. Sin embargo, no se ha encontrado homología de secuencia de aminoácidos en NS1 con ninguna otra proteína.

OBJETIVO 2: Estudio de las propiedades conformacionales de NS1 en solución.

Para llevar a cabo este objetivo nos propusimos hacer uso de diferentes técnicas biofísicas y bioquímicas que nos permitan caracterizar a NS1 recombinante en solución y cual es su dinámica conformacional en relación a diferentes condiciones de su entorno. Los objetivos específicos de este capítulo fueron:

- Caracterizar la conformación nativa de NS1 en solución en cuanto a estructura secundaria, terciaria y cuaternaria.
- Evaluar su estabilidad frente a diferentes condiciones de pH y temperatura.
- Evaluar el efecto de estabilizadores de estructura secundaria como el Trifluoroetanol y otros solventes orgánicos.
- Determinar el estado de oxidación de sus 4 cisteínas.
- Analizar la presencia de dominios estructurales por proteólisis limitada.
- Realizar estudios preliminares de resonancia magnética nuclear (RMN).

III.1 CARACTERIZACIÓN DE NS1 Y SU CONFORMACIÓN EN SOLUCIÓN

En una primera instancia, nos propusimos caracterizar a través de diferentes técnicas espectroscópicas a la proteína NS1 obtenida por expresión recombinante. Estas técnicas permitieron el análisis de la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de NS1. El estudio del contenido de estructura secundaria de una proteína puede realizarse a través de la técnica de dicroísmo circular, la cual se basa en la absorción diferencial de luz circularmente polarizada por parte de los enlaces peptídicos en el UV lejano (190-260 nm) [73]. El cromóforo más significativo en el UV lejano es el enlace peptídico (tipo amida) siendo que su absorptividad

molar depende de los diferentes elementos de estructura secundaria que componen la proteína (α -hélice, lámina β , etc). Para el estudio de la estructura terciaria de NS1 utilizamos a su único triptófano como sonda fluorescente intrínseca. Los triptófanos son aminoácidos hidrofóbicos que habitualmente se ubican en zonas protegidas del solvente acuoso, donde encontramos una baja constante dieléctrica. El espectro de emisión de fluorescencia del anillo indol del triptófano depende de la polaridad del entorno en el que se encuentran con un máximo de emisión a los 350 nm cuando se encuentra en un entorno polar y a los 310 nm cuando se encuentra en un entorno apolar [74].

El análisis del espectro de dicroísmo circular en el UV lejano para NS1 revela un mínimo a 210 nm con un máximo a 195 nm, lo cual no constituye un espectro característico de un tipo de estructura secundaria particular sino que corresponde al aporte conjunto de elementos de estructura secundaria tipo α -hélices y láminas β , en forma similar a como fue previamente publicado [15]. En cuanto a su estructura terciaria, NS1 presenta su único triptófano (W90) en un entorno hidrofóbico, oculto al solvente, mostrando un espectro de fluorescencia del mismo con un máximo de emisión a los 326 nm (Figura 3.1).

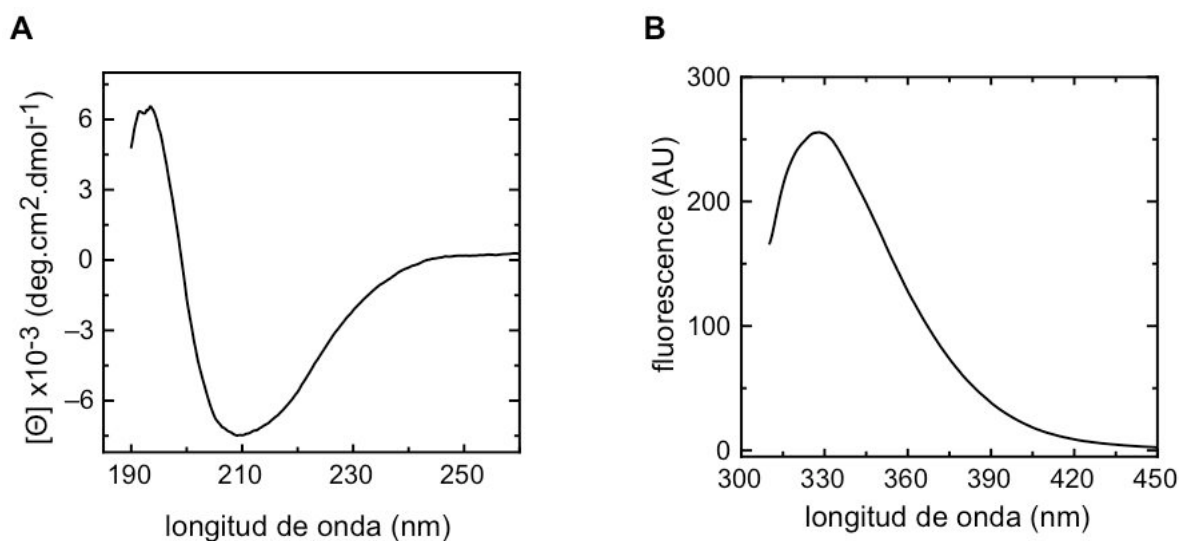


Figura 3.1 Espectro de Dicroísmo circular y Fluorescencia de NS1. (A) Espectro de CD en el UV lejano. (B) Espectro de fluorescencia del triptófano. Concentración de proteína: 10 μM en tampón químico Tris-HCl 10 mM pH 8.0, 0.2 M NaCl con 1 mM DTT.

Con el objeto de analizar el estado de oligomerización de NS1 y su grado de dispersión en solución se utilizó la técnica de dispersión de luz láser dinámica (DLS). Esta técnica permite conocer la distribución del radio hidrodinámico de Stokes (R_s) de las partículas presentes en una solución y sólo en el caso de partículas globulares permite determinar su peso molecular (Gast,

2005). Una muestra de NS1, a una concentración de 30 μM mostró la presencia de una población mayoritaria de partículas monodispersa en solución, presentando la especie mayoritaria un diámetro hidrodinámico de 4.1 ± 1.4 nm (Figura 3.2, A). Para completar este análisis, se recurrió a la técnica de dispersión de luz láser estática (SLS) acoplada a una columna de filtración molecular. Esta técnica permite aislar poblaciones de especies en solución y determinar a partir de sus propiedades de dispersión su peso molecular (Gast, 2005). El análisis de NS1 por SLS reveló un único pico de índice de refracción homogéneo correspondiente a una especie de peso molecular de 17.4 ± 1.6 KDa (Figura 3.2, B).

Los resultados obtenidos por estas dos técnicas indican que NS1 se encuentra en forma homogénea, con una conformación monomérica y globular en solución, de acuerdo al peso molecular esperado del análisis de la secuencia de aminoácidos (15.6 KDa).

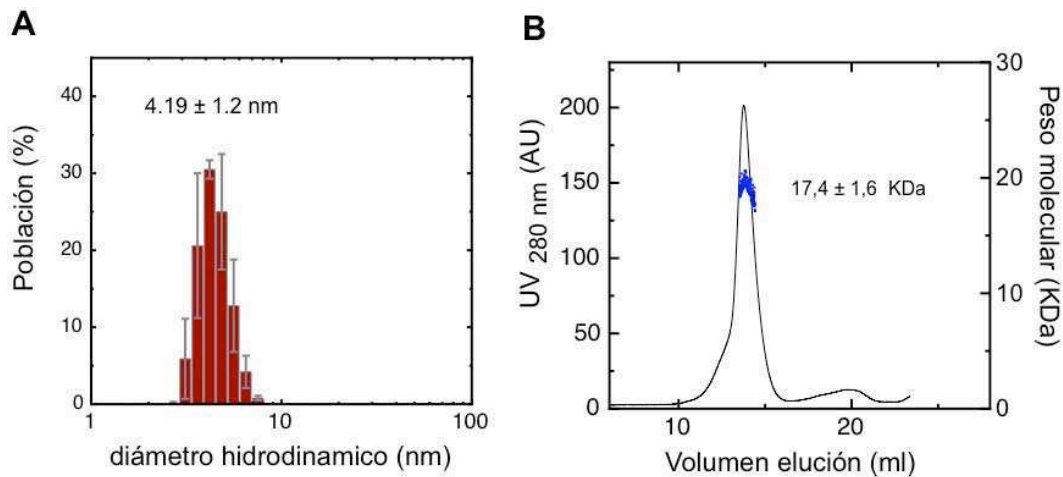


Figura 3.2. Estado de oligomerización de NS1. (A) Distribución del tamaño de partículas en solución por DLS de una muestra 30 μM de concentración. (B) Peso molecular, calculado por dispersión de luz estática. La línea continua representa el perfil de elución de la columna de filtración molecular, medido por absorbancia a 280 nm. El peso molecular calculado se obtuvo como un promedio de la señal del índice de refracción (puntos azules).

III.2 EFECTO DEL pH SOBRE LA ESTRUCTURA Y CONFORMACIÓN DE NS1

En el espacio intracelular el pH es regulado por distintos sistemas *buffer*. Sin embargo este no es uniforme en las diferentes localizaciones subcelulares siendo muy diferente el pH del citoplasma, con un valor de 7.4 ± 0.3 , al de las diferentes organelas. Es así, que en los lisosomas encontramos un valor de pH ácido (5.0 ± 0.5), los endosomas y aparato de golgi son algo mas alcalinos que los lisosomas (6.0 ± 0.5) mientras que el núcleo sólo es ligeramente más ácido que el citoplasma. A su vez, la invasión de una célula por virus induce estrés oxidativo que modifica

los valores intracelulares de pH. Por estos motivos nos propusimos evaluar en efecto que provoca el pH sobre la estructura de NS1.

Para realizar este experimento, utilizamos un solución amortiguadora de rango amplio que nos permitió realizar un barrido desde pH 3.5 hasta pH 9. Las muestras fueron incubadas en cada condición por 4 horas, luego fueron centrifugadas y se recuperó la proteína presente en la fracción soluble. Evaluamos el cambio de estructura secundaria analizando el espectro en el UV lejano de dicroísmo circular, el cambio en la estructura terciaria monitoreando la fluorescencia de su triptófano y la existencia o no de oligomerización por dispersión de luz dinámica.

A medida que se disminuye el pH del medio, se observa un cambio en el mínimo del espectro de CD con un incremento de la elipticidad negativa (Figura 3.3, A), mostrando un incremento de estructura secundaria, lo que podría deberse en parte por un incremento minoritario en el contenido de α -hélices, pero principalmente por el incremento en el contenido de estructuras tipo láminas- β , como lo sugiere el análisis del espectro diferencia entre la especie a pH 8 y la especie a pH 3.5 (Figura 3.3 A, recuadro). A su vez el cambio se caracteriza por el cambio en el mínimo de elipticidad negativa, que pasa de 210 nm a pH 8 a 216 nm a pH 3.5. A partir del análisis de la transición de la elipticidad molar a 216 nm se observa una caída brusca en la misma (Figura 3.3, B), en valores inferiores a su punto isoeléctrico teórico (5.7). En relación a este valor es donde se observó la menor absorbancia a 280 nm (Figura 3.3, C). Cabe aclarar que no observamos agregados insolubles macroscópicos en ninguna de las reacciones.

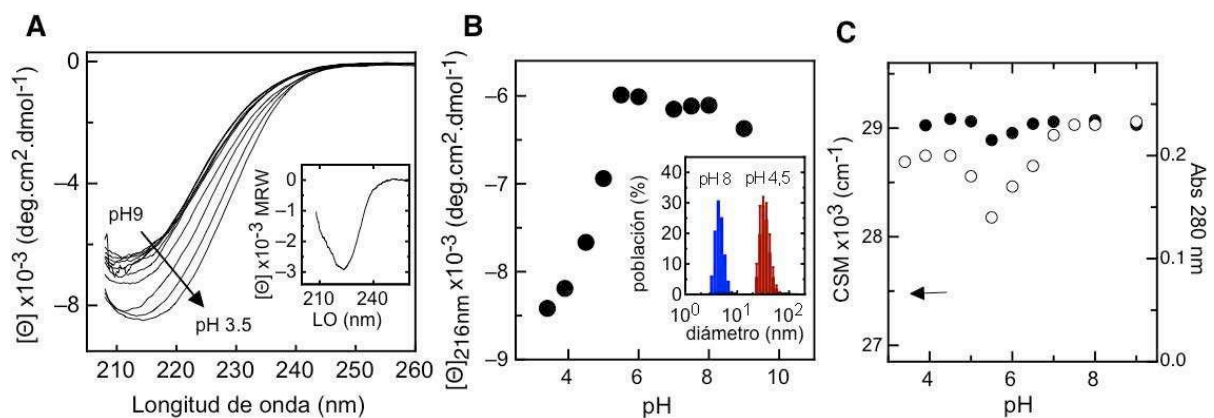


Figura 3.3. Efectos inducidos por el pH. (A) Elipticidad molar en el UV lejano a diferentes valores de pH. En el inserto se observa el espectro diferencia entre los espectros a pH 8 y 3,5. (B) Elipticidad molar a 216 nm a los diferentes valores de pH. En el recuadro se muestra distribución de tamaño de las partículas a pH 8 y pH 4,5. (C) Centro de masa del triptófano (CSM) y absorbancia a 280 nm. La flecha indica el valor del CSM correspondiente a NS1 desplegada. Estos experimentos fueron hechos en una solución amortiguadora de amplio rango (20 mM Tris-HCl, 10 mM acetato de sodio, 10 mM MES y 1 mM DTT) a 20 °C.

El análisis del centro de masa de fluorescencia (CSM, de sus siglas en inglés) no mostró cambios significativos en el rango de pH estudiados (Figura 3.3, C), lo que indica persistencia de la estructura terciaria en relación al entorno del triptófano en todas las condiciones ensayadas.

Por DLS se determinó que a pH ácidos NS1 oligomeriza y estas partículas se encuentran monodispersas en solución. El tamaño observado fue de 32.7 ± 3 nm (Figura 3.3, recuadro de B). Estos resultados indican que los oligómeros formados a pH bajo tienen un gran contenido de estructura secundaria tipo lámina beta.

III.3 EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ESTRUCTURA DE NS1

Luego de evaluar la estabilidad de NS1 en función del pH del medio, nos propusimos investigar el efecto de la temperatura para determinar su estabilidad conformacional, particularmente en rangos compatibles con actividad biológica. El efecto del incremento gradual de la temperatura sobre proteínas globulares en general lleva a su desnaturalización en forma cooperativa [75], lo cual puede ser monitoreado por dicroísmo circular en el UV lejano como una pérdida de su estructura secundaria.

En este experimento, analizamos los cambios producidos por el incremento de la temperatura en relación a su estructura secundaria, por cambios en su espectro de CD en el UV lejano. Para ello se aplicó un gradiente de temperatura entre los 10 °C y 80 °C a una velocidad de barrido de 3 °C/min, se tomaron espectros en el rango de 260 – 200 nm a las diferentes temperaturas y se monitoreó la señal a 220 nm en función de la temperatura. Con el fin de evaluar el efecto de la fuerza iónica sobre la estabilidad térmica, realizamos este experimento en dos condiciones de concentración de cloruro de sodio: por una lado se eligió una concentración de moderada fuerza iónica (0.2 M de NaCl) con la cual se realiza la purificación de NS1 y se almacenan los diferentes *stocks* y por el otro se eligió una condición de baja fuerza iónica, sin cloruro de sodio en el medio.

III.3.2 Efecto de la temperatura a 0.2 M de cloruro de sodio

Cuando se sometió a NS1 a un incremento gradual de temperatura, utilizando un tampón químico conteniendo 10 mM Tris pH 8, NaCl 0.2 M y DTT 1 mM, se observó una pérdida de señal por agregación, con un 50 % de este cambio a los 55 °C, observándose la formación de agregados macroscópicos al finalizar el proceso (Figura 3.4). Al realizar el barrido inverso, no se observaron cambios en la estructura secundaria, indicando que este proceso es irreversible.

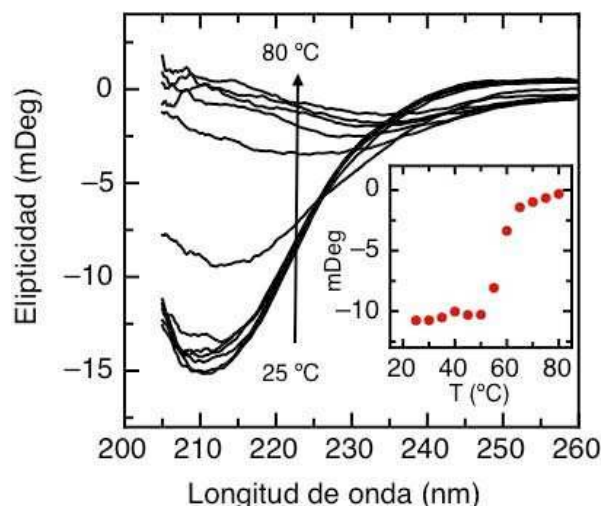


Figura 3.4. Efecto inducido por la temperatura a moderada fuerza iónica. Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano, comenzando a los 25 °C y finalizando a los 80 °C. En el recuadro se observa el cambio en la elipticidad a 220 nm. Se utilizó una solución conteniendo 10 mM Tris pH 8, NaCl 0.2 M y DTT 1 mM con una concentración de NS1 de 15 μ M.

III.3.3 Efecto de la temperatura a baja fuerza iónica

El efecto de la temperatura en condiciones de baja fuerza iónica fue analizado separando previamente al cloruro de sodio presente en la muestra stock, utilizando una columna de desalado PD-10 (GE Healthcare). A medida que fuimos aumentando la temperatura, observamos un incremento en la elipticidad negativa con un cambio en el mínimo, pasando de 210 nm a 216 nm, lo que sugiere un incremento de estructura secundaria. El análisis del espectro diferencia entre la especie inicial y la especie final indica que la especie final a 80 °C tiene una estructura secundaria con predominio de láminas beta (Figura 3.5 A, inserto). Observamos una transición cooperativa que comenzó a los 45 °C y finalizó a los 65 °C, con una T_m aparente a los 55 °C, un proceso que resultó ser también irreversible (Figura 3.5, B) Cabe aclarar que no se observó agregación macroscópica, ni precipitados luego de centrifugar, lo que indica que las especies formadas son solubles y termoestables. Como la temperatura a la que se inicia el proceso es relativamente baja, nos propusimos realizar un análisis cinético con el fin de evaluar el efecto de la temperatura en la reacción de formación de la especie beta realizando experimentos de salto de temperatura. En este experimento utilizamos NS1 equilibrada a 4 °C, que luego fue transferida a una cubeta conteniendo solución Tris-HCl 10 mM pH 8.0 equilibrada a diferentes temperaturas y se monitorearon los cambios producidos en la elipticidad a 220 nm por dicroísmo circular. En la Figura 3.5 C, se muestra graficada la vida media de cada “salto” en función de la temperatura. Se observan dos relaciones lineales, donde la zona de cruce ocurre a los 45 °C. Esto indicaría que a temperaturas superiores a 45 °C el proceso es rápido sin grandes cambios en la velocidad de formación al aumentar la temperatura. Por otro lado, por debajo de

los 45 °C, el proceso es sensiblemente más lento a medida que se disminuye la temperatura. Esto indica, que aunque en forma lenta, el proceso de formación de la especie beta se produce en temperaturas dentro del rango biológico.

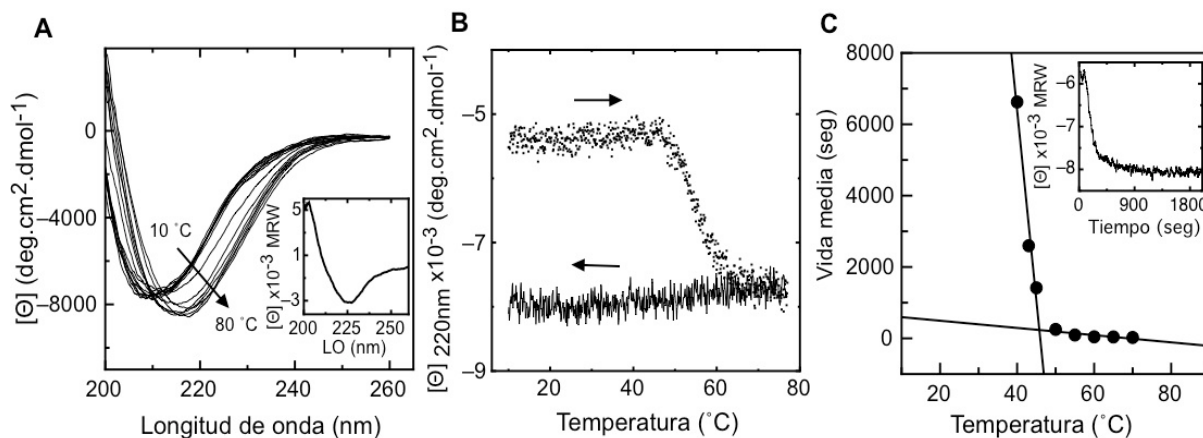


Figura 3.5. Efecto inducido por la temperatura a baja fuerza iónica. A) Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano, comenzando a los 10 °C y finalizando a los 80 °C. En el recuadro se observa el espectro diferencia entre muestra calentada y sin calentada. B) Barrido térmico de muestra calentada y enfriada, siguiendo la elipticidad molar a 220 nm. C) Cinética de formación de la especie beta, dependiente de temperatura: se muestran las vidas medias de las constantes de velocidad de cada fase principal a partir de un ajuste del proceso a una simple exponencial. En el inserto se muestra una cinética realizada a 55 °C.

Como al disminuir el pH se observó la formación de oligómeros solubles que mostraron ganancia y tipo de estructura secundaria, decidimos determinar si la especie beta que se forma por tratamiento térmico corresponde a un oligómero. Para ello, medimos por DLS la distribución de partículas de la especie calentada y luego enfriada en baja fuerza iónica, observando que nuevamente se forma una especie oligomérica, la cual se encontró monodispersa en solución (Figura 3.6).

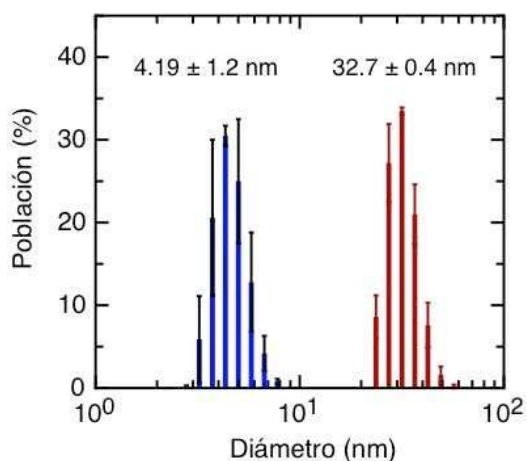


Figura 3.6. Distribución del tamaño de partículas por DLS. Se muestra la distribución de NS1 antes de ser calentada (azul) y luego de ser calentada y enfriada (rojo).

III.4 ESTUDIO DEL EFECTO DE COSOLVENTES SOBRE NS1

Dado que cambios sutiles de temperatura y pH inducen la formación de oligómeros esféricos solubles, nos propusimos investigar el efecto inducido por diferentes solventes. Los solventes elegidos tienen rangos de diferente constante dieléctrica y son conocidos por estabilizar estructuras pre-existentes. Los solventes alcohólicos utilizados fueron el Trifluoroetanol (TFE), etanol y 2-propanol. Con ellos se realizaron titulaciones crecientes a una solución conteniendo NS1 a una concentración inicial de 5 μM y se midió el cambio producido en la estructura secundaria por dicróismo circular y la distribución del tamaño de partículas por DLS, de una condición elegida para cada solvente.

La titulación con concentraciones crecientes de isopropanol y etanol provocó la formación de estructuras ricas en láminas beta, de acuerdo a los espectros en el UV lejano de dicróismo circular (Figura 3.7, A y B). La titulación con TFE también provocó este cambio, pero esto fue seguido de la formación de estructuras tipo alfa-hélice (Figura 3.7, C). Cabe recalcar que todos los solventes probados, en altas concentraciones produjeron la formación de estructuras alfa-hélices (no se muestra), siendo el TFE el que lo provocó en mayor grado estos cambios y requiriéndose concentraciones menores.

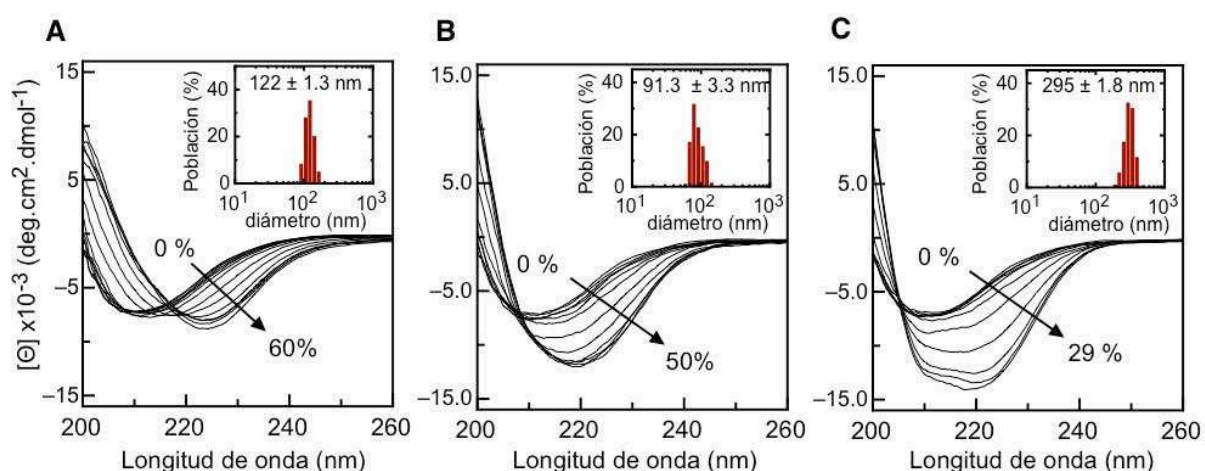


Figura 3.7. Efecto inducido por solventes orgánicos. Se muestra el efecto inducido por titulaciones con 2-propanol en A, etanol en B y trifluoroetanol en C, respectivamente. El porcentaje inicial y final de cada solvente está indicado en cada gráfico. Los insertos corresponden a mediciones por DLS de la distribución del tamaño de partículas para 2-propanol al 30%, etanol al 50% y TFE al 15%.

Al analizar el tamaño y dispersión por DLS de las especies formadas en cada solvente en las concentraciones donde se observa la presencia de especies ricas en láminas beta, observamos que se forman oligómeros monodispersos en solución. El tamaño observado fue: 122 ± 1.3 , 91.3 ± 3.3 , and 295 ± 1.8 nm de diámetro para etanol, isopropanol, y TFE, respectivamente (Figura

3.7, inserto). A través de estos resultados, podemos concluir que en las condiciones de solvente ensayadas, se forman oligómeros esféricos y solubles aunque de tamaño variable.

Si comparamos estos resultados, con los obtenidos por tratamiento térmico o pH, los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano se superponen notablemente (Figura 3.8). Esto nos indica una alta tendencia de NS1 monomérica hacia la formación de estas estructuras oligoméricas con alto contenido de láminas- β en su estructura secundaria, a través de modificaciones de distinta naturaleza. A esta especie oligomérica y soluble (particularmente la obtenida por tratamiento térmico) la llamaremos de aquí en adelante NS1SOs, de oligómeros esféricos de sus siglas en inglés, siguiendo una nomenclatura utilizada en nuestro laboratorio (ver Capítulo V).

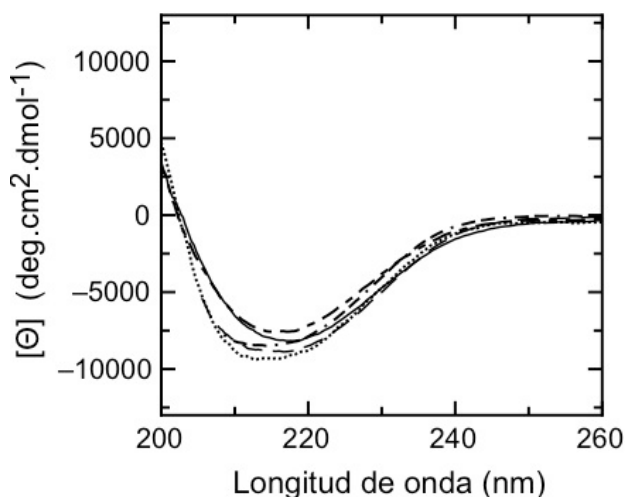


Figura 3.8. Cambios conformacionales inducidos por las diferentes condiciones probadas. Se muestran los espectros de CD en el UV lejano de NS1SOs producida por tratamiento térmico (—) y de NS1 incubada a pH 3.5 (- - · - -). A su vez, se muestran superpuestos los espectros de NS1 con 33% de etanol (- - - - -), 28% de 2-propanol (.....) y 15% de TFE (— — —).

III.5 ANÁLISIS DEL ESTADO DE OXIDACIÓN DE NS1

NS1 contiene 4 cisteínas: C29, C66, C98 y C109, las cuales se encuentran muy conservadas en NS1 de los diferentes subtipos virales humanos y su variante bovina, aunque poco conservados en la variante murina (ver Capítulo I). Dado que no hay una estructura disponible en la literatura, ni antecedentes de trabajos que estudien las propiedades redox de esta proteína, nos propusimos determinar el estado de oxidación de los grupos sulfhidrilo de estas cisteínas. Estos resultados pueden configurar un punto de partida para determinar su posible

implicancia en alguna de las múltiples funciones de NS1, ya que la oxidación de cisteínas con formación de puentes disulfuro no sólo puede tener un rol estructural sino tener una consecuencia sobre una actividad funcional. Con este objetivo, hicimos uso de distintas técnicas que nos permitieron determinar el estado de oxidación tanto para NS1 monomérica como para NS1 oligomérica obtenida por tratamiento térmico (NS1SOs).

En una primera instancia, se midieron los sulfhidrilos libres por la técnica colorimétrica del 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzónico) DTNB. Esta técnica se basa en la cuantificación del ácido trinitrilo benzoico (TNB) que se libera como producto de la reacción entre un sulfhidrilo y el DTNB, midiendo la absorbancia a 412 nm. Como la reactividad de cada grupo sulfhidrilo con el reactivo se encuentra limitada por la accesibilidad del mismo, se utilizó un control con alta concentración de desnaturalizante (en este caso cloruro de guanidinio) en el que las 4 cisteínas se debieron encontrar reducidas. En este experimento se observó que, para NS1 monomérica se midió un valor de 3.5 sulfhidrilos libres, contra 4.2 sulfhidrilos libres para el control en 5 M Gdm.Cl, indicando que las 4 cisteínas presentan sus grupos sulfhidrilos libres (Tabla III.1). Para NS1SOs se obtuvo un valor de sulfhidrilos libres de 3, en relación al valor de proteína en 5 M de Gdm.Cl, que fue de 3.7, indicando que en la especie oligomérica obtenida por tratamiento térmico hay cisteínas que se encuentran oxidadas o bien se encuentran parcialmente ocultas al solvente.

Tabla III.1 Cuantificación de sulfhidrilos libres para NS1 y NS1SOs.*

	[SH] NS1	[SH] NS1SOs
DTNB	3.5	3.0
DTNB (5M Gdm.Cl)	4.2	3.7

*Se muestran los valores obtenidos mediante la técnica de DTNB y su control en 5M de Gdm.Cl para diferenciar grupos no accesibles.

Para obtener más información sobre el estado de oxidación de NS1SOs y determinar si se producen puentes disulfuro en esta especie, realizamos geles SDS-PAGE donde se trató a NS1SOs en presencia y ausencia del reductor ditrioteitol (DTT). Como control se utilizó a NS1 monomérica, que como ya se mencionó, presenta sus 4 cisteínas reducidas (Figura 3.9). En todas las condiciones se observó que NS1 tuvo una movilidad electroforética correspondiente mayoritariamente como una única banda, correspondiente al peso molecular del monómero. Al incubar a NS1SOs en condiciones no reductoras se observó una banda entre los 25 y 36 KDa

(ausente cuando se trata con el DTT o en el control con el monómero) lo que indicaría la presencia de especies oxidadas. En un experimento independiente, se incubó a NS1 monomérica a 35 °C por 8 días. Al cabo de ese tiempo se observó la formación de NS1SOs, y se analizó por espectrometría de masa MALDI-TOF la presencia o ausencia de especies oxidadas. Se debe tener en cuenta que esta técnica no brinda información cuantitativa y que la ausencia de especies oxidadas no es suficiente evidencia para descartar su existencia. Como control se utilizó a NS1 monomérica a tiempo cero del experimento. Observamos un pico principal de 14354 Da, indicando degradación parcial de NS1 a lo largo del experimento. Se observó un pico a los 28575 Da, similar a la especie observada en el experimento anterior (SDS-PAGE) y que indicaría la presencia de una especie oxidada, y dos picos a los 43403 y 57426 Dalton que podrían deberse a impurezas que quedaron de la purificación y/o especies oxidadas.

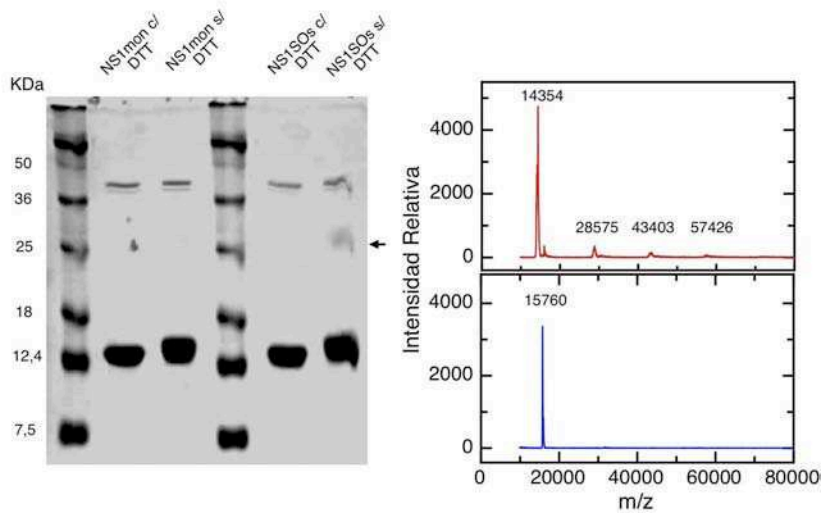


Figura 3.9 Análisis de presencia de puentes disulfuro en NS1SOs. Izquierda: SDS-PAGE de NS1SOs tratada en presencia o ausencia de reductor. La flecha indica la presencia de una especie oxidada. Como control se utilizó a NS1 monomérica. Derecha: Análisis por espectrometría de masa MALDI-TOF de NS1SOs (en rojo) y NS1 monomérica (en azul). El valor de peso molecular de cada especie observada se indica por encima de cada pico.

Globalmente estos resultados indican que NS1 en condiciones nativas tiene a sus cuatro cisteínas en estado reducido. Al oligomerizar, observamos que se forman especies oxidadas, aunque un porcentaje mayoritario de NS1SOs se encontró en estado reducido.

III.6 ANÁLISIS CONFORMACIONAL POR PROTEÓLISIS LIMITADA

Para el estudio de la conformación de una proteína frecuentemente resulta útil determinar la accesibilidad de sitios corte que esta presenta por parte de diferentes proteasas. Utilizando enzimas que reconocen múltiples sitios en una proteína como la tripsina o quimotripsina uno puede evaluar la flexibilidad de la cadena polipeptídica, localizando regiones parcialmente plegadas o altamente dinámicas [76]. Por otro lado, esta técnica resulta útil para la identificación de dominios de plegamiento, siendo que cuanto más compacta sea una región más resistente resultará al corte por estas enzimas, constituyendo fragmentos límite de corte. Luego estos fragmentos pueden ser identificados por espectrometría de masa y ser sujetos al clonado y expresión en forma independiente.

Utilizamos las enzimas tripsina y quimitripsina incubando a NS1 a diferentes tiempos y concentración de enzima (Figura 3.10). Observamos que NS1 es degradada casi por completo a las 2 hs, en todas las condiciones probadas, sin que se observen fragmentos límites de corte, resistentes a la acción de las proteasas. Estos resultados indican que NS1 podría contener regiones flexibles o parcialmente plegadas en las que se encuentran sitios de corte accesibles para estas enzimas. Por otro lado dado que NS1 tiene un tamaño pequeño, podría ser que la proteína no contenga más de un domino estructural. Sin embargo, resultaría útil probar un número más amplio de enzimas para evaluar posibles digestiones alternativas.

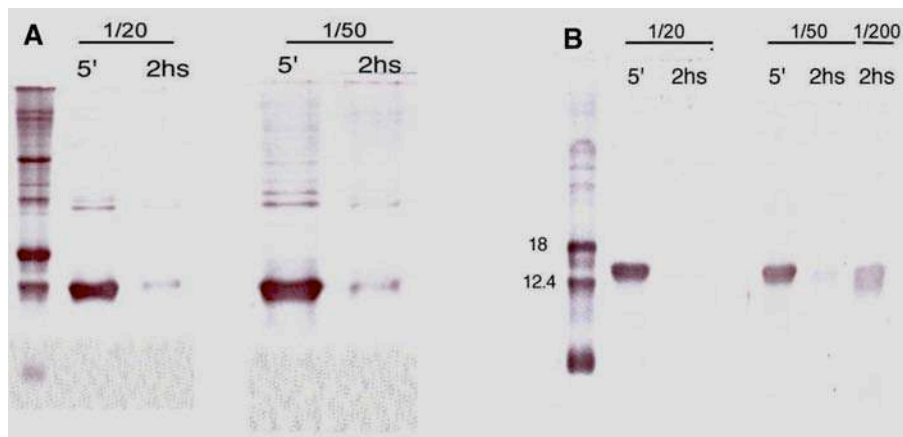


Figura 3.10. Proteólisis limitada de NS1 con Tripsina y Quimotripsina. A) Se muestra digestiones con la proteasa tripsina incubando a 37 °C y deteniendo la reacción a los 5 y 120 minutos, en las relaciones m/m señaladas. Se partió de un stock 0.5 mg/ml de enzima y 0.5 mg/ml de NS1. B) Digestiones utilizando quimotripsina incubando a 37 °C y deteniendo la reacción a los 5 y 120 minutos en la relaciones m/m señaladas. Se utilizó un stock de proteasa a una concentración de 1 mg/ml y una concentración de NS1 0.5 mg/ml (ver Materiales y Métodos).

III.7 ESTUDIO CONFORMACIONAL POR RMN

La utilización de resonancia magnética nuclear para el estudio de proteínas resulta de gran utilidad ya que tiene la posibilidad de brindar información no sólo acerca de la estructura sino también de la dinámica conformacional de una proteína dada. En el caso de NS1 luego de optimizar las condiciones de expresión en medio mínimo para la marcación de la proteína con los heteronúcleos ^{15}N y ^{13}C , descrito en el Capítulo II, nos propusimos estudiarla mediante esta técnica.

En una primera instancia se realizó un espectro monodimensional, para evaluar dispersión y plegamiento de NS1 (Figura 3.11). Este experimento mostró una dispersión de picos adecuada para una proteína de 15.6 KDa, con buena definición de picos en la región amídica y señales a campos altos, las cuales son características de metilos en un entorno hidrofóbico como el núcleo estructurado de la proteína. A su vez, a partir de experimentos para determinar el radio hidrodinámico de NS1, utilizando al dioxano como control interno [77], obtuvimos un valor de $21.6 \pm 0.6 \text{ \AA}$, ligeramente superior a los $19.5 \pm 1.0 \text{ \AA}$ esperados para un monómero globular de 15.6 KDa, pero inferior a un dímero para el cual se esperarí un valor de $25.11 \pm 1.0 \text{ \AA}$ [78].

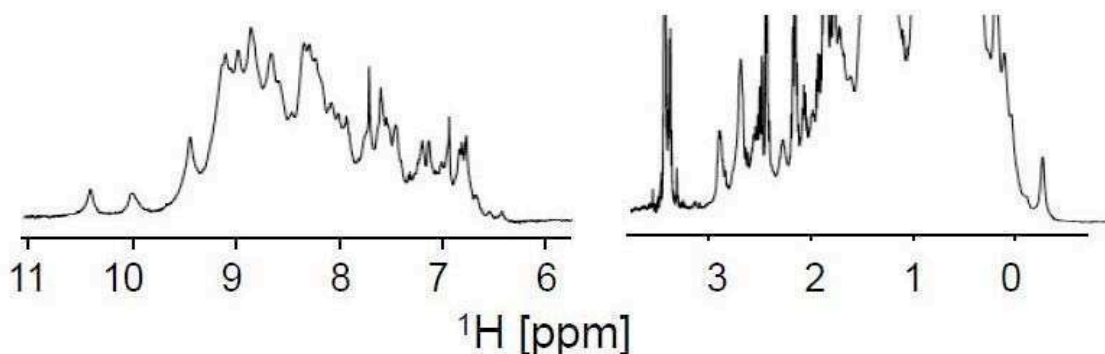


Figura 3.11. Espectro monodimensional ^1H de NS1. Se muestra la región amida (derecha) y alifática (izquierda) del espectro del protón de NS1.

Dado que muchos experimentos por RMN requieren largos períodos de tiempo (días), realizamos una extensa búsqueda de condiciones para lograr aquella en la cual NS1 sea estable por el mayor tiempo posible debido a su tendencia a oxidarse y oligomerizar. Para ello, evaluamos diferentes condiciones de soluciones amortiguadoras, pH, temperatura, fuerza iónica y agentes reductores (no se muestra). A su vez, se ensayó el efecto estabilizante de diversos aditivos como detergentes, glicerol, cloruro de guanidinio y concentraciones bajas de solventes

orgánicos como TFE, con el objetivo de lograr un espectro de mejor calidad (lo que significa mayor grado de estructuración) y de incrementar la estabilidad de la proteína. Se eligió una condición de solución conteniendo 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.2 M NaCl y 1 mM TCEP, como reductor, determinando que en estas condiciones NS1 es estable por una semana a 25 °C.

En estas condiciones realizamos un experimento en dos dimensiones $^1\text{H}/^{15}\text{N}$, denominado HSQC (correlación heteronuclear cuántica simple, de sus siglas en inglés). La dispersión de las señales fue aceptable (considerando que observamos múltiples resonancias entre los 7.5 y 9 ppm, Figura 3.12, A). Sin embargo se observó una distribución irregular de la intensidad de los picos, así como el hecho que múltiples resonancias se encontraron ausentes (se observaron 70 de los 139 picos esperados). En forma similar, experimentos preliminares 3D ($^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$) HNCOC, los cuales se realiza para correlacionar conectividades del esqueleto de la cadena peptídica entre en ^{15}N y ^1H del enlace peptídico de un aminoácido y el ^{13}C del carbonilo del aminoácido precedente, detectamos sólo 69 de los 138 “cross peaks” esperados (Figura 3.12, B). Posteriormente, realizamos el experimento CBCA(CO)NH, el cual permite una asignación secuencial del esqueleto de residuos aminoácidos al correlacionar resonancias del ^1H y ^{15}N del enlace amida de un aminoácido con las resonancias del $^{13}\text{C}\alpha$ (carbono alfa) y $^{13}\text{C}\beta$ (carbono beta) de su residuo precedente. El resultado de este experimento no fue satisfactorio, siendo que se obtuvieron sólo 9 “cross peaks” de los 138 esperados. Esto imposibilitó asignar las señales observadas en el HSQC a sus residuos aminoácidos correspondientes.

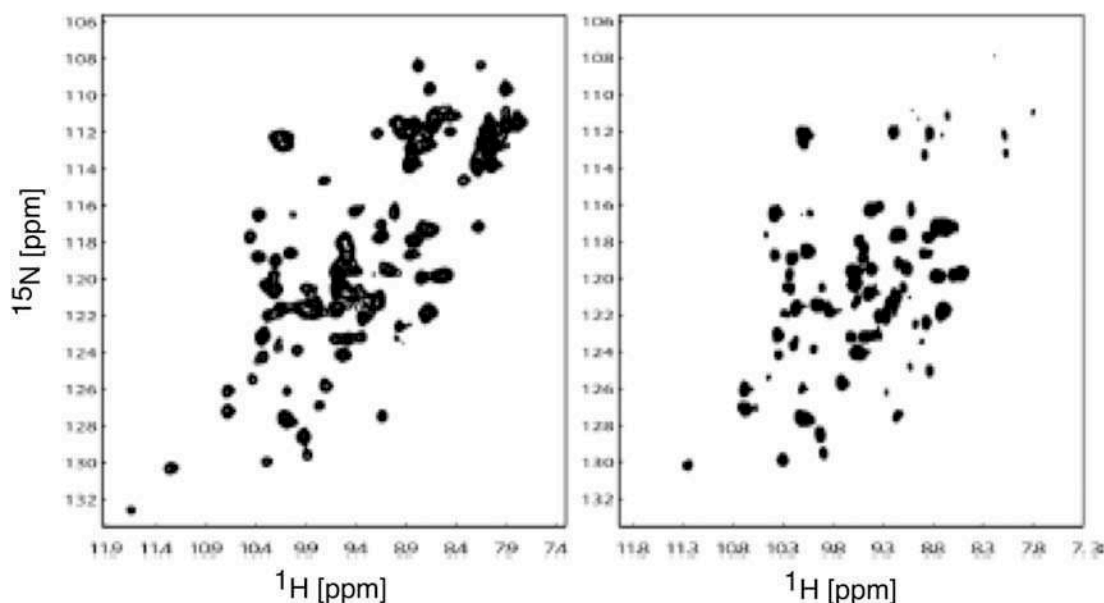


Figura 3.12. Espectros HSQC y HNCOC de NS1. Derecha: HSQC realizado a 25 °C con NS1 a una concentración de 300 μM en tampón 10 mM Tris-HCl pH 7.5 conteniendo 0.2 M NaCl y 1 mM TCEP. Izquierda: se muestra la proyección en el plano $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ de un experimento HNCOC realizado con proteína marcada con $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ en las mismas condiciones mencionadas para el HSQC.

El hecho de que no se observe un tercio de los picos esperados para NS1 puede deberse a intercambio con el solvente a pH básico o a intercambio conformacional lo cual ensancha los picos no permitiendo su detección. Al disminuir el pH no apareció un número significativo de picos, lo que sugiere que las señales ausentes podrían estar presentando intercambio conformacional. Para confirmar esto, realizamos experimentos de dinámica, donde medimos el tiempo de relajación transversa T_2 con NS1 simplemente marcada con ^{15}N (Figura 3.13). Este experimento refleja el tiempo de rotación de la proteína, siendo que T_2 largos surgen de proteínas que rotan rápidamente, y por el contrario T_2 cortos reflejan tiempos de rotación más largos. De esta forma, este parámetro puede a su vez indicar zonas móviles o flexibles en una molécula.

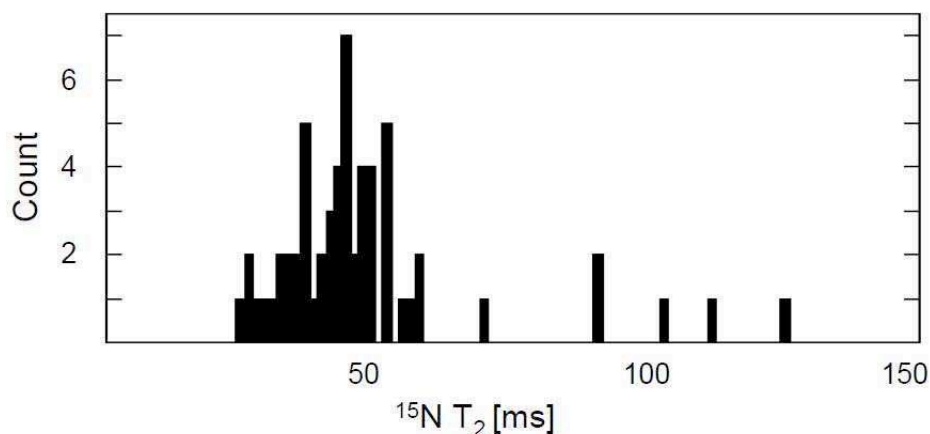


Figura 3.13. Histograma donde se muestra la distribución de los tiempos de relajación T_2 . Este experimento se realizó en *buffer* 10 mM Tris-HCl pH 7.5 conteniendo 0.2 M NaCl y 1 mM TCEP a 25 °C en un espectrómetro 600 MHz.

Se obtuvo un valor de T_2 para 63 residuos aminoácidos, para los cuales el valor promedio fue de 50.1 ms, lo cual es razonable para un monómero plegado de 139 aminoácidos y de acuerdo a nuestras condiciones experimentales, aunque el valor esperado para un monómero compacto era ligeramente superior. A su vez, el valor de T_2 obtenido mostró una dispersión grande (con una desviación estándar de 26 ms). Teniendo en cuenta que NS1 presenta un radio hidrodinámico consistente con un monómero globular, esta dispersión del valor T_2 puede ser debido a movimientos internos en NS1. De hecho, algunos residuos aminoácidos experimentaron valores de T_2 significativamente mayores al volumen global de la proteína, indicando fuertemente que estas regiones pertenecen a zonas flexibles de NS1, posiblemente de los extremos N- o C-terminal de la cadena polipeptídica. Sin embargo, muchos “cross peaks” mostraron valores de T_2 más bajos al promedio. Estos picos son candidatos a sufrir intercambio conformacional en el orden de los microsegundos a milisegundos. Típicamente, los

movimientos lentos que causan esto son debido a re-arreglos conformacionales. Entonces, estos resultados sugieren que NS1 en solución contiene una porción de su molécula que experimenta cambios conformacionales que podrían explicar la ausencia de por lo menos algunos de los picos que no vemos en el HSQC.

En resumen, NS1 existe como un monómero en solución, en el cual parte de su molécula experimenta movimientos internos. Para determinar cuáles son estas regiones es necesario asignar los residuos aminoácidos que se observan en los espectros HSQC para realizar experimentos de dinámica a mayor detalle.

III.8 DISCUSIÓN

En el presente capítulo se describen las propiedades conformacionales de NS1 en solución utilizando diferentes técnicas espectroscópicas. NS1 es obtenida en forma recombinante como un monómero homogéneo en solución con un peso molecular de 15.6 KDa, de acuerdo al análisis de su secuencia de aminoácidos. Por RMN determinamos un radio hidrodinámico de 21.6 Å, indicado que el monómero se encuentra plegado y con una estructura globular. Esta proteína presenta una estructura secundaria con predominio en láminas beta y un minoritario aporte de alfa-hélices. Su único triptofano se encuentra oculto al solvente posiblemente dentro del núcleo estructurado de la molécula, lo que es de gran utilidad para el análisis de transiciones y como se describe más en detalle en el capítulo IV, podemos monitorear el comportamiento de esta sonda intrínseca de la molécula para evaluar cambios globales en la estructura terciaria de NS1.

Evaluamos el efecto del pH sobre la conformación de NS1. Esta proteína resultó estable a diferentes valores de pH, sin cambios significativos de su estructura secundaria a valores por encima de su punto isoeléctrico teórico (5.7). Al incubar a la proteína a pH ácido no sólo no se despliega, de acuerdo a los valores observados del centro de masa de su único triptófano, sino que se observa un incremento de estructura secundaria, a predominio de láminas beta. Esto a su vez se corresponde con la formación de estructuras oligoméricas que se encuentran monodispersas en solución. El punto medio de la transición está alrededor del valor de pH 5.0, lo que sugiere que estructuras monoméricas podrían no ser las únicas presentes en células infectadas.

El incremento de temperatura tiene diferentes efectos sobre NS1 dependiendo de la fuerza iónica del medio. En condiciones de moderada fuerza iónica, NS1 se desnaturaliza en

forma cooperativa e irreversible, con una T_m aparente a los 55°C. En condiciones de baja fuerza iónica, NS1 no sólo no se desnaturaliza sino que gana estructura secundaria a predominio de láminas- β , con formación de oligómeros solubles. Estos oligómeros son similares en diámetro ($32.7 \pm 0,4$ nm) a los que son inducidos por el pH (32.7 ± 3 nm). El comienzo de la transición hacia la formación de NS1SOs, provocada por el aumento de temperatura ocurre a los 45 °C, lo que resulta compatible con valores fisiológicos.

El análisis cinético del proceso de oligomerización a diferentes temperaturas muestra que la vida media del proceso se acelera 25 veces desde lo 40 a los 46 °C, correspondientes a la T_m aparente obtenida de este experimento. Además, la naturaleza irreversible del proceso indica que aún cambios pequeños conducen irreversiblemente a la acumulación gradual de especies oligoméricas a temperaturas compatibles con aquellas presentes en un entorno celular.

Al disminuir la polaridad del medio se observó un cambio en el equilibrio conformacional hacia la formación de oligómeros, que de acuerdo a su espectro de CD, son similares a NS1SOs, obtenidos por temperatura, sugiriendo una ruta y punto final en común. En el caso de isopropanol y etanol, estos solventes son considerados estabilizantes de alfa-hélices, por lo que la formación de estos oligómeros con un incremento láminas beta en relación a su estructura secundaria, indica una fuerte tendencia a la formación de estas especies.

NS1 posee cuatro cisteínas, las cuales se encuentran muy conservadas en las diferentes NS1 de los distintos subtipos virales. Encontramos que NS1 monomérica contiene a estos residuos en estado reducido. Por otro lado, cuando la proteína oligomeriza por efecto inducido por la temperatura, observamos que coexisten especies oxidadas con una mayoría de especies reducidas. Futuros estudios son necesarios para determinar si estas cisteínas, dada su alta conservación, tienen algún rol funcional. No obstante, los resultados obtenidos hasta el momento no sugieren una transición redox significativa.

Los estudios realizados por RMN indican que NS1 es una proteína plegada, para la cual el análisis de su radio hidrodinámico indica que tiene una estructura globular con un valor de 21.6 ± 0.6 Å, mientras que para un glóbulo fundido o un dímero los valores esperados serían de 22.4 y 25.1 Å, respectivamente. Estos datos nos sugieren una estructura bastante compacta en solución. Por otro lado, los espectros de HSQC muestran la existencia de 2/3 de las señales esperadas para una proteína de 139 residuos aminoácidos. Estudios de dinámica conformacional indican que la ausencia de estas señales es debido a que presentan intercambio conformacional. Entonces, estas regiones experimentan movimientos internos lentos, constituyendo zonas flexibles de la molécula. Frecuentemente regiones flexibles han sido asociadas con roles importantes en relación a la función de una proteína. Por lo tanto las propiedades dinámicas de

una proteína resultan esenciales para describir las bases estructurales de sus funciones biológicas. Estudios futuros son necesarios para identificar estas regiones móviles en NS1 y definir su rol funcional. La determinación de estructura tanto en solución como en el cristal, aún elusivas, resultan de fundamental importancia.

CAPÍTULO IV

MECANISMO DE PLEGADO DE NS1

Realizar estudios del plegado de proteínas es y ha sido históricamente de gran importancia en ciencias biológicas, ya que confiere información en relación a como las proteínas adquieren su estructura tridimensional, necesaria para que ejerzan su función. En la década del '60, Christian B. Anfinsen demostró que la estructura tridimensional de una proteína se encuentra codificada en su secuencia de aminoácidos y que esta estructura define el rol o función de la misma en la célula (Anfinsen, 1973). Pero el plegado no es un proceso al azar sino que existen “rutas de plegamiento” específicas para cada proteína. Esto es la base de la llamada paradoja de Levinthal, en donde se plantea que si se dejara explorar todas las posibles configuraciones para alcanzar el estado nativo de una cadena polipeptídica de 101 amino ácidos, a una velocidad de 10^{13} s^{-1} serían necesarios 10^{27} años para probar todas (Levinthal, 1969). La paradoja de Levinthal consiste en que, no obstante, la mayoría de las proteínas se pliegan en el rango de segundos o menos. Esto motivó numerosos experimentos diseñados para identificar y caracterizar intermediarios en el proceso de plegamiento. Al equilibrio, estos estudios permiten analizar la estabilidad de dominios y subdominios. Al estudiar la cinética del proceso, se obtiene información mecanística de la reacción de plegamiento.

NS1 es una proteína pequeña, para la cual no se cuenta con una estructura disponible ni existe homología en su secuencia con otras proteínas en la literatura (ver Introducción). El estudio del plegamiento de una proteína permite determinar su estabilidad, obtener parámetros termodinámicos e inferir información en relación a su estructura nativa, así como posibles conformaciones alternativas. Por otro lado permite identificar intermediarios estables o cinéticos que son de utilidad para establecer relaciones estructura-función y conocer el repertorio conformacional de una proteína. En base a estos antecedentes fueron propuestos los siguientes objetivos:

OBJETIVO 3: Estudio del plegado de NS1

Se propuso estudiar el plegado de NS1 utilizando diferentes técnicas espectroscópicas y biofísicas que nos permitan analizar los cambios producidos tanto en la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria para determinar el mecanismo de plegado. Los objetivos específicos de este capítulo fueron:

- Estudiar el plegado de NS1 al equilibrio.
- Evaluar la cinética del desplegado de NS1.
- Evaluar la cinética de plegado de NS1.
- Determinar un modelo mínimo para el plegado de NS1.

IV.1 ESTABILIDAD Y PLEGAMIENTO AL EQUILIBRIO

IV.1.1 Desnaturalización de NS1 con cloruro de guanidinio

El estudio en relación a la estabilidad de una proteína puede realizarse no sólo valorando cambios en su conformación en función del pH o de la temperatura, como fue descrito en el capítulo III, sino que se puede evaluar la estabilidad del conjunto de interacciones que mantienen plegada a una molécula mediante la perturbación del equilibrio entre el estado plegado y el estado desplegado, por el agregado de cantidades crecientes de un agente desnaturalizante. Analizamos la estabilidad de NS1 mediante su desnaturalización química con cloruro de guanidinio (Gdm.Cl). Para esto incubamos por 4 horas a 20 °C a NS1 con concentraciones crecientes de este reactivo, para luego monitorear los cambios producidos en la elipticidad molar por dicroísmo circular (CD) lo cual reporta cambios en la estructura secundaria y en el centro de masa de fluorescencia del triptófano (CSM, Figura 4.1) lo cual reporta cambios en la estructura terciaria.

Observamos que NS1 se despliega siguiendo una única transición altamente cooperativa entre la conformación nativa y su estado desplegado, observándose estos cambios tanto en su estructura secundaria como en su estructura terciaria. En ambos casos NS1 se desplegó completamente con concentraciones de Gdm.Cl mayores a 4.0 M. El proceso inverso, a través de replegado por dilución a distintas concentraciones de desnaturalizante, refleja que el mismo se produce en forma completamente reversible, donde a su vez al analizar el estado de oligomerización de la especie resultante luego del replegado observamos que la misma es monomérica. Esto nos permitió realizar un ajuste de los datos utilizando un modelo de dos estados al equilibrio (ver Materiales y Métodos). Este ajuste de los datos, el cual se basa en un método de extrapolación lineal [79], permite obtener los siguientes parámetros termodinámicos: $\Delta G^{H_2O}_{NU}$, m , y $[D]_{50}$ (Tabla 4.1). El parámetro $\Delta G^{H_2O}_{NU}$ refleja el cambio de energía libre entre el estado nativo y el estado desplegado extrapolado a 0 M de desnaturalizante, como una estimación de la estabilidad conformacional de la molécula; el parámetro m es una medida de la dependencia de ΔG^{H_2O} con la concentración de desnaturalizante y refleja la cooperatividad del proceso; el parámetro $[D]_{50}$ indica la concentración de desnaturalizante la cual coincide con el punto medio de la transición, obteniéndose del cociente entre $\Delta G^{H_2O}_{NU}$ y m . Observamos que en los cambios registrados por CD el punto medio de la transición $[D]_{50}$ fue de 3.9 ± 0.9 M (Figura 4.1, A y C). Este valor fue similar al analizar los cambios en el centro de masa del espectro de fluorescencia de su triptófano, obteniendo un valor de 4.1 ± 0.6 M, con un corrimiento hacia el

rojo en el máximo del espectro de emisión fluorescencia de su triptófano, indicando pérdida de estructura terciaria (Figura 4.1, B, D y Tabla 4.1).

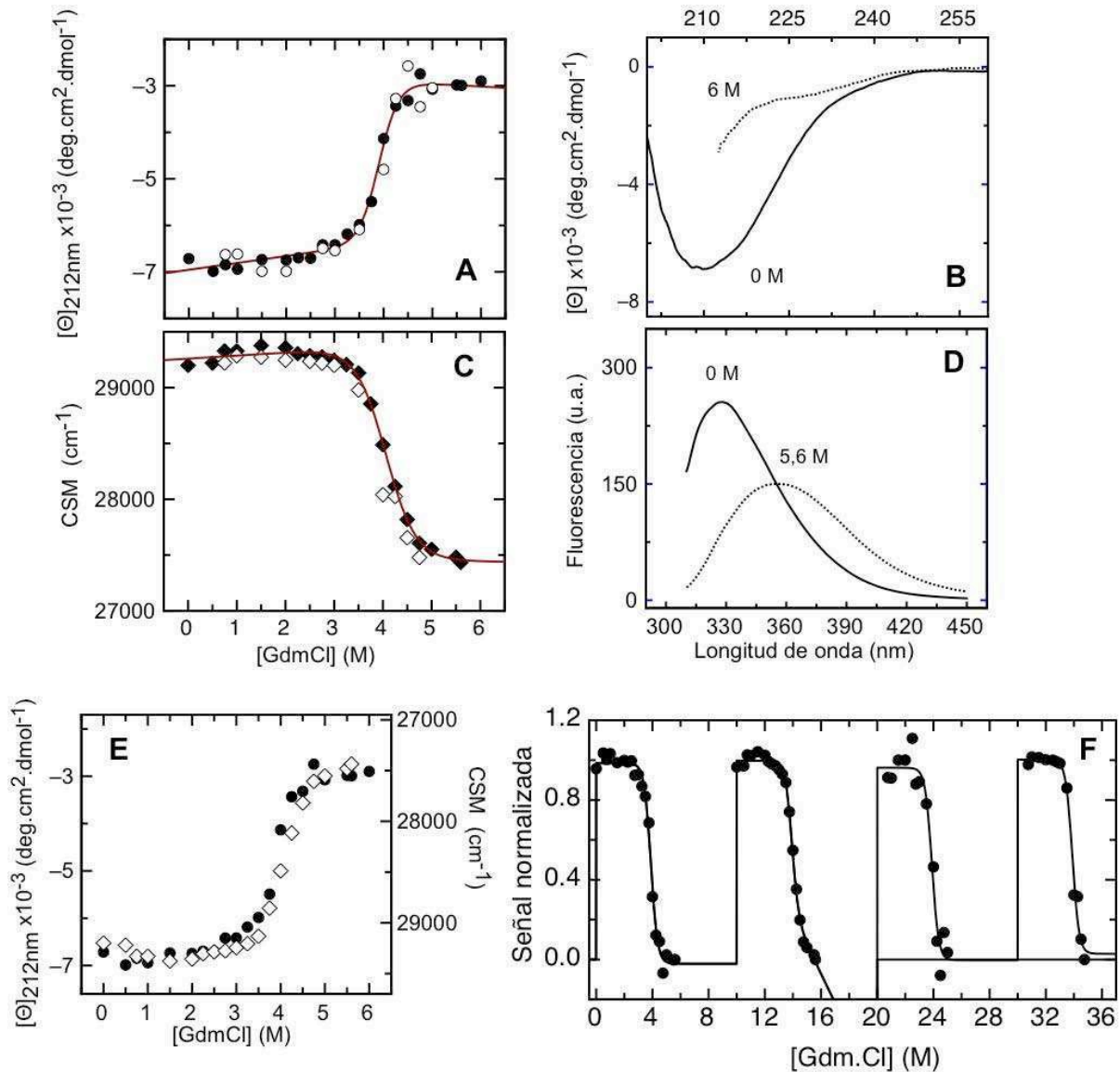


Figura 4.1 Desnaturalización inducida por Gdm.Cl al equilibrio. A) Elipticidad molar de CD en el UV lejano en función de [Gdm.Cl] de experimentos de desplegado (●) y replegado (○). B) Espectro de CD en el UV lejano de NS1 a 0 y 6M de Gdm.Cl. C) Centro de masa del espectro de fluorescencia del triptófano (CSM, de la siglas en inglés) en función de [Gdm.Cl], obtenido por experimentos de desplegado (◆) y replegado (◇). La línea continua en A y C corresponde al ajuste de los datos a un modelo de dos estados (ver Materiales y Métodos). D) Espectro de fluorescencia del triptófano de NS1 a 0 y 5.6M de Gdm.Cl. E) Señales de CD en el UV lejano (●) superpuesta con las señales de fluorescencia (◇, nótese que la escala del CSM se encuentra invertida para mejor visualización de la comparación). F) Ajuste global de los datos normalizados de CD y fluorescencia por desplegado y replegado. En el eje “x” se muestra la concentración de Gdm.Cl para cada set de datos, a cual se le sumó: +0; +10; +20; +30 para realizar el ajuste global. Todas las mediciones se realizaron a una concentración de NS1 de 10 μM.

Al superponer ambas curvas de CD y fluorescencia, se observa que los cambios inducidos en la estructura secundaria por el cloruro de guanidinio se producen en forma

acoplada a los cambios en la estructura terciaria (Figura 4.1, E). El ajuste individual de los datos de CD arrojó un valor de $\Delta G^{H_2O}_{NU}$ de $11.7 \pm 1.9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ y de $3.0 \pm 0.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ para el valor de m . Por el ajuste individual de los datos de fluorescencia se calculó un valor de $\Delta G^{H_2O}_{NU}$ de $7.8 \pm 0.8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ y de $1.9 \pm 0.2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ para el valor de m . Estos valores si bien no resultan exactamente iguales, dada la muy buena superposición de las curvas y en una primera aproximación al modelo de plegado al equilibrio, se realizó un ajuste global de los datos obtenidos por CD y fluorescencia en forma separada (Figura 4.1, F). A partir de este ajuste global obtuvimos un valor del cambio en la energía libre en agua ($\Delta G^{H_2O}_{NU}$) de $9.6 \pm 0.9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Tabla 4.1). Para el parámetro m se obtuvo un valor de $2.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$, el cual se correlaciona con valores obtenidos para otras proteínas globulares de tamaño similar. En conjunto, estos resultados indican una transición entre dos estados al equilibrio. Sin embargo, dada la diferencia observada en los valores de los parámetros de $\Delta G^{H_2O}_{NU}$ y m y la no perfecta superposición de las curvas de CD y fluorescencia, esto podría sugerir la presencia de algún intermediario.

Tabla 4.1 Parámetros termodinámicos del desplegamiento de NS1 al equilibrio

Parámetros de termodinámicos				
	$\Delta G^{H_2O}_{NU}$	m	$[D]_{50}$	
	$\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$	M	
CD	11.7 ± 1.9	3.0 ± 0.5	$3.9 M \pm 0.9$	
CSM	7.8 ± 0.8	1.9 ± 0.2	$4.1 M \pm 0.6$	
Ajuste Global	9.6 ± 0.6	2.5 ± 0.2	$3.8 M \pm 0.8$	
Parámetros Espectroscópicos				
	CD (MRW_{212nm})		CSM (cm⁻¹)	
	Plegada	Desplegada	Plegada	Desplegada
NS1	-6960 ± 90	-2970 ± 74	29259 ± 26	27445 ± 29

Ha sido descrita una relación proporcional empírica del parámetro m obtenido en experimentos de desnaturalización, con el cambio en el área expuesta al solvente entre el estado nativo y desplegado (ΔASA , de sus siglas en inglés). Esto fue corroborado para un grupo amplio de proteínas globulares [80]. A su vez, el valor de ΔASA se relaciona con el número de residuos de una proteína globular. Por lo que para una proteína globular típica, el valor de ΔASA se

puede calcular a partir de su tamaño y debe coincidir con el valor calculado a partir del parámetro m . Utilizando el valor de m obtenido del ajuste global, calculamos un valor de ΔASA de 7460 \AA^2 . El valor de m se corresponde con número promedio de 90 residuos estimados, significativamente menor que los 139 residuos esperados para NS1, lo cual sugiere la presencia de regiones accesibles al solvente en el estado nativo de la proteína.

IV.2 ESTUDIO CINÉTICO DEL PROCESO DE DESPLEGADO

IV.2.1 Cinética de desplegamiento

Como parte fundamental de la disección del mecanismo de plegado de NS1, nos propusimos investigar la cinética de este proceso. Comenzamos estudiando la cinética de desplegamiento monitoreando los cambios en la exposición al solvente del único triptófano de NS1, el cual es indicador de cambios globales en su estructura terciaria (como se mostró en los estudios al equilibrio), así como monitoreando los cambios en la estructura secundaria de NS1 a través de medidas de dicroísmo circular en el UV lejano en función del tiempo. Para esto, realizamos experimentos de mezclado manual, donde NS1 nativa fue diluida 10 veces en solución del tampón Tris 10 mM a pH 8.0 con diferentes cantidades de cloruro de guanidinio, a una concentración final en el rango entre los 3.75 y 7.0 M, luego de lo cual se monitoreó la cinética de las diferentes señales en el tiempo. Para el ajuste de los datos se utilizaron funciones exponenciales, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$F(t) = \sum A_n \exp(-k_n t) + F_\infty \quad (4.1)$$

Donde $F(t)$ y F_∞ corresponden a las señales observadas a un tiempo definido t y a un tiempo infinito, respectivamente. A_n y k_n son las amplitudes del cambio de señal y constantes observadas, respectivamente para cada proceso exponencial (ver Materiales y Métodos). Para el análisis de los datos, se utilizó un criterio donde el mejor ajuste de los datos fue aquel descrito por el menor número de procesos donde se observó: 1) una dispersión al azar de residuales; 2) una desviación estándar que sea menor o igual a $1/5$ del valor del parámetro; 3) una mejora en el valor del Chi cuadrado, en comparación con la función con menos parámetros con la cual se relacione.

El desplegamiento de NS1 resultó ser un proceso simple y lento en todas las concentraciones de cloruro de guanidinio probadas. Este proceso mostró que los cambios observados tanto por CD como por fluorescencia resultaron ser completamente superponibles, obteniendo cinéticas similares (Figura 4.2 y Tabla 4.2).

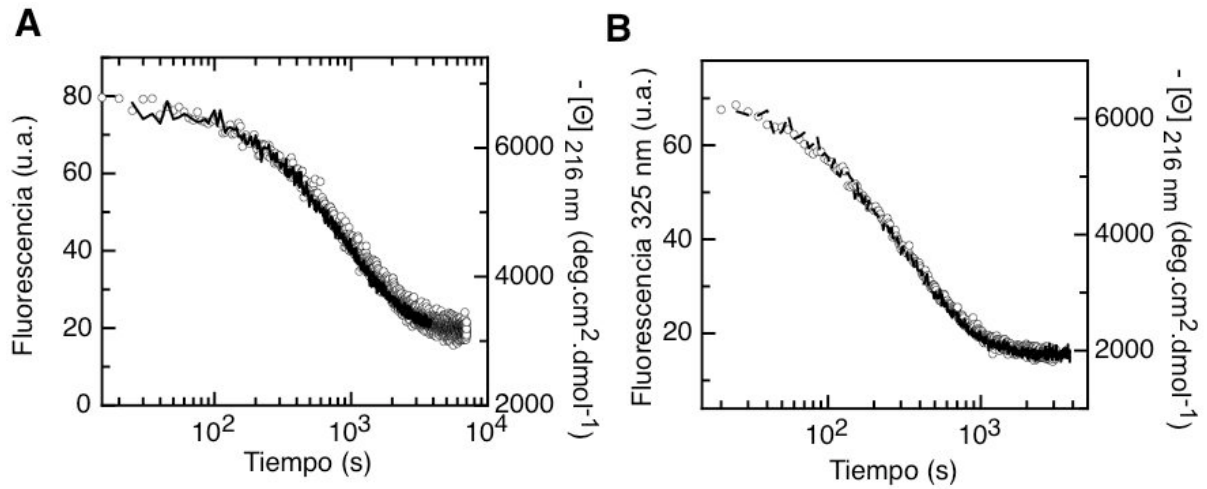


Figura 4.2 Cinéticas de desplegado. Se muestran las cinéticas de desplegado por Fluorescencia (línea continua) y CD (círculos blancos). A) cinéticas realizadas a 4.25 M de Gdm.Cl. B) Cinéticas realizadas a 6.0 M de Gdm.Cl.

De acuerdo al criterio descripto, el análisis de los datos de fluorescencia, mostró que a bajas concentraciones de Gdm.Cl (de 3.75 a 5.0 M) las cinéticas se ajustaron utilizando una función exponencial simple (Figura 4.3, A, Figura suplementaria A3 y Tabla suplementaria A1). A 4.25 M de Gdm.Cl, la constante observada fue de $(1.14 \pm 0.02) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, indicando una vida media de 605 segundos para la reacción de desplegado. A su vez, el valor relativo de amplitud obtenido del ajuste de los datos, correspondió a un 100 % del cambio de señal, indicando que en esta condición se produce el total del desplegamiento y el mismo puede ser explicado por la amplitud del cambio de señal observado. La presencia de una única fase a esta concentración de Gdm.Cl indicó que solo 2 especies están involucradas en el proceso de desplegado. Al incrementar gradualmente la concentración de cloruro de guanidinio, las curvas se ajustaron a una función exponencial doble, indicando la aparición de una especie adicional a partir de 5.25 M de Gdm.Cl (Figura 4.3, B y Tabla 4.2). Cuando estos datos fueron ajustados a una función exponencial simple, las constantes observadas mostraron una dependencia no lineal con la concentración de Gdm.Cl y desviación significativa en los residuales (Figura 4.3 y Figura suplementaria A3). Aún cuando los valores de las constantes observadas (k_1 : $(4.64 \pm 0.85) \times 10^{-3}$ y k_2 : $(2.39 \pm 0.19) \times 10^{-3}$ a 6.0 M de Gdm.Cl) resultan similares, el ajuste utilizando dos exponenciales nos permitió identificar la fase principal de desplegamiento, la cual mostró una clara dependencia lineal con la concentración de Gdm.Cl junto con una fase adicional a concentraciones mayores a 5.0 M de Gdm.Cl (Figura 4.11, detallado más adelante). Las

amplitudes de las fases corresponden al 100% de cambio observado (ver análisis de amplitudes más adelante).

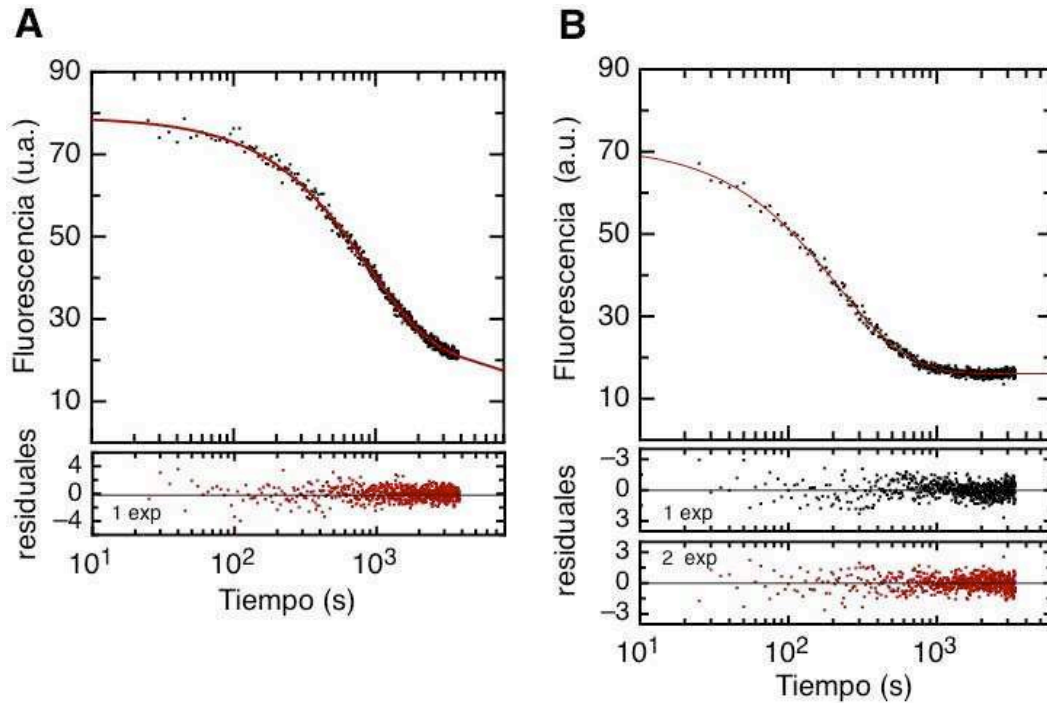


Figura 4.3 Cinética de desplegamiento con Gdm.Cl monitoreado por fluorescencia. Se muestran las cinéticas de desplegamiento, monitoreado por la fluorescencia del triptófano a 325 nm realizadas por mezclado manual. A) Cinética realizada a 4.25M de cloruro de guanidinio. B) Cinética realizada a 6M de Gdm.Cl. Las curvas fueron ajustadas utilizando funciones exponenciales simples y dobles. La línea roja indica el mejor ajuste obtenido, con sus residuales (en rojo) debajo de cada gráfico. Se utilizó una concentración de NS1 de 8 μ M.

El análisis del desplegamiento monitoreado por dicroísmo circular, reveló la presencia de una única fase a concentraciones de cloruro de guanidinio entre 4.0 y 5.0 M. A 5.0 M la amplitud de esta única fase se correspondió con un 100% de amplitud relativa, del cambio de señal. De manera similar a lo observado por fluorescencia, se observó la presencia de dos fases en condiciones de desnaturante por encima de 5.0 M (Figura 4.4, Figura Suplementaria A4). A 6.0M de Gdm.Cl las constantes observadas fueron: k_1 : $(3.98 \pm 0.49) \times 10^{-3}$ y k_2 : $(1.98 \pm 0.21) \times 10^{-3}$, con un valor de amplitud relativa de 52% para k_1 y de 48% para k_2 (ver Tabla Suplementaria A2).

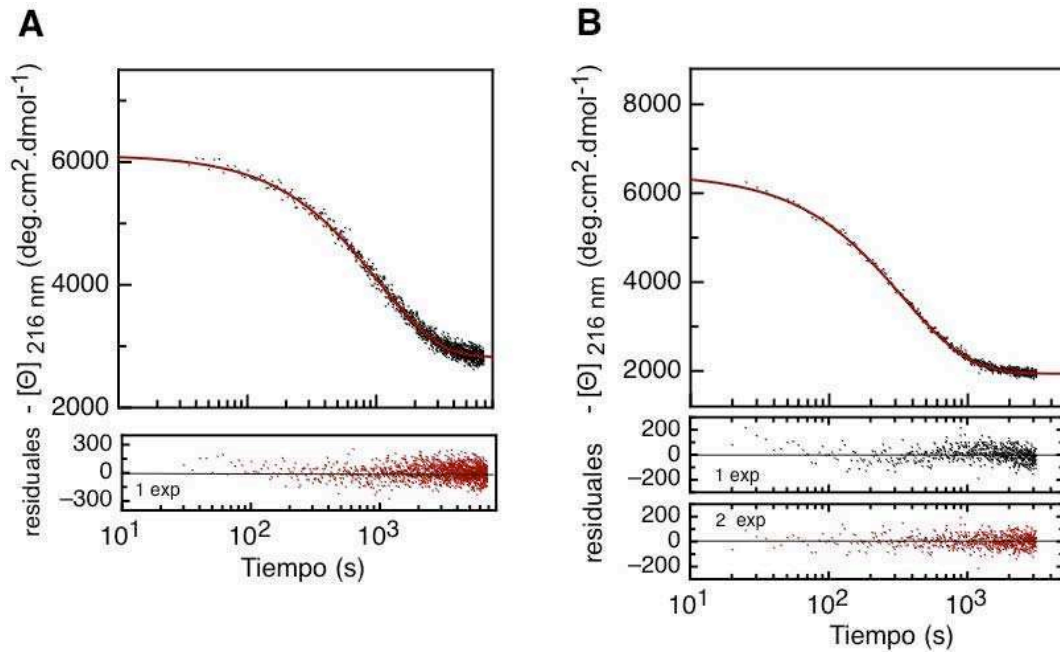


Figura 4.4 Cinética de desplegamiento por Gdm.Cl, monitoreado por dicroísmo circular. A) Cinética de desplegamiento realizada a 4.25M de Gdm.Cl. B) Cinética de desplegamiento realizada a 6M de Gdm.Cl. Las curvas fueron ajustadas utilizando funciones exponenciales simples y dobles. La línea roja indica el mejor ajuste obtenido, con sus residuales (en rojo) debajo de cada gráfico. Se utilizó una concentración de NS1 de 8 μ M.

En la tabla 4.2 se muestran a modo de ejemplo los valores de las constantes observadas a 4.25, 6.0 y 6.75 M de Gdm.Cl por CD y fluorescencia, junto con el valor relativo de sus amplitudes. Se observa que el valor de k_1 muestra una clara dependencia con la concentración de desnaturante (como se muestra más adelante en la Figura 4.11, círculos negros). Por el contrario, el valor de k_2 no mostró variaciones con la concentración de Gdm.Cl, en las condiciones en las que fue calculada.

Tabla 4.2 Constantes obtenidas para el desplegamiento de NS1 a tres [Gdm.Cl]

[Gdm.Cl] (M)	Dicroísmo Circular		Fluorescencia	
	k_1 (s ⁻¹) ^a / A ₁ (%) [*]	k_2 (s ⁻¹) ^a / A ₂ (%) [*]	k_1 (s ⁻¹) ^a / A ₁ (%) [*]	k_2 (s ⁻¹) ^a / A ₂ (%) [*]
4.25	$(9.72 \pm 0.13) \times 10^{-4}$ / 100 %	-	$(1.14 \pm 0.02) \times 10^{-3}$ / 100 %	-
6.00	$(3.98 \pm 0.49) \times 10^{-3}$ / 52 %	$(1.98 \pm 0.21) \times 10^{-3}$ / 48 %	$(4.64 \pm 0.85) \times 10^{-3}$ / 38 %	$(2.39 \pm 0.19) \times 10^{-3}$ / 62 %
6.75	s/d #	s/d #	$(5.35 \pm 0.12) \times 10^{-3}$ / 75 %	$(2.20 \pm 0.32) \times 10^{-3}$ / 25 %

^a Constantes observadas para cada condición de desnaturante, obtenidas del ajuste de los datos.

^{*} Amplitudes relativas para cada una de las fases obtenidas. Estas fueron calculadas teniendo en cuenta los valores basales de NS1 plegada y desplegada.

[#] Sin datos.

Las amplitudes y valores finales junto con los valores iniciales de referencia, obtenidas por el ajuste de los datos de desplegamiento tanto por fluorescencia como por CD, se utilizaron para crear un gráfico de valores iniciales y finales de las distintas señales analizadas (Figura 4.5). Esto es importante, ya que al analizar los valores basales iniciales y finales, podemos determinar si las amplitudes calculadas se corresponden con el total del cambio de señal observado. Entonces, podemos determinar si existen o no procesos rápidos que no sean explicados por las amplitudes resultantes del ajuste de los datos. Los valores iniciales (Figura 4.5, Δ) fueron calculados como la suma de las amplitudes y el valor final obtenidos del ajuste, para cada condición. Se observó que los valores iniciales calculados se corresponden muy bien con los valores basales (en condiciones donde no se produjo desplegamiento, de 0 a 3.0 M de Gdm.Cl). Este análisis mostró que el cambio total de cada señal puede ser descrito completamente por las amplitudes observadas, por lo tanto descartando la presencia de procesos rápidos o “burst phase” del inglés, que ocurren durante el tiempo de mezclado (10 s).

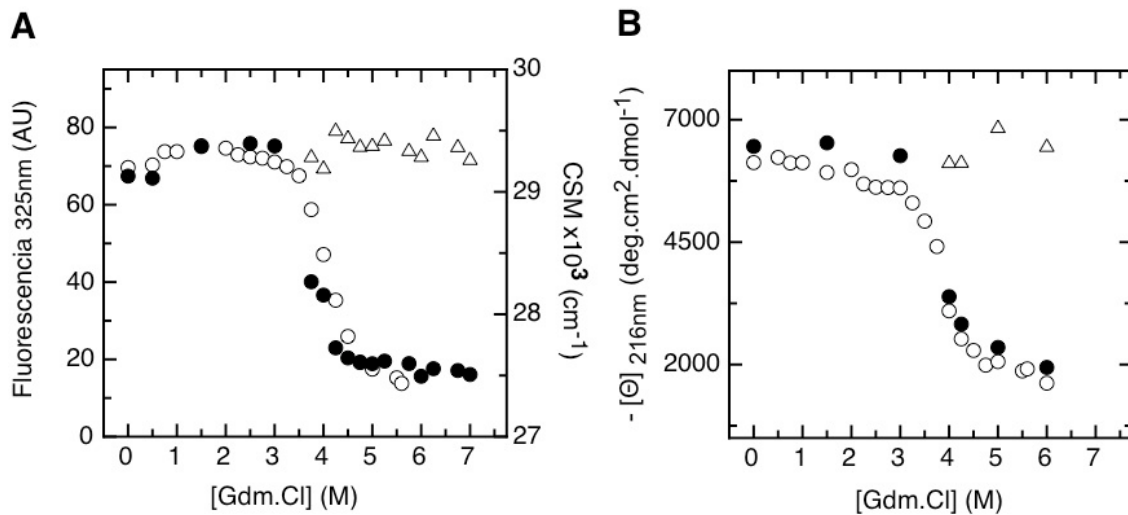


Figura 4.5 Gráfico de amplitudes de las constantes obtenidas por el desplegamiento por CD y fluorescencia. A) Valores iniciales ($t=0$, Δ) y finales ($t= \infty$, \bullet) de las señales de los experimentos cinéticos de desplegamiento monitoreados por fluorescencia (A) o CD (B). En ambos gráficos los valores finales fueron calculados a partir de un ajuste exponencial, mientras que los valores iniciales fueron calculados como la diferencia entre el punto final de cada cinética y la suma de las amplitudes de todas las fases observadas. Se muestra en forma superpuesta los datos del desplegamiento al equilibrio monitoreados por el centro de masa de fluorescencia o por CD en el UV lejano (\circ).

En conjunto, estos datos indican que el desplegamiento de NS1 es un proceso simple, donde a concentraciones de desnaturante entre 3.75 y 5.0 M la reacción de desplegamiento puede ser explicada como un proceso monoexponencial, que implicaría la existencia de una fase, con dos especies involucradas en el proceso (NS1 plegada y NS1 desplegada). A su vez, la totalidad del cambio de señal se corresponde bien con la amplitud obtenida del ajuste de los datos. A

concentraciones superiores a 5.0 M de Gdm.Cl se observa la aparición de una fase adicional y con una constante observada que no depende con la concentración de Gdm.Cl, indicando que esta fase no corresponde a una fase mayoritaria de desplegado.

IV.3 ESTUDIO CINÉTICO DEL PROCESO DE PLEGAMIENTO

IV.3.1 Cinética de plegamiento

El plegamiento de NS1 fue inicialmente investigado a través de experimentos de fluorescencia de su único triptofano por mezclado manual. Para esto, proteína concentrada y desplegada en 5.0 M de Gdm.Cl fue diluída 10 veces en solución de tampón Tris 10 mM pH 8.0 con cantidades variables de cloruro de guanidinio, para cubrir un rango de concentraciones entre 0.5 y 3.5 M. El análisis de los datos mostró que el mejor ajuste fue obtenido utilizando una ecuación con 3 funciones exponenciales. A 1.0 M de concentración final de Gdm.Cl las constantes observadas fueron: $(3.8 \pm 0.2) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, para la fase más rápida; $(8.51 \pm 0.45) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, para la fase intermedia y $(1.88 \pm 0.01) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ para la fase más lenta (Figura 4.6).

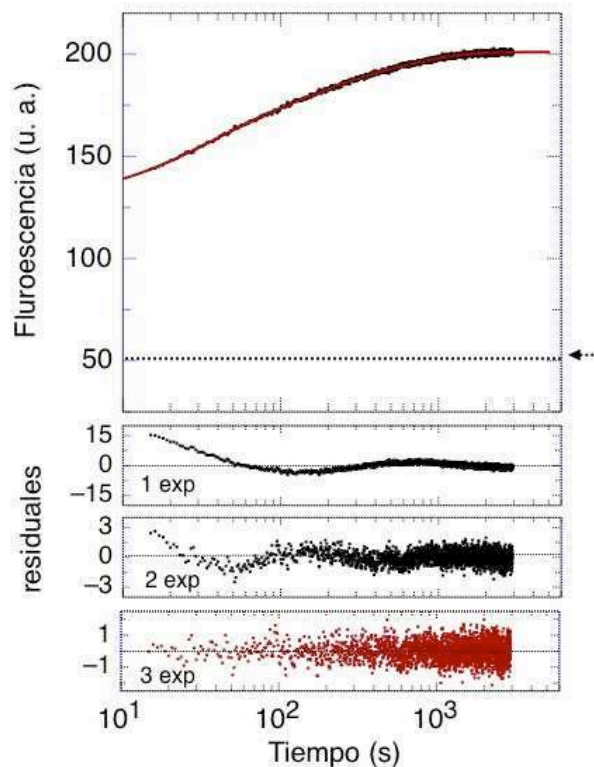


Figura 4.6 Cinética de plegamiento de NS1 por mezclado manual. Se muestra el cambio de fluorescencia de triptofano a una concentración final de Gdm.Cl de 1M. La cinética de plegamiento fue realizada por mezclado manual a una concentración final de NS1 de 8 μM . En la línea punteada indicada con la flecha, se muestra el valor de fluorescencia correspondiente al nivel basal de NS1 desplegado. La curva fue ajustada utilizando ecuaciones con una, dos o tres funciones exponenciales. Se muestra el mejor ajuste en línea roja con sus residuales en rojo debajo de cada gráfico.

Al analizar las amplitudes obtenidas del ajuste, se observó que a bajas concentraciones de desnaturalizante estas amplitudes no explican el cambio total en la señal entre NS1 desplegada y NS1 replegada, indicando que eventos rápidos suceden durante el tiempo de mezclado (10 segundos). Por ej: a 1 M de Gdm.Cl se observaron los valores de amplitud relativa de 21%, 17% y 14% para las fases rápida, intermedia y lenta, respectivamente, con un cambio de señal no explicado por las amplitudes “burst phase” correspondiente a un 48%, y que asciende a un 59% al replegar la proteína a 0.5 M de Gdm.Cl (ver Figura Suplementaria A6).

Dado que a partir de los experimentos de replegado por mezclado manual se evidenció que una parte importante del cambio sucedió durante el tiempo de mezclado, se recurrió a la técnica de flujo detenido o “stopped flow”. Esta es una técnica de mezclado rápido, en donde los reactivos son mezclados rápidamente y el flujo luego es detenido. La reacción se monitorea siguiendo la emisión de fluorescencia del tripofano en función del tiempo, siendo que el tiempo muerto de mezclado se encuentra en el orden de unos pocos milisegundos. Se utilizó una metodología similar a lo explicado por mezclado manual, en donde proteína desplegada en 5.0 M de Gdm.Cl fue rápidamente mezclada en diferentes condiciones de desnaturalizante para cubrir un rango entre 0.5 y 3.5 M de Gdm.Cl (Figura 4.7 y Figura suplementaria A5). El mejor ajuste de las curvas resultó de utilizar una ecuación con 3 funciones exponenciales, como fue el caso para la mayoría de las condiciones ensayadas. A 1.0 M de concentración final de Gdm.Cl las constantes observadas fueron: $1.51 \pm 0.07 \text{ s}^{-1}$ para la fase más rápida; $0.32 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ para la fase intermedia; y $(7.0 \pm 0.3) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ para la fase más lenta (Figura 4.7).

Las amplitudes relativas fueron calculadas para cada ajuste individual teniendo en cuenta sólo el cambio de señal observado en cada caso, dado que no se pudieron medir los niveles basales correspondientes a NS1 plegada y desplegada. Para 1.0 M de Gdm.Cl los valores relativos de amplitudes fueron de 16% para la fase más rápida, 40% para la fase intermedia y 42% para la fase más lenta. Sin embargo, no se pudo determinar si existen eventos rápidos que ocurren en el tiempo muerto de mezclado de esta técnica (15 milisegundos).

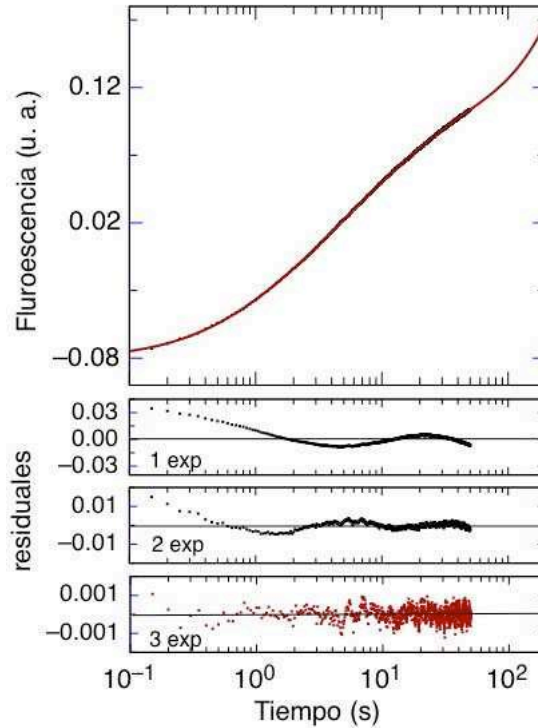


Figura 4.7 Cinética de plegamiento de NS1 por “stopped flow”. Se muestra la cinética de plegamiento monitoreada por “stopped flow”. El experimento fue realizado a una concentración final de Gdm.Cl de 1M. Se registró la fluorescencia del triptofano de NS1 a una concentración final de proteína de 6 μ M. La curva fue ajustada utilizando ecuaciones con una, dos o tres funciones exponenciales. Se muestra el mejor ajuste en línea roja con sus residuales en rojo debajo de cada gráfico.

Si analizamos los resultados obtenidos por mezclado manual junto con los obtenidos por “stopped flow” nos encontramos con que se obtuvieron 3 constantes por cada técnica. Las constantes más rápidas obtenidas por stopped flow fueron denominadas k_1 , k_2 y k_3 (Tabla suplementaria A3); las constantes obtenidas por mezclado manual fueron denominadas k_4 , k_5 y k_6 (Tabla suplementaria A4). A todas las concentraciones ensayadas, la fase más lenta medida por el instrumento de “stopped flow” (k_3) tuvo un valor similar a la constante de velocidad de la fase más rápida medida por mezclado manual (k_4 , Tabla 4.3) . Por este motivo, realizamos un ajuste global de las curvas obtenidas por “stopped flow” y mezclado manual, en donde a la constante observada con valores similares por ambas técnicas se denominó k_{3-4} (ver Figura 4.8 y Tabla 4.3). Basado en este análisis pudimos discriminar 5 fases. La presencia de 5 fases indicó la existencia de al menos 6 especies en el proceso de plegamiento.

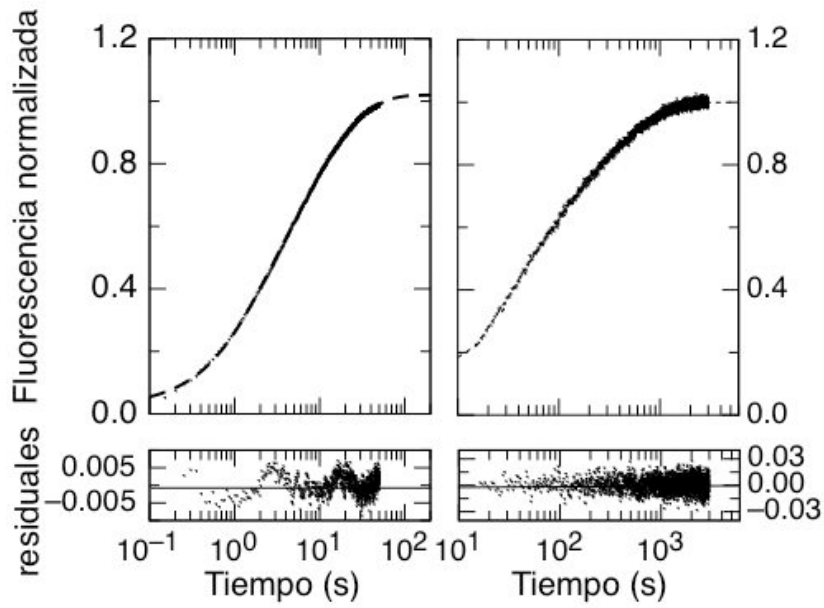


Figura 4.8 Ajuste global de las curvas de replegado. Se muestra el ajuste global del replegado de NS1 a 1.0 M de Gdm.Cl, a partir de las señales normalizadas obtenidas por “stopped-flow” (izquierda) y mezclado manual (derecha). Los residuales obtenidos se muestran debajo de cada gráfico y la línea discontinua representa el ajuste realizado.

Tabla 4.3 Constantes obtenidas para el plegado de NS1 a 1M de Gdm.Cl

	“Stopped Flow”			Mezclado Manual		
	$k_1 \text{ s}^{-1}$	$k_2 \text{ s}^{-1}$	$k_3 \text{ s}^{-1}$	$k_4 \text{ s}^{-1}$	$k_5 \text{ s}^{-1}$	$k_6 \text{ s}^{-1}$
Ajuste individual	1.51 ± 0.07	0.32 ± 0.01	$(7.0 \pm 0.3) \times 10^{-2}$	$(3.8 \pm 0.2) \times 10^{-2}$	$(8.51 \pm 0.45) \times 10^{-3}$	$(1.88 \pm 0.01) \times 10^{-3}$
	$k_1 \text{ s}^{-1}$	$k_2 \text{ s}^{-1}$	$k_{3,4} \text{ s}^{-1}$	$k_5 \text{ s}^{-1}$	$k_6 \text{ s}^{-1}$	
Ajuste Global	$0.75 \pm .03$	$0.16 \pm .01$	$(4.34 \pm 0.23) \times 10^{-2}$	$(9.30 \pm 0.37) \times 10^{-3}$	$(1.90 \pm 0.27) \times 10^{-3}$	

A pesar del hecho que como se describió en los capítulos anteriores, NS1 oligomeriza por efecto inducido por cambios moderados en la temperatura, se observó una muy baja dependencia con la concentración de proteína para las fases de plegamiento descritas (Figura 4.9), indicando que no hay procesos de oligomerización involucrados. Por otro lado, experimentos de cromatografía de exclusión molecular indican que NS1 replegada eluye mayoritariamente como un monómero (no se muestra). Por lo tanto la oligomerización no es producto de un evento paralelo del plegamiento.

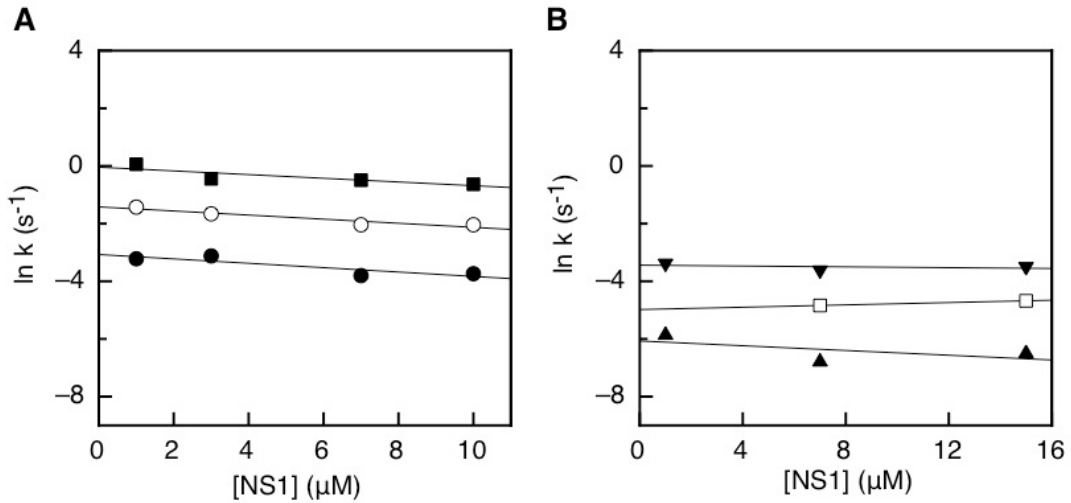


Figura 4.9 Dependencia de las constantes observadas en el repliegado con la concentración de NS1. Se realizaron cinéticas de repliegado a una concentración final de desnaturante de 2.25M a distintas concentraciones de NS1. A) Se evaluó la dependencia de las constantes observadas por “stopped flow” a 1, 3, 7 y 10 μM de NS1. Se muestran: $k1$ (■), $k2$ (○) y $k3$ (●). B) Las constantes observadas por mezclado manual se analizaron utilizando 1, 7 y 15 μM de proteína. Se muestran: $k4$ (▲), $k5$ (□) y $k6$ (▼).

Al analizar el proceso de plegamiento registrando los cambios producidos en la estructura secundaria por dicroísmo circular por mezclado manual a 1.6 M de concentración de cloruro de guanidinio, observamos que el total del cambio en la elipticidad molar a 216 nm se produjo durante el tiempo muerto de mezclado del experimento (dentro de los primeros 10 segundos), indicando que el evento principal de plegamiento, en esta condición, se produjo con una constante de velocidad igual o superior a 0.1 s^{-1} (Figura 4.10).

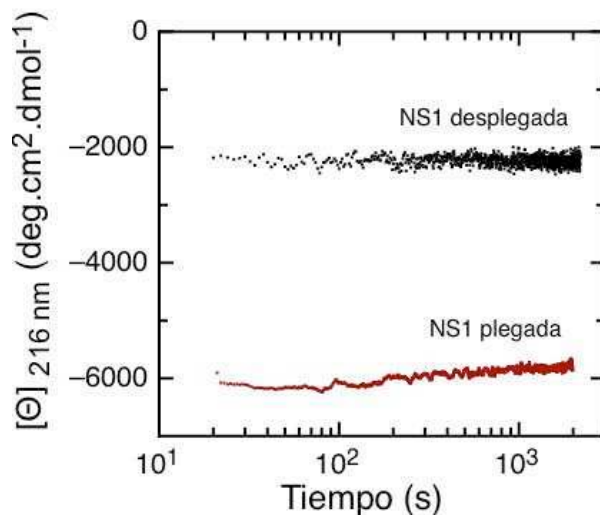


Figura 4.10 Plegamiento de NS1 por dicroísmo circular. Muestra desplegada a 5.0 M de Gdm.Cl fue diluída en tampón acuoso para una concentración final de desnaturante de 1.6M. Se monitoreó la elipticidad a 216 nm. En rojo se muestra la cinética obtenida. La concentración de NS1 utilizada fue de 20 μM . Como referencia, se muestran los valores basales NS1 desplegada a 5.0 M de Gdm.Cl (en negro).

IV.3.2 Gráfico de “Chevron”

A partir de los valores calculados del ajuste de las curvas obtenidas en los experimentos cinéticos de desplegado y plegado se realizó un gráfico de “Chevron”. Este gráfico relaciona la dependencia del logaritmo natural de las constantes observadas con la concentración de cloruro de guanidinio. Su nombre proviene del símbolo del idioma inglés que tiene la forma de V (utilizada en uniformes o banderas), por la semejanza con la curva que se obtiene con proteínas que muestran mecanismos cinéticos de dos estados. Estas proteínas muestran una única fase de plegado y desplegado y dependencias lineales entre el logaritmo de las constantes cinéticas para el plegamiento y el desplegamiento con la concentración de desnaturizante, dando origen a dos ramas (una de plegamiento y otra de desplegamiento, cuyo intersección coincide con el valor medio de la transición observado en experimentos al equilibrio, $[D]_{50}$). La extrapolación a 0 M de desnaturizante de las ramas de plegamiento y desplegamiento permite obtener las constantes cinéticas de plegamiento y desplegamiento en agua (k_f y k_u), respectivamente [81].

Al analizar la rama de desplegado de este gráfico (entre 3.75 y 7.0 M de Gdm.Cl), observamos una dependencia lineal entre el logaritmo de la fase principal de desplegamiento con la concentración de cloruro de guanidinio (Figura 4.11, círculos negros). La segunda fase observada a concentraciones de Gdm.Cl mayores a 5.0 M, mostró muy poca dependencia con la concentración de desnaturizante, indicando que no se corresponde con un proceso principal de desplegamiento de NS1. Como se comentó anteriormente, el análisis de amplitudes mostró que en 100% de cambio de señal puede ser explicado por las amplitudes calculadas, indicando que se está midiendo la totalidad del proceso. Esto pudo ser corroborado tanto por fluorescencia como por dicroísmo circular, donde los valores de las constantes obtenidas por las dos técnicas superponen muy bien (Figura 4.11).

El análisis de la rama de plegamiento de NS1 (parte izquierda del gráfico), reveló un alto grado de complejidad de este proceso con 5 fases a todas las concentraciones de Gdm.Cl y que las fases observadas mostraron muy baja dependencia con la concentración de desnaturizante, sugiriendo que las mismas no representan eventos principales del proceso de plegamiento. En adición a esto, la fase más lenta (cuadrados blancos en Figura 4.11) se observó presente también en la rama de desplegamiento de NS1, donde se corresponde con la segunda fase observada del proceso.

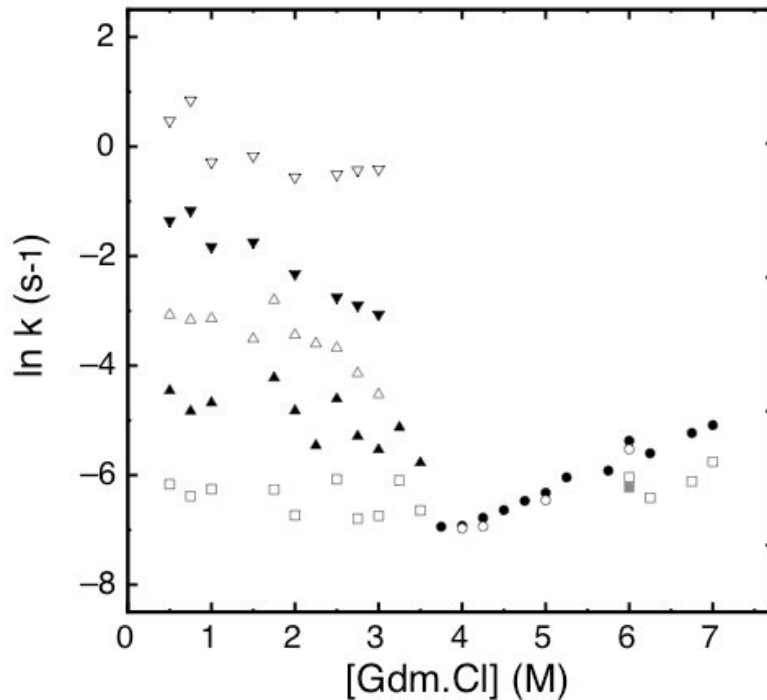


Figura 4.11 Gráfico de Chevrón. Dependencia con la concentración de Gdm.Cl de las constantes observadas para los experimentos de desplegamiento y repliegamiento. Las constantes observadas correspondientes a la fase principal de desplegamiento se representan como círculos negros para los valores obtenidos por fluorescencia y como círculos blancos los valores obtenidos por CD. La fase adicional en el desplegamiento por fluorescencia se representa como cuadrados blancos y la fase adicional observada por CD se representa como cuadrado gris. Las cinco fases observadas en el plegamiento de NS1 obtenidas por el ajuste global de los datos de “stopped flow” y mezclado manual, se muestran en la región izquierda del gráfico entre 0 y 3.5M de Gdm.Cl, de la más rápida a la más lenta: $k1$ (∇), $k2$ (\blacktriangledown), $k3-4$ (\triangle), $k5$ (\blacktriangle) y $k6$ (\square).

Tomando estos datos en conjunto, el gráfico de Chevrón permite concluir que el proceso de desplegamiento es un proceso simple, donde entre 3.75 y 5.0 M de Gdm.Cl el proceso se encuentra explicado por una única fase principal de desplegamiento. A altas concentraciones de Gdm.Cl aparece una fase adicional a la principal, que no muestra dependencia con la concentración de desnaturizante, y que a 6.75 M de Gdm.Cl representa sólo el 25% del cambio total de señal. Contrariamente, el repliegamiento es una reacción compleja limitada por procesos lentos, cuyas constantes mostraron baja dependencia con la concentración de desnaturizante. Los valores en si de estas constantes observadas y/o sumado a que muestran baja dependencia con Gdm.Cl, sugiere que los procesos limitantes en la reacción de plegamiento de NS1 pueden ser debidos a isomerización de una o más de sus cuatro prolinas. Típicamente, estos procesos se producen en el rango de los 0.001 and 0.1 s^{-1} [86]. Habiendo cuatro prolinas en la secuencia de NS1, las chances de que procesos de isomerización limiten la reacción de plegamiento son altas.

Sin embargo, para corroborar estos datos deberá ser necesario realizar experimentos que confirmen esta hipótesis. En adición a esto, observamos que el evento principal de plegamiento, monitoreado por CD en el UV lejano a bajas concentraciones de cloruro de guanidinio mostró una constante con valores iguales o mayores a 0.1 s^{-1} , el cual no fue claramente identificado por los experimentos de replegado por fluorescencia. Por falta de equipamiento que nos permita medir procesos rápidos a una escala de tiempo menor por dicroísmo circular, no se pudo realizar una caracterización de este evento principal de plegamiento. Estas evidencias indican que varios procesos independientes y lentos, posiblemente por isomerización cis/trans de prolinas en el estado desplegado limitan la reacción que lleva a la formación de moléculas nativas de NS1.

IV.3.3 Análisis de los datos de replegado

Como una primera aproximación, podemos considerar que procesos lentos de isomerización en el estado desplegado, llevan a la formación de una única especie competente para el plegamiento. De acuerdo a esta hipótesis podemos asumir un modelo de dos estados para la formación de monómeros de NS1. Este modelo involucra a esta especie desplegada con la conformación correcta de sus prolinas que pliega rápidamente y al estado nativo de la proteína. Con este modelo se pueden obtener las siguientes relaciones para las constantes cinéticas y al equilibrio:



$$K_{eq} = k_f / k_u \quad (4.3)$$

Donde, U y N son los estados desplegado y nativo, respectivamente, K_{eq} es la constante de plegamiento al equilibrio, y k_f y k_u son las constantes cinéticas microscópicas para el plegamiento y desplegamiento, respectivamente [81]. A su vez, a partir de este modelo se puede relacionar el cambio de energía libre (ΔG^{H_2O}) de acuerdo a la siguiente relación:

$$\Delta G_{eq}^{H_2O} = -RT \cdot \ln(K_{eq}) = -RT \cdot \ln\left(\frac{k_f}{k_u}\right) \quad (4.4)$$

De esta forma, la estabilidad puede ser relacionada tanto a partir de experimentos al equilibrio como cinéticos. Idealmente, la concordancia entre los parámetros obtenidos por ambos tipos de experimentos caracteriza a un mecanismo de dos estados. En la figura 4.12 se

muestra esquemáticamente el cambio de energía libre entre el estado desplegado (U) y el estado nativo (N), a lo largo de la coordenada de reacción que pasa por un estado de alta energía que constituye la barrera energética del proceso de plegamiento, que conforma el estado de transición. Este estado de transición, es el estado de mayor energía libre a lo largo de una coordenada de reacción, el cual está conformado en realidad por una colección de moléculas por lo que en general se denomina TSE, de inglés “transition state ensemble”.

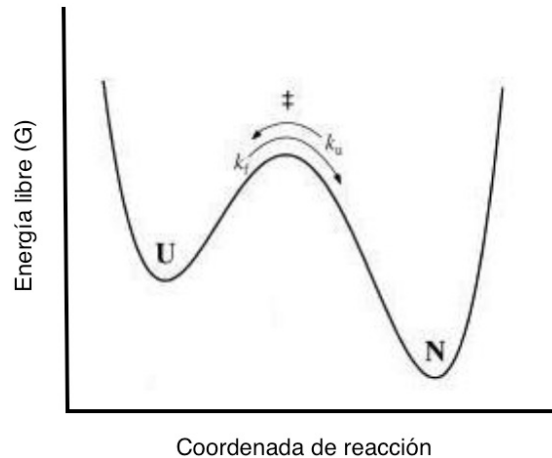


Figura 4.12 Perfil del cambio de energía libre por un mecanismo de dos estados. Se muestran los estados basales de proteína desplegada (U) y plegada (N) separados por la barrera de energía libre con el estado de transición (\ddagger) como el punto en la coordenada de la reacción con el máximo de energía libre. Se muestran las constantes microscópicas k_f y k_u al pasar del estado desplegado al estado nativo o viceversa, a través de la barrera de alta energía.

El valor de K_{eq} para NS1 obtenido del ajuste global de las curvas realizadas al equilibrio fue de 6.48×10^{-8} , el cual fue determinado utilizando la ecuación 4.4. La constante k_u fue calculada a partir del gráfico de Chevron, por extrapolación del valor del \ln de k a 0 M de Gdm.Cl, utilizando un ajuste lineal de los datos de la rama principal de desplegado (Figura 4.13, línea continua), obteniendo un valor de $8.03 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. A partir de k_u y K_{eq} , y utilizando la ecuación 4.4 calculamos la constante de plegamiento en ausencia de desnaturante (k_f), con un valor de 1239 s^{-1} correspondiente a un $T_{1/2}$ de $5.6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (Figura 4.13, línea discontinua) correspondiente a la especie que pliega rápidamente al contener la conformación nativa de sus prolinas. Si tenemos en cuenta que el replegado por CD a 1.6 M de Gdm.Cl mostró producirse rápidamente, en los primeros 10 segundos de mezclado, estos resultados se correlacionan con el valor predicho para la especie competente de plegamiento en esa condición. Entonces, podríamos concluir que existe una especie competente para un plegado rápido, y especies que pliegan lentamente, posiblemente por heterogeneidad cis/trans de prolinas en el estado desplegado.

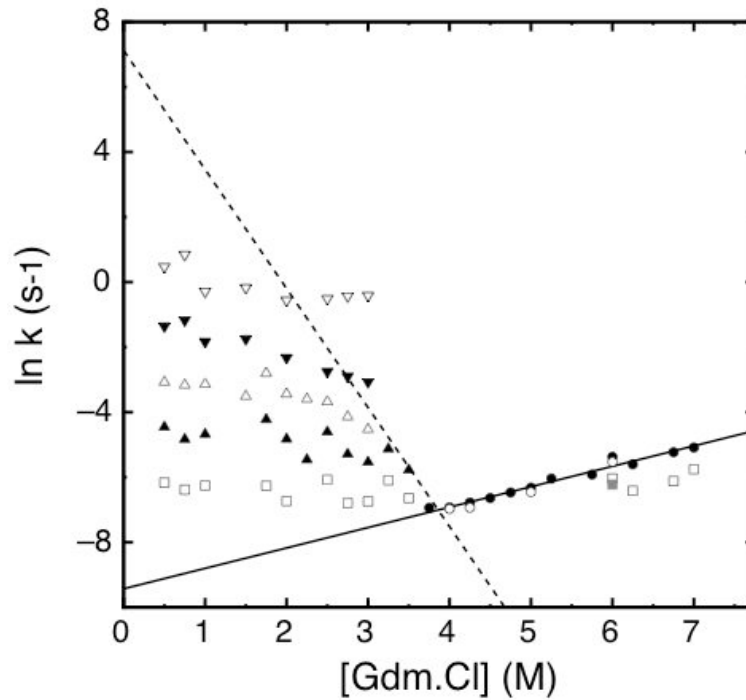


Figura 4.13 Gráfico de Chevron aplicando el modelo de dos estados. La línea continua representa el ajuste lineal de la fase principal de desplegamiento, por el cual se obtuvo el valor de k_u a 0M de Gdm.Cl de $8.03 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ y m_u fue obtenida de la pendiente del gráfico multiplicada por RT ($0.582 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) para el cual se obtuvo un valor de $0.37 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$. La línea discontinua representa el ajuste lineal predicho para la fase principal de plegamiento, asumiendo un modelo de dos estados.

Por otra parte, el parámetro m_{eq} describe la dependencia de la energía libre de desplegado con la concentración de desnaturalizante, estableciendo una relación lineal (ver ecuación 4.5). De manera similar, los parámetros cinéticos m_u^\ddagger y m_f^\ddagger describen la dependencia lineal entre la energía libre de activación para el desplegamiento y plegamiento de una proteína y la concentración de desnaturalizante, asumiendo una relación lineal como se muestra a continuación:

$$\Delta G^\circ = \Delta G^\circ(H_2O) + m_{eq} \cdot [D] \tag{4.5}$$

$$\Delta G_f^{\circ\ddagger} = \Delta G_f^{\circ\ddagger}(H_2O) + m_f \cdot [D] \tag{4.6}$$

$$\Delta G_u^{\circ\ddagger} = \Delta G_u^{\circ\ddagger}(H_2O) + m_u \cdot [D] \tag{4.7}$$

Donde ΔG^{H_2O} indica el valor en ausencia de desnaturalizante y $[D]$ la concentración de desnaturalizante (D). Combinando las ecuaciones 4.5, 4.6 y 4.7, se puede relacionar los

parámetros de energía libre al equilibrio y cinéticos con los valores de m para establecer la siguiente relación:

$$m_{eq} = m_u^\ddagger - m_f^\ddagger \quad (4.9)$$

Como previamente se mostró, se obtuvo un valor para m_{eq} de $2.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$. Este parámetro, ha sido relacionado empíricamente en forma proporcional con cambios en el área accesible al solvente desde el estado nativo al estado desplegado [80]. De modo similar, el parámetro cinético m_u^\ddagger refleja cambios en el área accesible al solvente entre el estado nativo y el TSE [81], mientras que m_f^\ddagger refleja cambios en el área accesible al solvente partiendo del estado desplegado hacia el estado de transición. El valor de m_u^\ddagger fue calculado a partir de la pendiente del ajuste de la fase principal de desplegado, obteniendo un valor de $0.37 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$. Siguiendo el modelo de dos estados y utilizando la ecuación 4.9 calculamos la pendiente de la rama de plegamiento de la especie que pliega rápidamente (m_f^\ddagger), obteniendo un valor de $2.13 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$.

Con el fin de obtener información en relación al grado de ocultamiento de áreas accesibles al solvente en el TSE, definimos un parámetro α . Este parámetro de modo similar a estudios de plegado de proteínas permite disectar, para una perturbación dada, su contribución relativa a la formación del estado de transición en el estudio de las relaciones de energía libre entre constantes cinéticas y de equilibrio [82]. Se utilizó la siguiente ecuación:

$$\alpha = -m_f^\ddagger / m_{eq} \quad (4.10)$$

Este parámetro relaciona los valores de m cinéticos y de equilibrio, y puede ser interpretado como el valor relativo de superficie accesible al solvente que se oculta en la reacción que parte desde el estado desplegado al estado de transición. En el caso más simple, este parámetro toma valores entre 1 y 0, donde 1 indica un ocultamiento relativo de la superficie accesible al solvente en el estado de transición similar al del estado nativo, y 0 indica accesibilidad al solvente en el estado de transición similar al estado desplegado. Utilizando los datos obtenidos para NS1, obtuvimos un valor de α de 0.85, lo cual indica un alto porcentaje de ocultamiento de superficie accesible al solvente en el estado de transición de plegado, con respecto a la especie desplegada competente para el plegamiento, la cual contiene a los enlaces entre sus prolinas y X aminoácido precedente, en su conformación correcta. Estos resultados

sugieren que el TSE tiene un grado de accesibilidad al solvente similar a NS1 en su conformación nativa.

IV.4 DISCUSIÓN

Al analizar el plegamiento de NS1 a través de su desnaturalización química con cloruro de guanidinio realizada al equilibrio, se observa que el proceso es completamente reversible con una clara transición cooperativa entre dos estados (Nativo \rightarrow Desplegado). Esto nos permitió realizar un ajuste global de los datos obtenidos a un modelo de dos estados al equilibrio, dado que las señales que reportan cambios en la estructura secundaria y terciaria de la molécula mostraron producirse en forma concomitante, ser superponibles, no observarse intermediarios y ser el proceso reversible.

Estudios previos en la literatura muestran que para un grupo de proteínas globulares modelo de diferente tamaño se obtuvo un valor promedio del cambio de energía libre de desplegado en agua por número de residuo ($\Delta G^\circ/R$) de $0.075 \pm 0.037 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{res}^{-1}$, donde R es el número de residuos, observando ausencia de correlación entre el tamaño de las proteínas con su estabilidad normalizada [83]. Para NS1 el valor obtenido es de $0.069 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{res}^{-1}$, el cual se encuentra dentro del rango mencionado, indicando un valor de estabilidad promedio por residuo. Por otro lado, el parámetro m ha sido empíricamente relacionado con cambios en el área accesible expuesta al solvente (ΔASA) luego de la transición entre el estado nativo y el estado desplegado [80]. Para proteínas globulares, este valor se relaciona con el número de residuos de la proteína. NS1 presenta un comportamiento globular por cromatografía de exclusión molecular como fue indicado en el capítulo III. Calculamos para NS1, un valor ΔASA que según la relación lineal antes mencionada, se corresponde con 90 residuos aminoácidos, en lugar de los 139 esperados para NS1. Esto puede deberse a dos posibilidades: por un lado que la proteína contenga regiones parcialmente plegadas con mayor exposición al solvente en la conformación nativa, o por otro lado que no se llegue a un desplegado completo luego de la transición en las concentraciones de Gdm.Cl probadas. Sin embargo, de acuerdo al análisis de las curvas de desplegado con cloruro de guanidinio, NS1 se despliega completamente con valores superiores a 4.0 M, como lo indica la exposición al solvente de su triptofano y la pérdida completa de estructura secundaria a esos valores de desnaturalizante. Por lo tanto, estos resultados sugieren que en su conformación nativa, NS1 contiene regiones parcialmente plegadas, accesibles al solvente. Estas regiones corresponden aproximadamente a un tercio de la molécula, lo que coincide con los resultados obtenidos por RMN mostrados en el Capítulo III, donde observamos

que el mismo porcentaje de la molécula presenta intercambio conformacional lento y relativa flexibilidad, indicando la presencia de regiones menos compactas dentro de la proteína.

A través del estudio cinético, encontramos que el proceso de desplegamiento es simple y puede ser mayoritariamente explicado por una única fase. Por el contrario la reacción de plegamiento es compleja e involucra múltiples fases.

El desplegamiento de NS1 seguido tanto por CD como por fluorescencia muestra una única fase a concentraciones bajas de desnaturizante y dos fases a concentraciones de Gdm.Cl superiores a 5.0 M. Sin embargo, se observa una fase principal de desplegamiento que muestra una dependencia lineal con la concentración de cloruro de guanidinio, y las cinéticas monitoreadas por CD mostraron superponerse muy bien con las monitoreadas por fluorescencia. La constante de desplegamiento estimada en ausencia de Gdm.Cl es lenta, $k_u = 8.03 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, correspondiente a una $t_{1/2}$ de 2.4 horas, señalando una alta vida media del estado plegado. La segunda fase, de menor amplitud, se corresponde con un proceso que no muestra dependencia con la concentración de Gdm.Cl, lo cual sugiere que no corresponde a una fase de desplegamiento. Podemos afirmar que el desplegamiento es explicado principalmente por una fase mayoritaria.

En notable contraste con la cinética de desplegamiento, el replegado de NS1 resultó ser complejo, con la presencia de 5 fases en las condiciones experimentales utilizadas. Estas fases mostraron baja dependencia con la concentración de cloruro de guanidinio, lo cual sugiere que no representan eventos principales de plegamiento. En adición a esto, la presencia de múltiples fases evidencia la presencia de intermediarios en el proceso de plegamiento [84,85]. En ocasiones, estos intermediarios cinéticos son resultado de procesos que limitan cinéticamente la reacción de plegamiento, como ser la isomerización de prolinas [84,86,87], la formación de intermediarios parcialmente plegados [88], o menos frecuentemente debido a la isomerización de enlaces peptídicos que no involucran prolinas [89]. Los valores de las constantes asociados a procesos de isomerización de prolinas varían en el rango de 0.001 y 0.1 s^{-1} , lo cual es compatible con las fases medidas. Dado que NS1 contiene 4 prolinas, una hipótesis plausible es que las múltiples fases que limitan la reacción de plegamiento podrían ser reflejo de heterogeneidad cis/trans de estos residuos en el estado desplegado. Sorprendentemente, a pesar del hecho de que NS1 es capaz de oligomerizar casi espontáneamente, ninguna de las fases observadas en el replegado mostró dependencia con la concentración de proteína, lo cual indica que: 1) la ruta de oligomerización no ocurre desde el estado desplegado; 2) los intermediarios observados representan especies monoméricas.

En base a estos hallazgos proponemos un modelo mínimo para el mecanismo de plegamiento de NS1 (Figura 4.14), donde la formación de una especie desplegada competente

de plegamiento: U_F (la cual contiene todas sus prolina en su conformación nativa), es limitada por el lento equilibrio entre múltiples especies desplegadas de NS1 con una o más de sus prolina en una conformación no nativa ($U_{n(S)}$). La especie U_F , una vez formada es capaz de plegarse rápidamente para dar origen a monómeros nativos.

Asumiendo una transición de dos estados, entre la especie U_F y NS1 nativa, y basados en los estudios realizados al equilibrio, calculamos una constante de plegamiento para la especie U_F en ausencia de Gdm.Cl de 1239 s^{-1} .

Por otra parte, el análisis de los parámetros m_f^\ddagger y m_u^\ddagger permitió caracterizar los cambios en la accesibilidad al solvente que ocurren en la reacción de plegamiento. Este análisis indica que las especies presentes en el estado de transición de plegado entre U_F y NS1 nativa tienen una exposición al solvente similar al estado nativo, con un valor del parámetro alfa de 0.85. Esto sugiere que un alto porcentaje del área accesible al solvente se encuentra oculta en el TSE, indicando que gran parte del plegamiento ocurrió antes.

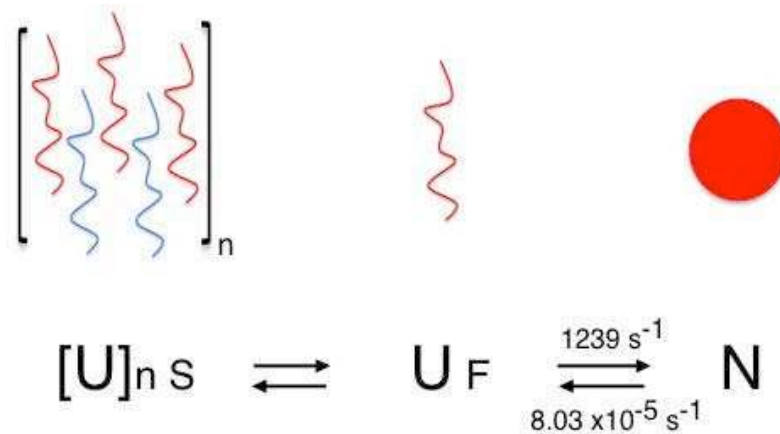


Figura 4.14 Modelo mínimo para el plegamiento de NS1. Se presenta de manera esquemática el modelo propuesto para el plegamiento de la proteína donde $[U]_{n S}$, en azul en el esquema) representa especies desplegadas con conformación no nativa de isómeros de sus prolina, U_F representa polipéptidos desplegados con conformación nativa de sus prolina (en rojo en el esquema) y N es el estado nativo de NS1. Las constantes obtenidas (k_f y k_u) se indican en el esquema.

CAPÍTULO V

MECANISMO DE ENSAMBLADO DE NS1SOs

En el capítulo III se describió una alta tendencia que tiene el monómero de NS1 hacia la formación de oligómeros de alto peso molecular los cuales contienen una estructura secundaria rica en láminas beta. En particular, un incremento moderado de temperatura acelera la formación de estas especies lo que indicaría que esta especie oligomérica podría encontrarse en células infectadas. En este sentido, se ha descrito la presencia de homo- y hetero-oligómeros de NS1 en células transfectadas, describiendo actividad degradativa para un hetero-oligómero al que se denominó “NS Degradosome” por estar aparentemente conformado por ambas proteínas no estructurales (NS1 y NS2) y muchos de los blancos descritos para NS1. Estos resultados indican un nexo entre NS1SOs y los oligómeros encontrados en células. Por otro lado, estructuras oligoméricas en relación a proteínas virales han sido ampliamente descritas, muchas de las cuales presentan cualidades “tipo” amiloides .

En base a estos antecedentes nos propusimos caracterizar en mayor detalle a la especie oligomérica y determinar su mecanismo de formación.

OBJETIVO 4: Estudio de conformación y análisis cinético del mecanismo de formación de NS1SOs.

Nos propusimos estudiar la estructura de NS1SOs en cuanto a forma y tamaño. Dado que observamos que esta estructura es rica en láminas beta, analizamos su potencial unión a Tioflavina T y Rojo Congo, típico de estructuras ricas en láminas beta repetitivas o “tipo” amiloide. A su vez, nos propusimos realizar un estudio cinético del mecanismo de oligomerización. Los objetivos específicos de este capítulo fueron:

- Estudiar la conformación de NS1SOs en cuanto a forma y tamaño por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) y sus propiedades de unión a diferentes fluoróforos.
- Investigar la estabilidad de NS1SOs
- Realizar un estudio cinético de la formación de NS1SOs.
- Determinar el mecanismo de auto-ensamblado.

V.1 PROPIEDADES CONFORMACIONALES DE NS1SOs

V.1.1 Morfología de los oligómeros obtenidos por tratamiento térmico

Como se explicó anteriormente, utilizamos como modelo aquellos NS1SOs formados a partir del aumento moderado de la temperatura. Con el fin de obtener una primera aproximación a su caracterización física, analizamos su forma y tamaño por Microscopía de Fuerza Atómica. Por esta técnica se puede obtener información en relación a la topografía de una molécula a través del análisis de las fuerzas resultantes del barrido en tres dimensiones que se realiza utilizando una punta, sobre una superficie a la que se ha adherido la muestra. La punta va acoplada a una palanca microscópica. La flexión de la palanca, por el movimiento de la punta es medida por un láser que se refleja en la parte posterior de la palanca para luego alcanzar un fotodetector. Como resultado, se puede reconstruir una imagen en 3 dimensiones en el orden de nanómetros.

Observamos que estas partículas son esféricas, con un valor promedio de diámetro de $20,6 \pm 2,5$ nm (Figura 5.1). Estos resultados fueron obtenidos utilizando una concentración de NS1SOs de 5ng/ μ l en tampón Tris-HCl 10 mM pH 8, DTT 1 mM con el agregado de $MgCl_2$ 4mM (ver Materiales y Métodos). En las condiciones probadas no observamos la presencia de estructuras fibrilares.

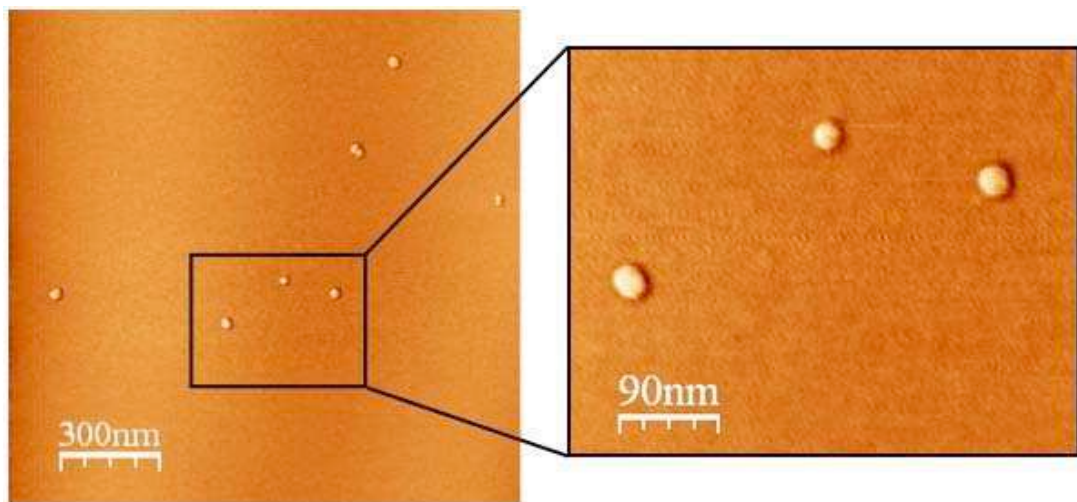


Figura 5.1 Microscopía de Fuerza Atómica. NS1SOs a una concentración 5ng/ μ l fueron adheridos a una mica regenerada. Se indica la escala en el borde inferior izquierdo de cada imagen.

V.1.2 Unión a Tioflavina T, Rojo Congo y ANS de NS1SOs

Dado que observamos que esta especie es estable a altas temperaturas y su estructura secundaria es rica en láminas beta (ver Capítulo III) decidimos ensayar la unión de NS1SOs a los fluoróforos Tioflavina T (ThT) y del ácido 1-anilino, 8-naftalensulfónico (ANS) así como del colorante Rojo Congo (RC). Se ha descrito que la unión de proteínas a ThT y RC es indicador de especies ricas en láminas beta repetitivas en su estructura secundaria, las cuales incluyen un grupo amplio de estructuras “tipo” amiloides, como los que se encuentra en los amiloides (sean solubles o insolubles), y por eso nos referimos como “tipo”. La unión a ANS es un indicador de exposición de superficies hidrofóbicas al solvente, lo que puede ser monitoreado por un aumento en su emisión de fluorescencia.

Al tratar los oligómeros con estos colorantes, observamos un incremento en la fluorescencia de ThT y un típico desplazamiento del espectro de absorbancia de RC hacia longitudes de onda mayores (Figura 5.2, A y B). Esto indica la presencia de una estructura secundaria rica en láminas beta repetitivas, por lo que NS1SOs comparte propiedades de estructuras “tipo-amiloide”. Además observamos un incremento en la fluorescencia del ANS, tanto para el monómero y mucho mayor para el oligómero. Esto es indicativo de accesibilidad del solvente a estructuras hidrofóbicas en ambas conformaciones y la presencia de estructuras menos compactas (Figura 5.2, C).

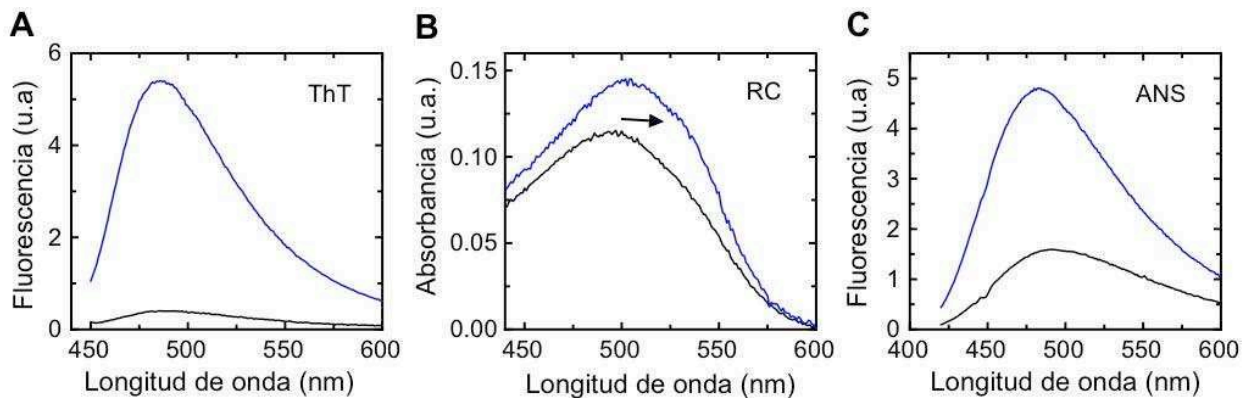


Figura 5.2 Unión a ThT, RC y ANS de NS1SOs. Se muestran los espectros de fluorescencia de ThT y ANS y el espectro de absorbancia de Rojo Congo de muestras conteniendo NS1 monomérica sin calentar (línea negra) y luego de ser calentada a 70 °C por 10 minutos y enfriada (línea azul).

V.2 ESTABILIDAD DE NS1SOs

NS1SOs mostraron ser especies estables a diferentes temperaturas, incluso a los 80 °C y diferentes condiciones de pH (ver capítulo III). Con el fin de determinar la estabilidad química

de NS1SOs, llevamos a cabo un enfoque experimental similar al realizado con NS1 nativa. Para ello incubamos a 20 °C NS1SOs por 4 horas a diferentes concentraciones de Gdm.Cl y luego monitoreamos los cambios producidos en su estructura secundaria por dicroísmo circular, terciaria monitoreando el centro de masa de su triptófano y cuaternaria evaluando el perfil de elusión por cromatografía de exclusión molecular (Figuras 5.3 y 5.4).

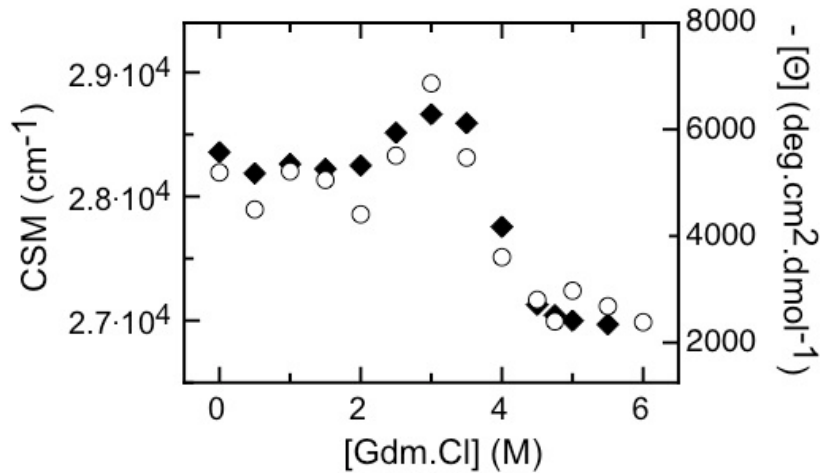


Figura 5.3 Desnaturalización inducida por cloruro de guanidinio de NS1SOs al equilibrio. El eje de la izquierda representa el centro de masa del espectro de fluorescencia del triptófano (rombos negros). El eje de la derecha representa la elipticidad molar a 215 nm (círculos blancos), notar que la escala se encuentra invertida.

Observamos la presencia de dos transiciones tanto por dicroísmo circular como por fluorescencia. La primera transición involucró un incremento en el valor del centro de masa del triptófano, con una ligera ganancia de elipticidad negativa a 215 nm, a partir de 3.0 M de Gdm.Cl (Figura 5.3). La segunda transición mostró cambios que indican el completo desplegamiento de las moléculas. Si superponemos el CSM de la segunda transición de NS1SOs y la transición observada para NS1 monomérica, observamos que estas se superponen (Figura 5.4 A, inserto), lo que sugiere que la misma correspondería al desplegamiento de monómeros disociados. Para corroborar esto, llevamos a cabo un experimento de filtración en gel por tamiz molecular. Equilibramos una columna S-75 con solución del tampón Tris a pH 8.0 con 3.0 M de Gdm.Cl de concentración final y realizamos la corrida de una muestra de NS1SOs previamente incubada por 4 horas en la misma solución (Figura 5.4, B). Observamos que, a esta concentración de cloruro de guanidinio, las especies presentes son principalmente monoméricas. Como controles se utilizó a NS1 monomérica en la misma solución con 3M de Gdm.Cl, y en otra sin cloruro de guanidinio junto con NS1SOs, de los cuales se obtuvieron los perfiles de elución esperados.

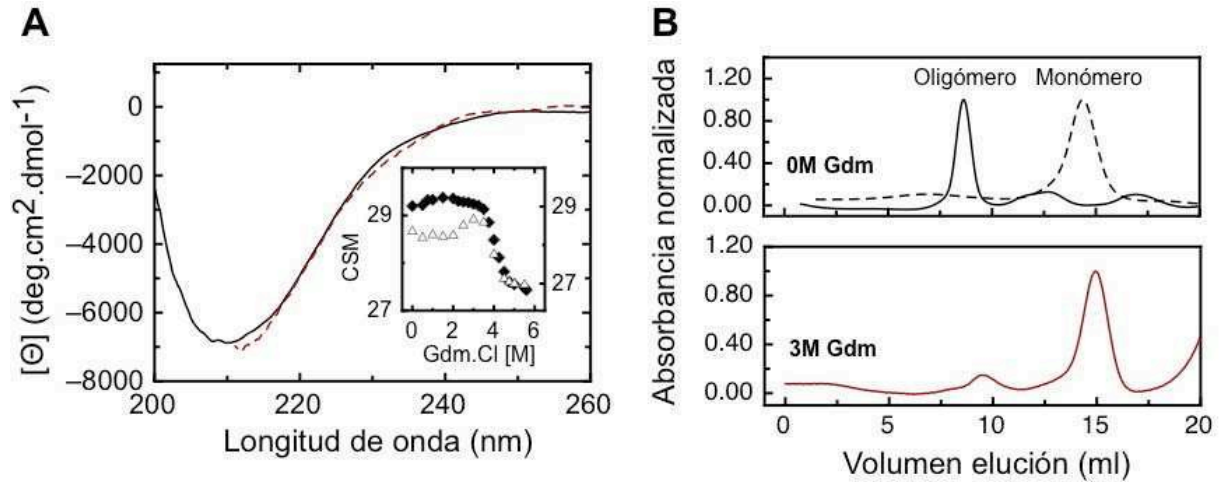


Figura 5.4 Estructura secundaria y cuaternaria del intermediario de desplegado de NS1SOs. A) Espectro de CD en el UV lejano de NS1 nativa (línea continua) y del intermediario de NS1SOs a 3M de Gdm.Cl (línea punteada). En el inserto se muestran las curvas de desplegamiento de NS1 monomérica (rombos negros) superpuesta con la curva de NS1SOs (triángulos blancos). B) Cromatografía de exclusión molecular S-75 de NS1SOs (línea continua), NS1SOs a 3M de Gdm.Cl (línea continua roja) y NS1 monomérica (línea punteada), ver Materiales y Métodos. Cada conformero fue incubado a 0 y 3M de Gdm.Cl por 2 h. El volumen de exclusión de la columna se encuentra a los 8.8 ml y el volumen de elución esperado para NS1 es de 14.5 ml, según calibración realizada con estándares globulares de peso molecular.

Estos datos en conjunto indican que NS1SOs, por efecto inducido por el cloruro de guanidinio, sufre primero una disociación a partículas monoméricas que luego se despliegan siguiendo un comportamiento similar a monómeros nativos. Si superponemos el espectro de CD en el UV lejano de NS1SOs a 3M de Gdm.Cl con el del monómero nativo observamos que se superponen muy bien indicando que son especies similares (Figura 5.4, A). Es importante destacar que existe un cambio conformacional en las partículas disociadas. Esto quiere decir que la conformación del monómero en NS1SOs es diferente al monómero nativo. El hecho de que sean necesarias cantidades significativas de cloruro de guanidinio para disociar a NS1SOs, indica que se debe superar una barrera de alta energía, señalando la estabilidad de esta especie. Cabe recalcar que al evaluar la reversibilidad del proceso, el repliegado lleva a la formación de monómeros nativos (al igual que NS1 nativa, ver capítulo IV), no observando estructuras oligoméricas por repliegado.

V.3 ANÁLISIS CINÉTICO DEL ENSAMBLADO DE NS1SOs

Con el fin de investigar las diferentes etapas involucradas en el mecanismo de oligomerización, realizamos un estudio cinético utilizando diferentes sondas como la fluorescencia de Tioflavina T y dispersión de luz dinámica (DLS), para monitorear cambios en

la estructura cuaternaria de NS1 por un lado, y Dicroísmo Circular en el UV lejano, para monitorear cambios en su estructura secundaria, por el otro.

El monómero de NS1 es estable a 20 °C, mientras que cuando es transferida a temperaturas por arriba de 40 °C se induce la formación de NS1SOs. De esta forma, el proceso de ensamblado fue estudiado mediante experimentos de “salto” de temperatura (ver Materiales y Métodos). En un primer experimento, transferimos NS1 incubada a 4 °C a una cubeta con solución de tampón químico Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y DTT 1 mM, equilibrada a 47 °C. Monitoreamos el proceso de oligomerización siguiendo el incremento de la fluorescencia de ThT en el tiempo (Figura 5.5, línea punteada). El proceso mostró ser multi-exponencial, donde distinguimos al menos 3 fases: una *fase de retardo* o “lag”, una *fase exponencial* y una *fase estacionaria*. En paralelo, se realizó en mismo experimento pero se monitoreó la señal de CD en el UV lejano a 220 nm (Figura 5.5, en puntos rojos). Interessantemente, observamos que los cambios en la estructura secundaria que llevan a la formación de NS1SOs preceden a los cambios en la estructura cuaternaria, monitoreados por el incremento en la fluorescencia de ThT. Esto es indicativo de la presencia de especies intermediarias en el proceso. Es esperable que este proceso sea complejo, por lo que se requiere discriminar entre cada etapa.

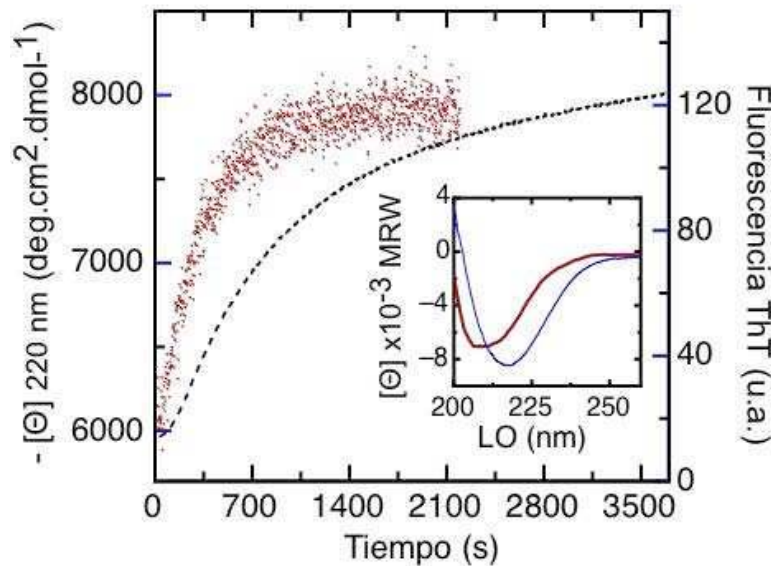


Figura 5.5 Cinética de formación de NS1SOs. Se muestra la cinética de oligomerización seguida por CD en el UV lejano a 220 nm (puntos rojos) y por fluorescencia de Th a 490 nm (línea punteada). Se utilizó una concentración de NS1 de 12 μM. En el recuadro se muestra el espectro de CD en el UV lejano de la especie inicial (línea roja) y final (línea azul).

Con el fin de corroborar que el incremento de fluorescencia de ThT se correlaciona con los cambios observados en la estructura cuaternaria de NS1 y para analizar la evolución del tamaño en la formación de NS1SOs, realizamos el mismo experimento de salto de temperatura

monitoreando el tamaño del diámetro de las partículas por DLS (Figura 5.6, círculos blancos). Realizamos este experimento a 40 °C, para que la reacción sea más lenta. En forma paralela, se monitoreó el incremento de fluorescencia de ThT en estas condiciones (Figura 5.6, línea negra).

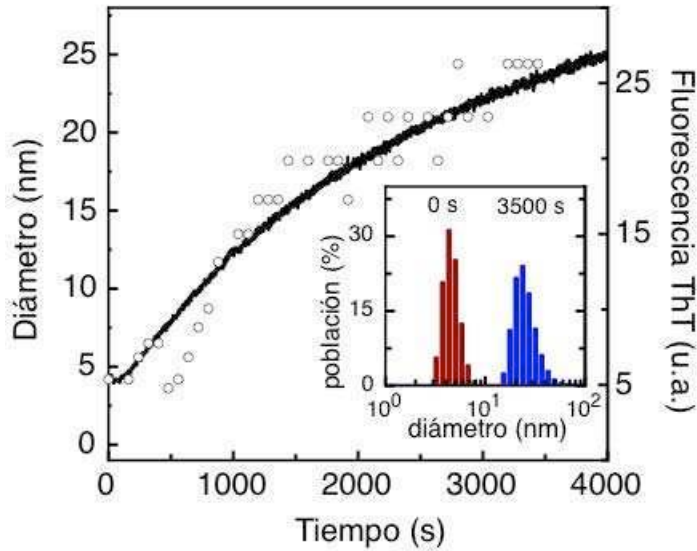


Figura 5.6 Formación de NS1SOs por DLS. Se muestran los cambios en el tamaño del diámetro de partículas medido por DLS (círculos blancos) y la intensidad de fluorescencia de ThT (línea negra). El recuadro muestra la distribución del tamaño de partículas al inicio y final del experimento. Se utilizó una concentración de NS1 a 17 μ M.

En este experimento, observamos que las especies iniciales mostraron un diámetro de 4.2 nm y de 24.4 nm para las especies observadas al finalizar la cinética (Figura 5.6). El valor observado al finalizar la cinética por DLS se encuentra en excelente concordancia con los valores observados por AFM. El proceso de oligomerización por esta técnica muestra buena superposición con los cambios de fluorescencia de ThT, indicando cinéticas similares (Figura 5.6). Esto nos permitió utilizar al incremento de fluorescencia de ThT como sonda de estructura cuaternaria. Por otro lado, dado la gran dispersión entre los valores de tamaño de partículas al inicio del proceso es difícil determinar por esta técnica el tamaño de partículas correspondientes a la fase de retardo. En base a su naturaleza globular, se puede realizar una estimación de su tamaño, a partir de una relación lineal realizada por la calibración con proteínas globulares [94], donde el diámetro de la especie oligomérica en fase estacionaria (32.7 nm, ver capítulo III) corresponde a especies de 2.3 MDa, lo cual representa 149 subunidades de monómeros de NS1 por molécula de oligómero.

V.4.1 MECANISMO DE OLIGOMERIZACIÓN DE NS1SOs

Se han descrito numerosos modelos en relación al mecanismo de formación de estructuras oligoméricas. Muchos de ellos indican que el proceso de oligomerización es dependiente de la formación de un núcleo [90,91,92]. Este núcleo (el cual se correlaciona con la *fase de retardo* de cinéticas de oligomerización), puede ser considerado como oligómeros de tamaño intermedio (en relación a la especie final) o como la mínima unidad competente de ensamblaje. Este último caso es considerado por modelos simples, desarrollados por Adam Zlotnick para el estudio de la formación de cápsides o cualquier otro polímero esférico [93]. Este autor propuso dos modelos para interpretar el proceso de ensamblado: un modelo de ensamblado de equilibrio (EQ) y un modelo de ensamblado limitado cinéticamente (KL). A continuación se resumen brevemente las características de cada modelo. El modelo EQ: 1) no requiere nucleación, 2) es susceptible a trampas cinéticas, debido a procesos de iniciación de ensamblado paralelos múltiples y 3) la estabilidad de la especie final debe ser baja. El modelo KL: 1) requiere de nucleación, 2) es un modelo robusto a trampas cinéticas, 3) no tiene restricciones en cuanto a la estabilidad de la especie final. Debido a que no se observaron trampas cinéticas al variar la concentración de proteína y como la especie final es muy estable, se eligió el modelo limitado cinéticamente.

V.4.2 Estudios de dependencia de concentración

Para la aplicación de este modelo realizamos el mismo experimento de salto de temperatura y analizamos los cambios en la señal de CD en el UV lejano y en la fluorescencia de ThT en el tiempo, a diferentes concentraciones de NS1 en el rango de 2.5 a 10 μM . Basándonos en los resultados presentados en el capítulo III (ver figura 3.5, C), elegimos realizar este experimento a 47 °C (Figura 5.7, A-B). A su vez, realizamos el mismo experimento a 55 °C para evaluar si al aumentar la temperatura y por lo tanto la velocidad del proceso, las cinéticas son similares y es posible identificar el paso limitante de la reacción (Figura 5.7, C-D).

A 47 °C observamos una dependencia moderada de concentración de proteína de los cambios en la estructura secundaria monitoreados por dicroísmo circular (Figura 5.7, A). No se observa una forma sigmoide de la curva, en comparación con el cambio de fluorescencia de ThT. Uno esperaría que el cambio de estructura secundaria constituya el paso limitante en el proceso de oligomerización. Para identificar esta etapa, intentamos ajustar las curvas de CD a una ecuación con dos funciones exponenciales, en donde la constante de velocidad de la fase correspondiente al cambio conformacional no debe mostrar variaciones con la concentración de

proteína. Sin embargo, debido al ruido de la señal no se pudieron obtener ajustes con valores de constantes y errores razonables. Como estimación de este paso, calculamos un valor de vida media de 226 segundos a 10 μM , a partir del ajuste de la curva de CD utilizando una función exponencial simple.

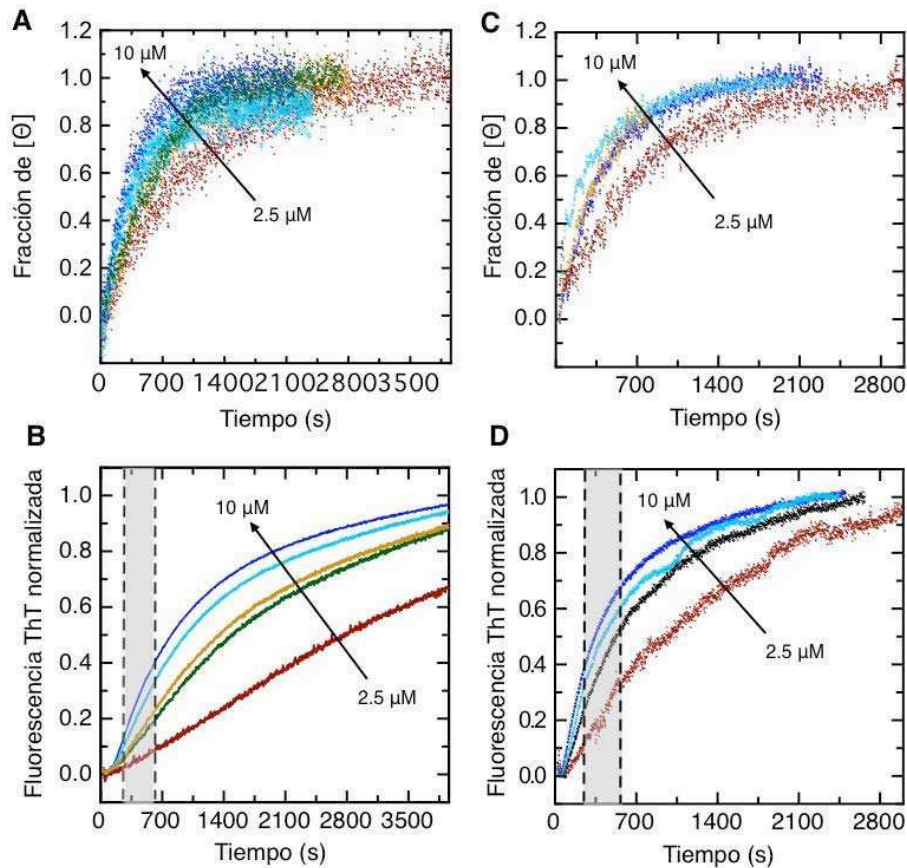


Figura 5.7 Dependencia de concentración del proceso de oligomerización. En el panel de la izquierda se muestran los experimentos de salto de temperatura incubando a 47 °C y en el panel de la derecha se muestran los experimentos incubando a 55 °C. A y C) Se muestran los cambios en la elipticidad a 220 nm normalizada variando la concentración de 2.5 a 10 μM . B y D) Se muestran los cambios en la fluorescencia de ThT normalizada en las distintas concentraciones ensayadas. La zona gris indica el rango de tiempo utilizado para el análisis del núcleo y orden de formación de NS1SOs.

Los valores normalizados de fluorescencia de ThT muestran una clara dependencia con la concentración (Figura 5.7, B). En todas las concentraciones de proteína se observó una forma sigmoide con tres fases definidas: 1) una fase de retardo o *lag*, 2) una fase *exponencial*, y 3) una fase *estacionaria*. A su vez, en todos los casos el cambio de CD precedió al cambio en la estructura cuaternaria, monitoreado por el incremento en la fluorescencia de ThT. Es así que a 10 μM de NS1 a los 700 segundos se completó el $> 80\%$ del cambio en estructura secundaria en comparación al cambio en fluorescencia de ThT en el que se completó sólo un 45% (Figura 5.7 B, en azul). Esto indica la presencia de al menos un intermediario en el proceso de oligomerización. Al realizar el mismo experimento a 55 °C observamos una menos evidente

dependencia de concentración al monitorear cambios en la estructura secundaria (Figura 5.7, C). El cambio de fluorescencia de ThT mostró una forma sigmoide de las curvas obtenidas, observando dependencia de la velocidad del proceso con la concentración de proteína (Figura 5.7, D). Como sucedió a 47 °C, todos los cambios de CD precedieron a los cambios en la fluorescencia de ThT.

Al analizar los valores del tiempo medio del proceso (T_{50}) se observa que a 47 °C hay una relación lineal con una pendiente poco pronunciada de los valores obtenidos por CD mientras que los valores de T_{50} de los cambios de fluorescencia de ThT tienen una caída brusca de 2.5 μM a 4 μM con una tendencia a converger con los valores de T_{50} de CD (Figura 5.8, A). Esto podría evidenciar que el proceso de oligomerización, se ve limitado cinéticamente por el cambio conformacional. Al analizar los valores de T_{50} del experimento realizado a 55 °C observamos que a 10 μM estos valores son más cercanos y tienden a igualarse (Figura 5.8, B), indicando que afirmativamente el cambio conformacional es un limitante del proceso de oligomerización.

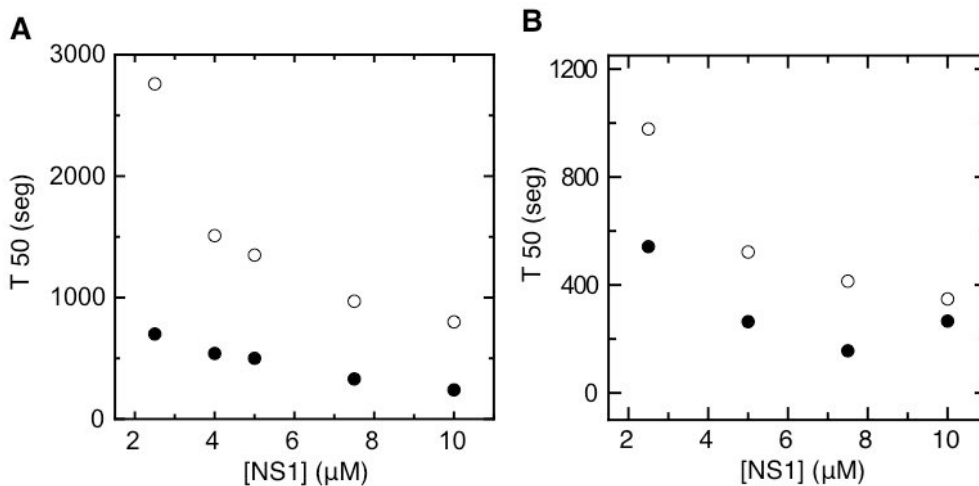


Figura 5.8 Valores de T_{50} de las curvas de dependencia de concentración. Se muestran los valores de T_{50} de las cinéticas de CD (en negro) y fluorescencia (en blanco) en función de la concentración utilizada.

V.4.3 Determinación del tamaño del núcleo y orden de la reacción

Al utilizar el modelo KL, la relación entre la concentración de NS1SOs y la concentración de proteína monomérica está dada por la ecuación 5.2. Esta relación es válida sólo para el período de tiempo que se encuentra entre la fase de retardo y la fase estacionaria.

$$\log[NS1SOs] = \log k + n \cdot \log[NS1_{monómero}] \quad (5.2)$$

Donde k es la constante de proporcionalidad y n es el tamaño del núcleo. La fluorescencia de ThT se utilizó como sonda de estructura cuaternaria. Se eligieron diferentes tiempos (entre los

150 y 600 segundos, zona en gris de la figura 5.7 B y D) de la fase exponencial o de crecimiento donde se calculó la concentración de monómero y NS1SOs formado para cada una de las concentraciones ensayadas. Para cada punto definimos:

$$[\text{NS1SOs}] = [\text{NS1 concentración total}] \times [\text{Fluorescencia de ThT normalizada}]$$

$$[\text{NS1 monomérica}] = [\text{NS1 concentración total}] \times [1 - \text{Fluorescencia de ThT normalizada}]$$

Se realizó un gráfico del logaritmo [NS1SOs] en función del logaritmo [NS1 monomérica] a partir del cual determinamos el tamaño del núcleo del proceso de oligomerización (ver Materiales y Métodos). Calculamos un valor de 2.3 ± 0.3 para el experimento a 47 °C (Figura 5.9, A) y de 2.5 ± 0.2 para el experimento a 55 °C (Figura 5.9, C), como un promedio de los valores de la pendiente de cada uno de todos los tiempos analizados. Estos resultados indican que el núcleo del proceso de oligomerización de NS1 es una especie dimérica.

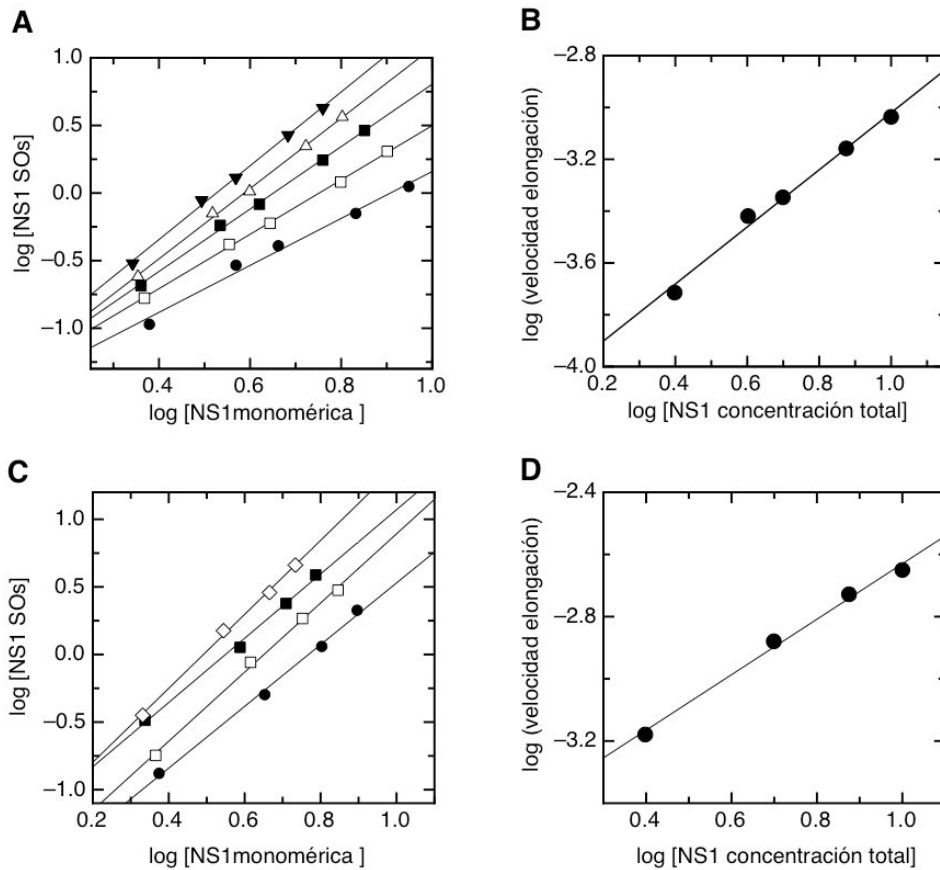


Figura 5.9 Determinación de tamaño de núcleo y orden de la reacción. En el panel superior se muestran gráficos correspondientes a los experimentos a 47 °C y en el de abajo para los realizados a 55 °C. A y C) Gráfico log-log de [NS1SOs] en función de [NS1 monomérico]. En A, las determinaciones se realizaron para los siguientes tiempo para el experimento a 47 °C: 200 s (círculos llenos), 300 s (cuadrados vacíos), 400 s (cuadrados llenos), 500 s (triángulos vacíos) y 600 s (triángulos invertidos llenos). En C se analizaron los siguientes tiempo para el experimento a 55 °C: 150 s (círculos llenos), 200 s (cuadrados vacíos), 250 s (cuadrados llenos) y 300 s (rombos vacíos). B y D) Gráficos log-log de la velocidad de elongación en función de la concentración total de NS1 (ver Materiales y Métodos).

Con el fin de determinar el orden de la reacción, se tomó la pendiente de la fase de elongación de cada curva (en una región centrada en el 25% del cambio de señal) la cual indica la velocidad de elongación. El orden de la reacción fue determinado utilizando la ecuación 5.3:

$$\log(VE) = l \times \log[NS1_{total}] + C \quad 5.3$$

Donde VE es la velocidad de elongación, NS1_{Total} es la concentración total de NS1, *l* es el orden de la reacción y *C* es una constante. Entonces, se realizó un gráfico que relaciona el logaritmo de la velocidad de formación de NS1SOs en función del logaritmo [NS1 concentración total] (ver Materiales y Métodos). A partir de la pendiente del ajuste lineal de estos datos se obtuvo un valor de 1.10 ± 0.06 para el experimento realizado a 47 °C (Figura 5.9, B) y de 0.89 ± 0.05 para el experimento realizado a 55 °C (Figura 5.9, D). Estos datos en conjunto indican que se adiciona secuencialmente un monómero a la vez, al núcleo dimérico, previamente mencionado.

V.4.4 Determinación de la etapa irreversible

Finalmente, como previamente se describió, una vez finalizada la reacción de oligomerización, el proceso resulta irreversible. Sin embargo una parte importante en el estudio de un mecanismo es determinar cuando sucede cada evento y cuales de los eventos intermedios en el proceso de oligomerización son reversibles. Para esto realizamos un experimento de doble salto de temperatura (ver Materiales y Métodos). En este experimento transferimos NS1 monomérica a 47 °C para inducir la formación NS1SOs. A diferentes tiempos la transferimos nuevamente, ahora a 20 °C y se monitoreó la elipticidad en el UV lejano a 220 nm para evaluar si el cambio observado es reversible. El proceso de oligomerización se caracterizó por un incremento en la elipticidad molar negativa a 220 nm desde -5500 hasta los -8500 (Figura 5.10 A, punto negro), en concordancia con experimentos anteriores. Al evaluar la reversibilidad a tiempos cortos (entre 50 y 320 segundos) se observó una clara transición, la cual involucró un cambio de estructura secundaria hacia los valores iniciales de la reacción, correspondientes a NS1 nativa (Figura 5.10 A). Al evaluar el espectro de CD en el UV lejano se observó que para el tiempo mas corto (50 segundos) el mismo tiene valores similares al monómero de NS1, indicando que la transición mencionada se debe a reversibilidad del proceso (Figura 5.10 B, en rojo). Para las muestras incubadas a tiempos mas largos esta reversibilidad del cambio de estructura secundaria se pierde, y como muestran los espectros de dicroísmo

circular, los que presentan características similares de estructura secundaria a NS1SOs. Sin embargo, a 480 y 1120 segundos, los valores de elipticidad molar no muestran cambios a lo largo del tiempo, indicando que el proceso de polimerización se detuvo al enfriar la muestra.

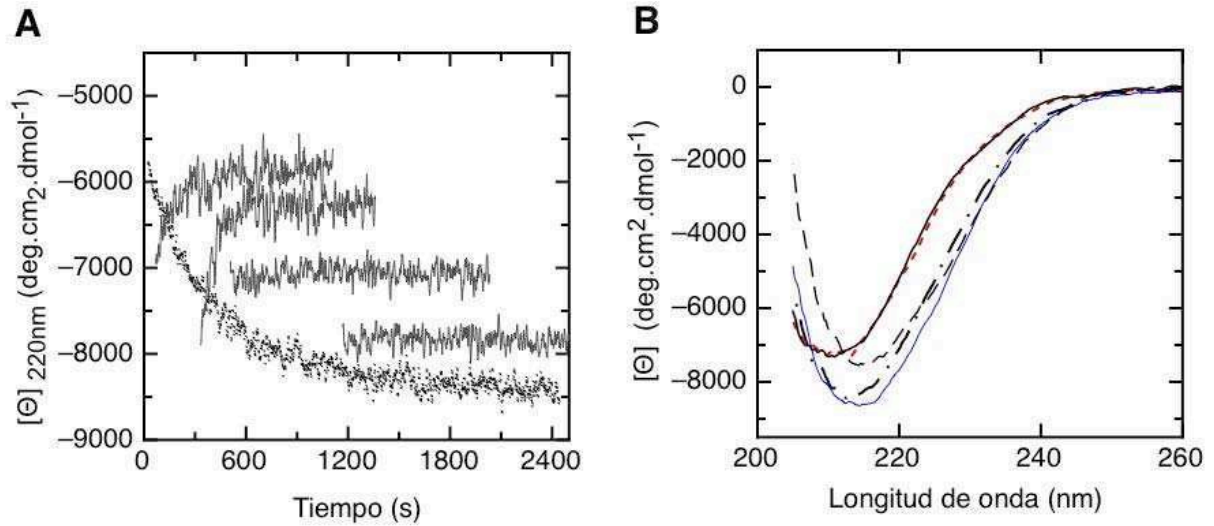


Figura 5.10 Doble salto de temperatura monitoreado por dicroísmo circular. NS1 mantenida a 4 °C fue calentada a 47 °C (se muestra como puntos negros el cambio en la elipticidad normalizada a 220 nm). A diferentes tiempos en el rango entre los 50 y 2000 segundos de la incubación a 47 °C, la proteína se transfirió a 20 °C y se monitorearon los cambios en el UV lejano al enfriar la proteína a 20 °C (representado como línea negra a los 50, 320, 480 y 1120 segundos). B) Espectros de CD en el UV lejano tomados al completarse las cinéticas en A: a los 50 s (---), 320 s (----), 480 s (— . -) y a los 1120 s (_____). El espectro de NS1 monomérica se muestra como referencia (_____). Experimento realizado a una concentración de 12 μ M de NS1.

Con el fin de determinar la presencia y formación de especies oligoméricas a los distintos tiempos ensayados en el experimento anterior, se acopló al experimento de doble salto de temperatura a una cromatografía de exclusión molecular, la cual se realizó al finalizar cada cinética al enfriar a 20 °C (Figura 5.11, A). Se utilizó una columna S-75, la cual excluye a todas las partículas de tamaño superior a 70 kDa. A los 50 segundos no detectamos formación significativa de oligómeros que eluyan en el volumen de exclusión (V_0) de la columna (Figura 5.11 A, en rojo), indicando que efectivamente la transición observada se produce entre monómeros. A tiempos más largos, se observó una acumulación gradual de especies oligoméricas. Esto resultó correlacionarse bien con el proceso de oligomerización monitoreado por la fluorescencia de ThT (Figura 5.11, B).

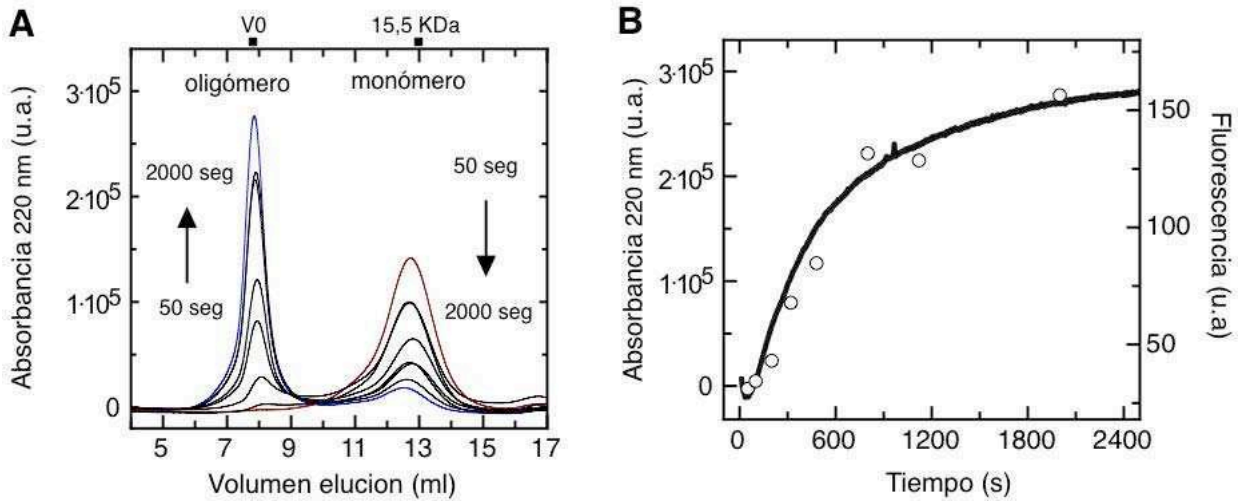


Figura 5.11 Doble salto de temperatura monitoreado por cromatografía de exclusión molecular. A) Se muestran los cromatogramas correspondientes a las muestras enfriadas a 20 °C a tiempos entre los 50 y 2000 segundos de incubación a 47 °C. En rojo se muestra el cromatograma correspondiente a los 50 s y en azul a la muestra enfriada a los 2000 segundos. B) Se compara el valor máximo de absorbancia alcanzado en el volumen de exclusión (V₀, círculos blancos) con la cinética de formación de NS1SOs monitoreado por fluorescencia de ThT .

En conjunto, estos resultados indican que a tiempos cortos se produce una reacción reversible, que involucraría especies monoméricas, que llevan a la formación de un núcleo dimérico. El proceso de polimerización puede ser detenido, sin embargo si esto no ocurre, una vez que se forma el núcleo la reacción de elongación procede en forma irreversible con la adición secuencial de unidades monoméricas que llevan a la formación de NS1SOs.

V.5 DISCUSIÓN

En este capítulo se abordó la determinación del mecanismo de ensamblado de NS1SOs, obtenido por efecto inducido por el incremento de temperatura, en relación a su conformación utilizando microscopía de fuerza atómica y analizando su unión a diferentes compuestos ampliamente utilizados en la literatura por reportar la presencia de estructuras de características amiloides. Por otro lado, utilizando diferentes sondas espectroscópicas, se estudió la cinética del proceso de formación de este oligómero, para el cual proponemos un modelo de ensamblado.

En el capítulo III, se muestra como el incremento moderado de la temperatura lleva a la formación de oligómeros solubles y termo-estables. Por AFM determinamos que estos oligómeros tiene una morfología esférica, donde todas las especies observadas tienen un tamaño similar de aproximadamente 21 nm de diámetro. Además, estas estructuras mostraron propiedades de unión a Tioflavina T y Rojo Congo, los cuales indican la formación de láminas

beta repetitivas, características de estructuras amiloides. Hay que destacar que a pesar de su estabilidad y basándonos en su irreversibilidad y la ganancia en estructura secundaria que NS1SOs presenta, esta molécula une ANS, lo cual es indicador de presencia de superficies hidrofóbicas que resultan accesibles al solvente. Esto indica una estructura terciaria menos compacta.

El análisis del proceso de desplegamiento de NS1SOs involucra una primera transición hacia la conformación monomérica (entre 2.0 y 3.0M de Gdm.Cl), sugiriendo una disociación a especies que no sólo presentan una estructura secundaria similar al monómero nativo, sino que muestran sus mismas propiedades hidrodinámicas. Al inducir su desplegamiento, este muestra ser superponible con el de la especie nativa. Estos resultados indican que una barrera energética debe ser sobrepasada para la formación irreversible de NS1SOs. Esto se corresponde con el cambio conformacional de una especie monomérica, la cual constituye la subunidad de la especie oligomérica. El proceso de formación de NS1SOs puede ser revertido por Gdm.Cl, donde la barrera de energía de desplegamiento implica la disociación y recupero del monómero nativo como etapa previa al completo desplegamiento.

Con el fin de determinar aspectos relacionados al mecanismo de formación de NS1SOs utilizamos diferentes sondas espectroscópicas para realizar un estudio cinético en relación a los cambios producidos tanto en la estructura secundaria como en la estructura cuaternaria de NS1 monomérica para dar origen a este oligómero. El proceso de oligomerización resultó ser multi-exponencial, donde los eventos principales se encuadran dentro de tres fases: una fase de retardo o lag, una fase exponencial, de crecimiento o elongación y finalmente una fase estacionaria. La presencia de una fase lag es una clara evidencia de un proceso de nucleación, necesario para la formación de NS1SOs. Esta fase de retardo no la observamos en los cambios en la señal de CD, que reporta cambios en la estructura secundaria de la proteína. Dada la dispersión de los resultados obtenidos por DLS no se puede determinar con certeza el tamaño de las partículas que conforman el núcleo del oligómero, sin embargo especies de tamaño compatible con monómeros-dímeros parecen encontrarse en la fase lag. El tamaño del oligómero en fase estacionaria es de 32.7 nm. Asimismo, estimamos que NS1SOs estaría formada por 149 unidades de monómeros, utilizando una relación lineal realizada a partir de proteínas globulares estándar [94]. Considerando que la reacción de polimerización a 47 °C y una concentración de NS1 de 10 µM tomando un tiempo de completación de 5000 segundos, estimamos una tasa de adición de monómeros en la fase exponencial de un monómero cada 34 segundos, para estas condiciones experimentales.

Al analizar la dependencia de concentración de los cambios observados, encontramos que el cambio de estructura secundaria tiene baja dependencia con la concentración de proteína, mientras que el cambio de fluorescencia de ThT tiene una alta dependencia con la concentración. Al analizar los valores de T_{50} observamos una gran diferencia entre los valores por CD y fluorescencia a baja concentración, mientras que a concentraciones mayores estos valores tienden a converger y mantenerse constantes. Esto indica que el cambio conformacional es un paso limitante en la reacción de polimerización.

El núcleo de un proceso de oligomerización, se define como la unidad mínima y termodinámicamente estable en solución [90]. Para obtener información acerca del tamaño de este núcleo utilizamos un modelo el cual nos sólo provee información del mismo sino que informa acerca del orden de la reacción. Encontramos que el núcleo es dimérico y que el proceso de polimerización se produce por la rápida adición secuencial de unidades monoméricas que llevan a la formación de NS1SOs (Figura 5.11). En relación a esto, nuestros resultados indican que previo a la formación del núcleo, se produce una transición unimolecular reversible, de la cual el monómero nativo de NS1 puede ser recuperado. Para este paso calculamos una constante de velocidad a 10 μM de proteína realizando un ajuste de los datos de CD a una función exponencial simple, de la cual se obtuvo un valor de vida media de 226 segundos. La formación del núcleo permite la subsecuente adición de monómeros que han sufrido un cambio conformacional, permitiendo el crecimiento del oligómero en una reacción que resulta irreversible.

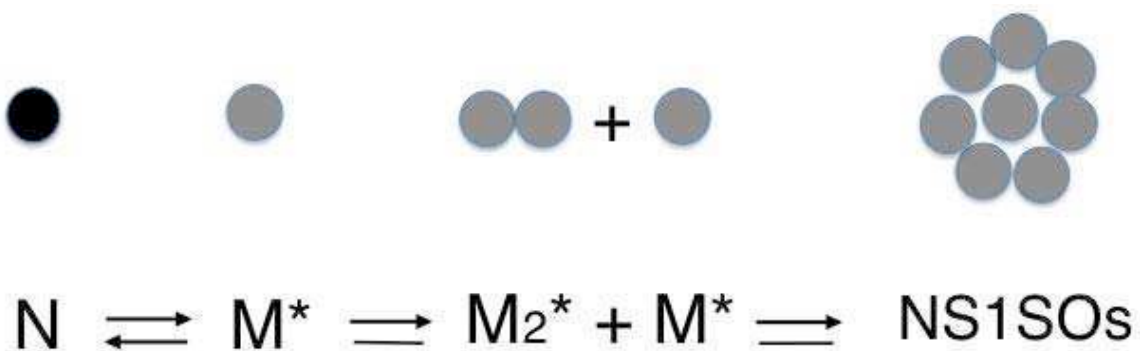


Figura 5.11 Modelo mínimo de formación de NS1SOs. En la reacción de polimerización N corresponde al monómero nativo de NS1, M^* es un monómero que sufrió un cambio conformacional en su estructura secundaria, M_2^* corresponde al núcleo dimérico a partir del cual por la adición secuencial de monómeros lleva a la formación de NS1SOs.

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN GENERAL

La proteína NS1 del virus respiratorio sincicial humano es considerada por muchos como uno de los principales factores de virulencia, con un rol central en la inhibición de la respuesta inmune innata. A pesar de su relevancia, poco es conocido en relación a los mecanismos involucrados en esta evasión del sistema inmune. Asimismo, la falta de un tratamiento específico o una vacuna efectiva marcan la necesidad de caracterizar con el mayor detalle posible sus propiedades en solución y equilibrios conformacionales, teniendo en cuenta que la información al respecto es muy escasa y no hay una estructura resuelta hasta la fecha. El hecho de que NS1 sea una proteína pequeña, única para RSV y sin homólogos de secuencia conocidos, y para la cual se han reportado numerosos blancos de interacción, nos llevó a preguntarnos sobre cuáles son las propiedades conformacionales de esta molécula que le permiten realizar sus múltiples funciones.

En el presente trabajo de tesis se realizó una caracterización bioquímica y biofísica de la proteína NS1 de HRSV. Luego de desarrollar un protocolo para la producción de cantidades significativas de proteína homogénea en solución, se analizaron sus propiedades conformacionales, estabilidad, tendencia a oligomerizar y los mecanismos de plegamiento y oligomerización. Estos estudios son los primeros de este tipo en ser realizados para NS1.

NS1 es un monómero globular con regiones flexibles en su estructura

Numerosas evidencias experimentales indican que NS1 es un monómero globular en solución. Su único triptofano oculto al solvente indica la presencia de estructura terciaria compacta en la molécula. Experimentos realizados por RMN, indican que muchas de las señales correspondientes a residuos de aminoácidos esperados estaban ausentes y esto se debería a que NS1 presenta regiones que experimentan intercambio conformacional lento, lo que habla de su flexibilidad. Utilizando programas que predicen el contenido de estructura secundaria a partir de la secuencia de aminoácidos, se observa que NS1 contiene un porcentaje significativo de regiones (40 %) no tienen una estructura secundaria definida. En forma indirecta pero en perfecta sintonía con estos resultados, a partir del ajuste de los datos obtenidos en experimentos de plegado al equilibrio a un modelo de dos estados (nativo-desplegado), se obtuvo un valor del parámetro m el cual indica que NS1 contiene regiones parcialmente plegadas y accesibles al solvente en su estado nativo, correspondientes a 1/3 de la molécula. En adición a esto, el monómero de NS1 se une al fluoróforo ANS (aunque en menor proporción que NS1SOs), indicando la presencia de sitios hidrofóbicos que se encuentran accesibles al reactivo. Esto es otra evidencia de la presencia de regiones menos compactas y accesibles al solvente en NS1. La presencia de regiones flexibles en NS1 podría tener un rol funcional y las mismas verse

estabilizadas por interacciones específicas. En relación a esto, es conocido el hecho de que regiones flexibles o hiperflexibles constituyen sitios de interacción proteína-proteína, donde la adaptabilidad y flexibilidad estructural otorga la propiedad de multifuncionalidad a estas regiones. Por ejemplo, la proteína E7 del virus papiloma humano es una proteína que contiene una zona hiperflexible en su extremo N-terminal conformando un dominio intrínsecamente desordenado, para el cual se han reportado al menos 40 blancos de interacción [95,96]. Dada la naturaleza extendida de estas regiones, nuestros datos experimentales no sugieren la presencia de estructuras hiperflexibles en NS1, donde observamos una conformación globular, más compacta que extendida. Por otro lado, el análisis de la estructura de la proteína V del virus parainfluenza 5 (PIV5, la cual también es un antagonista de interferón), en complejo con DDB1, indica que V tiene una estructura globular, con un porcentaje importante de regiones flexibles en su molécula (ver Figura 1.7 en introducción) [58]. La interacción de V con el receptor MDA5 implica un cambio conformacional importante [66], lo que resalta la plasticidad conformacional de esta molécula. Resulta interesante remarcar que no se ha obtenido ninguna estructura de V libre, quizás por su gran flexibilidad y/o inestabilidad en ausencia de ligandos. Entonces, se puede establecer una relación entre la estructura de V con la conformación de NS1? El análisis de la secuencia de NS1 no muestra homología con ninguna otra proteína conocida, pero muestra una alta identidad de secuencia entre variantes humanas y bovinas, pero que disminuye notablemente al comparar con la variante murina (NS1 de PVM). En un estudio reportado por Elliot y colaboradores [45], se muestra que NS1 contiene una secuencia consenso de unión a Elongin C y Cullin 2, en donde esta interacción les permitiría formar parte de un complejo E3 ligasa y mediar la degradación de STAT-2 vía proteosoma. Sin embargo, esta secuencia consenso no está presente en PMV (variante murina, similar a RSV) y no se han encontrado otras secuencias homólogas que puedan explicar las múltiples funciones de NS1. Estas observaciones podrían indicar que más allá de la alta identidad de secuencia entre variantes humanas y bovinas, hay una baja homología con la estructura primaria de NS1 de PMV (la cual cumple funciones similares) indicando que más que secuencias de reconocimiento estas proteínas podrían compartir motivos estructurales que pueden ser similares a otros antagonistas de interferón presentes en diferentes paramixovirus, como la proteína V de PIV5. Estudios que permitan resolver la estructura tridimensional de NS1 ayudarán a resolver esta pregunta.

La reacción de plegado de NS1 es limitada por procesos lentos

NS1 muestra un desplegamiento cooperativo entre el estado nativo y el estado desplegado al equilibrio. El hecho de que sean necesarias cantidades significativas de desnaturante para comenzar la transición hacia el estado desplegado habla de una alta estabilidad. Otro hecho que muestra la estabilidad de NS1 es su constante de desplegamiento (k_u), con un $t_{1/2}$ de 144 minutos. En relación a la reacción de desplegamiento, encontramos que este proceso es simple, principalmente explicado por una fase mayoritaria. Sin embargo, encontramos que el plegado se ve influenciado por procesos lentos que limitan la reacción. Dada la escala de tiempo de las constantes observadas y su baja dependencia con la concentración de desnaturante, es muy probable que las múltiples fases del proceso de plegado reflejen la isomerización de prolina, por heterogeneidad cis/trans en el estado desplegado. Esta heterogeneidad en el estado desplegado de especies que se interconvierten lentamente, da origen a especies que pliegan rápido (U_F) y especies que pliegan lento (U_S), de acuerdo a si contienen o no la conformación nativa del enlace peptídico en una prolina con el aminoácido precedente [86]. Como hipótesis, se propone que las especies desplegadas de NS1 con la conformación nativa de sus prolina constituyen unidades competentes de plegamiento y las especies con isómeros no nativos de sus prolina deben cambiar su conformación para seguir la ruta de plegamiento. La especie competente para el plegamiento atraviesa el estado de transición con una exposición al solvente similar al estado nativo, indicando que casi la totalidad del proceso de plegamiento ocurrió antes de pasar por este estado alta energía (Figura 6.1).

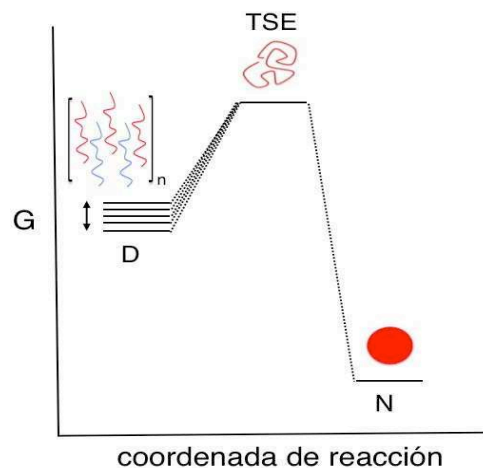


Figura 6.1 Perfil del cambio de energía libre para el plegado de NS1. Se muestra el cambio en la energía libre (G) a lo largo de la coordenada de reacción para el plegado de NS1 desde el estado desplegado (D) al estado nativo (N). Las especies del estado desplegado con conformación nativa de sus prolina se muestran en rojo, estas especies se interconvierten con especies con conformación no nativa de sus prolina (U_S , en azul). La especie competente para el plegado de NS1 (U_F), con la conformación nativa de sus prolina se pliega rápidamente, mostrando un alto porcentaje de estructuración en el estado de máxima energía libre (estado de transición, TSE).

No obstante, para develar completamente el mecanismo de plegamiento son necesarios futuros experimentos que corroboren esta hipótesis y descarten por ejemplo la presencia de especies parcialmente plegadas, que podrían ser similares a NS1 nativa, donde alguna reacción de isomerización ocurre después del evento principal de plegamiento. En el caso de la Ribonucleasa A, proteína que contiene 4 prolinas, se comprobó que la reacción de plegamiento se encontraba limitada cinéticamente, en donde se encontraron fases rápidas y fases lentas principalmente debido a heterogeneidad cis/trans en el estado desplegado, y para lo cual se propuso un modelo similar al que se propone para NS1, con especies que pliegan lento (U_S) que se interconvierten a especies que pliegan rápido (U_F), las cuales contienen una conformación nativa de sus prolinas [84]. Posteriormente se comprobó que esto no era del todo cierto, y que la formación de una especie mayormente plegada, similar a RNAsa A nativa y con actividad catalítica, puede preceder eventos de isomerización de al menos una de sus prolinas [97,98]. Las evidencias obtenidas en NS1, como el hecho de presentar un desplegado simple o la ausencia de una fase principal de replegado, con escasa dependencia de concentración en las fases observadas, indican que la heterogeneidad que limita el plegamiento se produce en el estado desplegado. Pensando el proceso de plegamiento en un ambiente celular, las reacciones lentas que limitan el plegamiento podrían verse modificadas, in vivo, por ejemplo por la presencia de prolil-isomerasas, enzimas que son capaces de acelerar la reacción de isomerización desde U_S a U_F durante la síntesis del polipéptido, promoviendo la formación de especies mayoritarias que pliegan rápidamente (U_F) hacia la conformación nativa.

Más allá del mecanismo de plegamiento en sí, la heterogeneidad del proceso es llamativa. Esta complejidad, podría indicar procesos que tienen lugar en la estructura nativa. Si tenemos en cuenta que NS1 presenta regiones flexibles, la localización de una de sus cuatro prolinas en estas regiones podría favorecer que se produzcan reacciones de isomerización que estén en equilibrio cis/trans o que se vean favorecidas por una interacción con un ligando, indicando un posible rol funcional. En relación a esto último, la isomerización cis/trans de prolinas podría servir para regular una función específica en NS1. Existe evidencia en la literatura en donde se muestra que ciertos eventos de reconocimiento se encuentran gobernados por re-arreglos conformacionales que involucran prolinas, los cuales pueden actuar en el proceso reversible de control de interacciones específicas proteína-proteína. Un ejemplo de esto, es el caso del reconocimiento de la proteína E7 por el anticuerpo monoclonal M1, estudiado en nuestro laboratorio [99]. El epítopo (determinante antigénico que es reconocido por el anticuerpo) se encuentra en una región bisagra entre el dominio N-terminal (el cual es intrínsecamente desordenado) y el dominio C-terminal (globular). El reconocimiento está

regulado por un proceso de isomerización de prolina lento, donde la unión sólo se produce con especies que contienen el isómero en *cis*. Otro caso interesante en la regulación de procesos biológicos por isomerización de prolina lo constituye el receptor de serotonina tipo 3 (5-HT₃) el cual al unirse el neurotransmisor sufre un cambio conformacional, inducido por la isomerización de su prolina 8 de *trans* a *cis* que lleva a la apertura del canal iónico [100]. Queda entonces por definir cual es el rol, si tiene alguno, de procesos lentos de isomerización de prolina en NS1. Dada la multiplicidad de blancos reportados, el reconocimiento específico a través de estas especies, podría ser una estrategia válida.

NS1 presenta plasticidad conformacional y tendencia a oligomerizar

NS1 se expresa en forma recombinante como un monómero en solución. Esta partícula en condiciones controladas es estable, pero al modificar condiciones de su entorno como por ejemplo el pH o la temperatura, NS1 cambia su estructura secundaria, para dar origen a estructuras oligoméricas. Asimismo, la tendencia a formar estas especies de gran tamaño y con contenido de estructura secundaria tipo hoja-beta se ve evidenciado al utilizar cosolventes como ser el TFE o isopropanol, donde llamativamente se encontró formación de especies oligoméricas con un incremento en láminas beta en su estructura secundaria. Estas especies podrían estar presentes en células infectadas, de hecho para inducir su formación son necesarias incrementos moderados de temperatura, compatibles con sistemas biológicos. Al analizar las propiedades de los oligómeros obtenidos por incremento de temperatura (NS1SOs), observamos que tienen una morfología esférica discreta y comparten características con estructuras amiloides.

La capacidad de oligomerizar y formar estructuras amiloides en ciertas condiciones ha sido reportada para un gran número de proteínas, donde algunas de las cuales muestran una tendencia mayor que se encontraría codificada en su secuencia aminoacídica [101,102]. La formación de estructuras amiloides, en algunos casos se encuentra relacionada con patologías en humanos, como ser para el péptido A β amiloide, para las proteínas β 2-microglobulina, transtiretina, lisozima, entre otras [103,104,105,106,107]. Sin embargo, el caso de la proteína Pmel17 revela que estructuras beta-repetitivas no siempre se encuentran relacionadas a fenómenos patológicos, sino que pueden estar involucradas en un proceso funcional [108]. A su vez, proteínas de origen viral han sido reportadas por su capacidad de originar estas estructuras como por ejemplo la proteína E7 y el dominio C-terminal de unión a ADN de la proteína E2 del Virus Papiloma Humano (HPV), y el dominio de unión a ADN del antígeno nuclear 1 del Virus Epstein Barr [109,110,111,112]. Para la proteína E7 de HPV, fue reportada la localización de su conformero oligomérico esférico (E7SOs) en el citosol, analizando diferentes líneas celulares y

en células de tejidos de cuello de útero obtenidos por biopsia, mientras que cuando se encuentra como dímero o monómero se localiza en el núcleo [113]. La proteína PBI-F2 del Virus Influenza A, en condiciones de baja constante dieléctrica, en ambientes hidrofóbicos, forma diferentes tipos de oligómeros y fibras en células infectadas, en cercanía a membranas celulares [114].

Por la multiplicidad de proteínas que forman estructuras amiloides, sean esféricas y solubles o fibrilares e insolubles, no es raro observar una gran número de trabajos que analizan el mecanismo de estos procesos. Uno de los mecanismos propuestos de mayor aceptación para el ensamblado de oligómeros es el mecanismo dependiente de nucleación [90,115]. En este mecanismo, la formación del núcleo dispara el crecimiento del oligómero [90]. Sin embargo, la formación de oligómeros puede ocurrir siguiendo diferentes rutas o caminos, las cuales implican diferentes morfologías de los oligómeros resultantes [116,117]. Haciendo uso de un modelo de ensamblado de oligómeros esféricos reportado por Zlotncik [93], definimos que la oligomerización en NS1 sigue un mecanismo dependiente de nucleación, hecho que cuando ocurre, lleva a la formación irreversible de partículas esféricas solubles. El paso limitante consiste en el cambio conformacional que sufre el monómero, luego de lo cual se forma un núcleo dimérico. El hecho de que no sea necesario una pérdida significativa de estructura secundaria durante el cambio conformacional, indicaría que es necesario superar una barrera energética baja que separa a NS1 nativa del monómero que ha sufrido un cambio conformacional. Asimismo, el proceso ocurre a temperaturas compatibles con sistemas biológicos, por lo que es muy probable que la formación de NS1SOs suceda de manera espontánea, in vivo, inducido por una localización sub-celular específica, por hacinamiento macromolecular o interacción con otras proteínas, teniendo en cuenta que NS1 es una de las proteínas de RSV de mayor abundancia en la infección temprana.

Evidencias que apoyan la existencia de NS1SOs en células infectadas

Existen antecedentes reportados donde indican la posibilidad de NS1 de homo-oligomerizar y de hetero-oligomerizar en interacción con NS2 en células transfectadas. Como se describió en la introducción, recientemente se describió la formación de un complejo macromolecular integrado por NS1 y NS2 [47]. En este complejo se encontraron muchos de sus blancos de interacción propuestos, como ser STAT-2, TRAF-3, RIG-I y IRF3, y por contener proteasas de la subunidad 20S del proteosoma se lo denominó “degradosoma”, donde su actividad degradativa se ve incrementada por la presencia de la proteína mitocondrial MAVS. Este complejo fue heterogéneo en tamaño (entre 300-750 KDa) al ser aislado a partir de

extractos de células transfectadas e infectadas. Hay que remarcar que se detectaron partículas de mayor tamaño, indicando que la fracción analizada podría ser componente de una estructura de mayor tamaño. Si tenemos en cuenta que MAVS cuando es activada, polimeriza hacia la formación de estructuras filamentosas, podríamos suponer que NS1SOs podría interactuar con MAVS previniendo la formación de estos agregados fibrilares funcionales, y de esa forma bloqueando la vía de señalización.

Se ha determinado la formación de oligómeros esféricos por microscopía electrónica en proteínas V de virus miembros del género *Rubulavirus* (como Sarampión o SV5). En estos casos, la formación de especies oligoméricas se observó tanto en proteína purificada (expresada en *E. coli*), tanto como en proteínas purificadas por afinidad a partir de extractos de células transfectadas. Se identificó que estas partículas, se encontraron en complejo con STAT-1, STAT-2, DDB1 y Cul4A [65]. Esto evidencia la capacidad de formar oligómeros esféricos en diferentes antagonistas de interferón, lo que podría indicar mecanismos similares no ligados a secuencias de reconocimiento específicas, sino a su capacidad de oligomerizar.

Los resultados presentados en relación al mecanismo de auto-ensamblado de NS1, resultan de utilidad para establecer un vínculo entre la formación y función del complejo heterogéneo con actividad degradativa formado por las proteínas no estructurales, encontrado en células de epitelio pulmonar transfectadas e infectadas. A su vez, proveen de información detallada que puede ayudar a entender este complejo proceso y servir de base para el desarrollo de estrategias terapéuticas.

En conjunto, los resultados mostrados en esta tesis muestran como dada la multifuncionalidad o la larga lista de blancos reportados para una proteína pequeña como NS1, la misma puede basarse en su capacidad de adquirir diversas conformaciones o estados de oligomerización. La heterogeneidad conformacional permite expandir el repertorio de posibles blancos incrementando las funciones de este polipéptido en relación al mecanismo de inmunoevasión. En la figura 6.2 se presenta un modelo donde se integran los resultados presentados en esta tesis junto con lo reportado hasta el momento en la literatura. Futuros estudios esclarecerán la presencia y el rol de NS1SOs en células infectadas, y son necesarios para caracterizar los intermediarios en el plegamiento de NS1 y para determinar su estructura tridimensional. Esto último permitirá establecer si NS1 presenta características estructurales similares a antagonistas de interferón de otros paramixovirus, lo que no sólo permitirá profundizar sobre las bases estructurales de los mecanismos propuestos, sino diseñar estrategias en común.

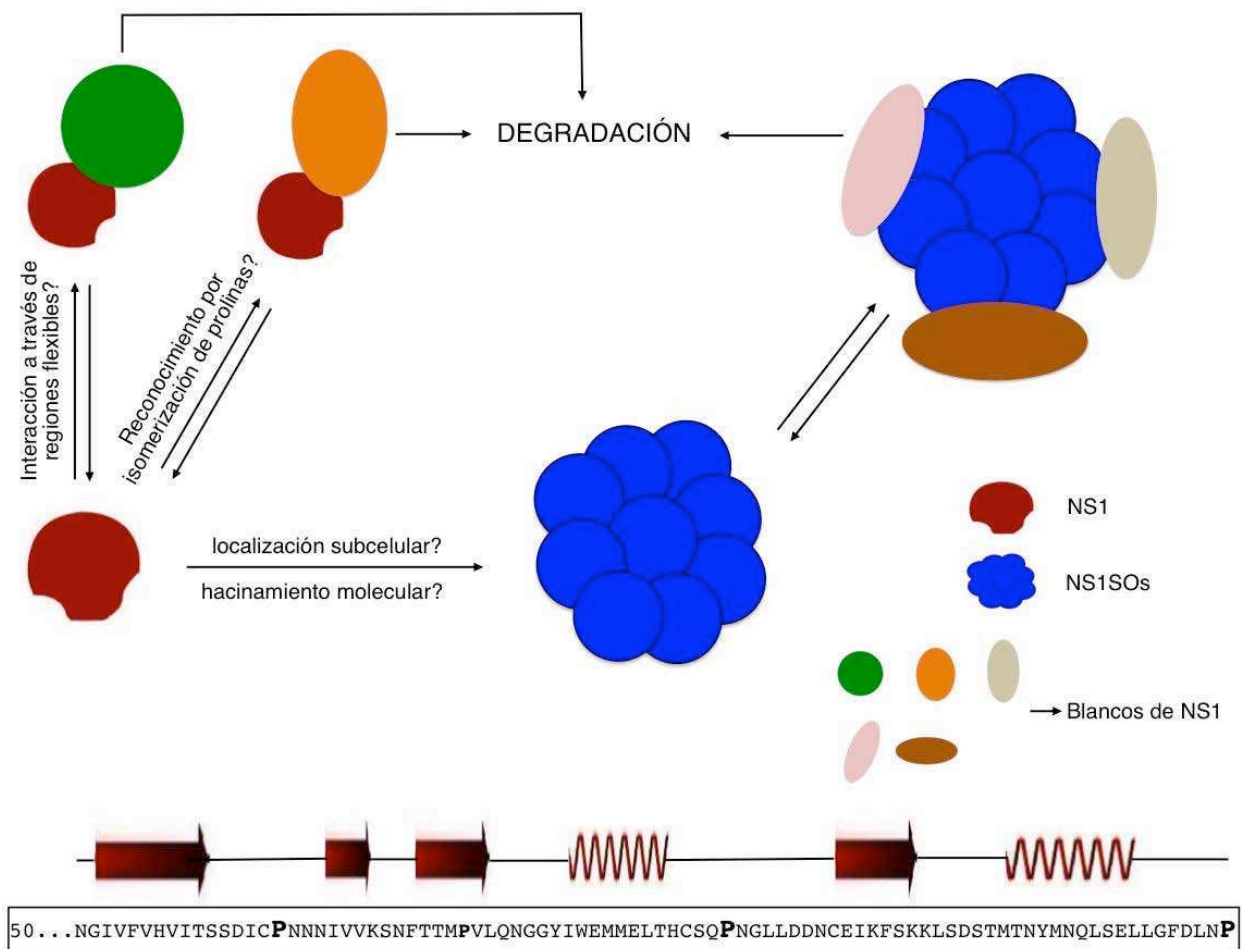


Figura 6.2 Modelo de integración entre estructura y función de NS1. NS1 es un monómero globular, el cual presenta regiones flexibles. Estas regiones podrían ser sitio de interacción con otras proteínas. La predicción de estructura secundaria muestra que 3 de las cuatro prolínas (marcadas en negrita) en NS1 se encuentran en regiones sin estructura asignada (representadas como línea continua en el gráfico), las cuales podrían ser regiones localmente desplegadas/flexibles. En ese caso, estos residuos podrían sufrir procesos de isomerización cis/trans y de esta manera participar de procesos de reconocimiento molecular. En diferentes condiciones NS1 oligomeriza dando origen a la formación irreversible de NS1SOs. Esta estructura podría participar de múltiples interacciones, mediando la degradación de blancos celulares como los reportados para el “degradosoma” de NS1 encontrado en células infectadas [47].

MATERIALES Y MÉTODOS

Clonado y expresión recombinante

Clonado del gen de NS1 de HRSV

El clonado del gen de NS1 correspondiente al subtipo viral A₂ del Virus Respiratorio Sincicial Humano (HRSV) se realizó utilizando un gen sintético con codones optimizados para la expresión en *E. coli* (GenScript Corp). Se diseñaron secuencias de corte por enzimas de restricción en los extremos 5' y 3' para realizar el subclonado en 3 vectores de expresión. Los vectores y sitios de corte para enzimas de restricción utilizados fueron: pTZ18U entre NdeI y HindIII, pET-15b entre NdeI y BamHI, y el vector pMal-c entre BamHI y HindIII. Las construcciones fueron transformadas en la cepa de *E. coli* DH5 α , y las colonias transformantes positivas fueron identificadas por patrón de restricción utilizando las enzimas de restricción específicas para cada caso (New England Biolabs), y verificadas por secuenciación.

Expresión recombinante y purificación de NS1

Expresión de NS1 en medio rico. La construcción de NS1 fusionada a la proteína de unión a maltosa (MBP) con una secuencia de unión y reconocimiento por la proteasa trombina fue transformada en la cepa de expresión C41(DE3). Las colonias transformantes fueron crecidas en pre-cultivos de 5 ml en medio LB con ampicilina a 100 μ g/ml, por 16 h a 37 °C luego de lo cual fueron transferidas a erlenmeyer de 500 ml de medio LB con ampicilina y crecidos a 37 °C con una agitación de 200 rpm, hasta llegar a una DO 600 nm de 0.6. Los cultivos fueron llevados a 20 °C por 30 minutos y se realizó la inducción con IPTG 0.3 mM. Luego de 18 h de la inducción a 20 °C se realizó la cosecha de las bacterias por centrifugación. Se resuspendió la pasta de bacterias en solución Tris-HCl 20 mM pH 8, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA y 2 mM 2BME y la ruptura celular se realizó por sonicación. **Precipitación fraccionada con sulfato de amonio.** A la fracción soluble obtenida de la lisis de bacterias se incubó con sulfato de amonio al 50 % (p/v) por 4 horas a 4 °C, luego de lo cual se centrifugó, descartando la fracción soluble. **Columna de afinidad por maltosa.** Se resuspendió la fracción precipitada del paso anterior en solución Tris-HCl 10 mM pH 8, 0.2 M NaCl, 2 mM 2BME, se realizó una diálisis contra la misma solución y se inyectó la muestra en columna de afinidad por maltosa (New England Biolabs). Se realizó la elución con solución de elución con el agregado de 20 mM maltosa. Este procedimiento al menos 3 veces, re-inyectando el percolado. **Corte con trombina.** A la proteína de fusión obtenida se la concentró hasta 10 mg/ml. El corte del sitio de unión entre NS1 y MBP se realizó con la proteasa trombina, utilizando 0.25 unidades por cada 3 mg de proteína. Se incubó a 4 °C por 16 horas en tampón químico Tris-HCl 10 mM pH 8, 0.2M NaCl, 2BME 2 mM suplementado con CaCl₂ 1 mM. Para detener la reacción se utilizó PMSF 1 mM.

Cromatografía de exclusión molecular. Luego del corte con trombina, la muestra fue inyectada en una columna de filtración en gel S-75 preparativa (Amersham-Pharmacia) equilibrada en solución Tris-HCl 10 mM pH 8, 0.2M NaCl y DTT 1 mM.

Expresión en medio mínimo de NS1. Se utilizaron las bacterias C41(DE3), las cuales fueron transformadas con el plásmido pMal-c. Las bacterias transformantes fueron crecidas en pre-cultivos de 10 ml conteniendo medio mínimo M9 suplementado con ampicilina. Se utilizó una concentración de glucosa marcada (^{13}C), como fuente de carbono, de entre 1.5 y 2 g/L, y de Cloruro de Amonio (^{15}N), como fuente de nitrógeno de, 1g/L. Los pre-cultivos de 10 ml fueron transferidos a erlenmeyer de 500 ml de medio minimo M9, para mantener una relación pre-cultivo/cultivo de crecimiento de 1/50. La incubación, inducción cosecha y posterior purificación se realizó como fue indicado para las preparaciones en medio rico.

Producción de NS1SOs

La especie oligomérica NS1SOs fue generada a partir de la incubación de NS1 a 70 °C por 10 minutos, previo filtrado en columna PD-10 (Pharmacia) equilibrada en solución Tris-HCl 10 mM pH 8 y DTT 1 mM, para eliminar el contenido de NaCl.

Control de calidad y cuantificación de proteínas

La pureza en cada preparación fue juzgada por SDS-PAGE y la identidad confirmada espectrometría de masa MALDI-TOF (Bruker, Daltonics, Billerica, MA USA). El correcto plegado fue analizado por dicroísmo circular en el UV lejano y espectro de emisión de fluorescencia de su único triptofano.

Determinación de la concentración de NS1. La cuantificación de concentración de proteína se realizó por diferentes metodologías:

Absortividad de residuos aromáticos a 280 nm: Se determinó la concentración espectrofotométricamente, utilizando el coeficiente de absorción molar teórico calculado a partir del programa ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>).

Método de Bradford [118]: Se determinó la concentración de proteína utilizando una curva patrón de proteína albúmina sérica (BSA) en el rango de 0 10 µg/ml. Se midió la absorbancia a 595 nm de las muestras patrón (1 ml) luego de agragar 1 ml de reactivo de Bradford (Sigma). Se determinó la absorbancia de las muestras problema por duplicado, y estos valores de

absorbancia fueron utilizados para estimar la concentración de proteína interpolando en la curva patrón.

Predicción de estructura secundaria y alinamiento de secuencias

Para la predicción de estructura secundaria utilizó el programa Jpred (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>). El alzamiento de secuencias se realizó utilizando el programa ClustalW2 (www.ebi.ac.uk)

Electroforesis en geles desnaturalizantes

Todos los geles SDS-PAGE fueron realizados según el método de Laemmli. Posteriormente fueron teñidos con una solución de *Coomasie Blue*.

Filtración en columna de exclusión molecular

Los ensayos de cromatografía de exclusión molecular fueron realizados en columnas S-75 HR 10-30 (24 ml). Esta columna fue calibrada con proteínas globulares estándar como Ovoalbúmina (44.2 KDa), Quimotripsinógeno (25 KDa) y Ribonucleasa A (13.7 KDa). El volumen de exclusión (V_0) y el volumen total (V_T) fueron determinados con Dextrano Azul y acetona, respectivamente. La solución de equilibrado y la concentración de proteína utilizada se indican en cada caso.

Dispersión de luz Estática (SLS)

El peso molecular promedio de NS1 fue determinado utilizando un instrumento de dispersión de luz estática Precision Detector PD 2010 conectado a un equipo de cromatografía líquida de alta performance (HPLC) y a un refractómetro diferencial LKB 2142. Se registraron las señales de dispersión de luz a 90° y el índice de refracción de la muestra que eluyó de la columna. Los datos fueron analizados con el programa Discovery32 (Precision Detectors). El detector de dispersión de luz fue calibrado utilizando Albúmina bovina sérica como estándar (66.5 KDa). La concentración de proteína utilizada fue de $190 \mu\text{M}$ (aproximadamente $200 \mu\text{l}$ para cada corrida).

Dispersión de luz Dinámica (DLS)

Las mediiones de DLS fueron realizadas en un instrumento Zetasizer Nano S (Malvern Instruments). NS1 fue filtrada mediante filtros Ultrafree-MC de $0.22 \mu\text{m}$ (Milipore) antes de realizar cada medición. Los datos fueron analizados utilizando el programa DTS Nano, para obtener las distribuciones del radio hidrodinámico en función. La concentración utilizada se mantuvo entre 15 y $40 \mu\text{M}$ y la temperatura se mantuvo constante a 20°C (a menos que se indique lo contrario) por un sistema de control Peltier.

Dicroísmo circular.

Las mediciones de CD en el UV lejano fueron realizadas en un espectropolarímetro JASCO J-810 (Nikota, Japón), con control de temperatura usando un controlados Peltier. Se utilizaron cubetas de paso óptico de 0.1 a 0.2 cm. Se promediaron entre 4 y 8 espectros para cada muestra a una velocidad de barrido de 100 nm/min, ancho de banda de 1 nm y una respuesta promedio de 4 segundos. Los datos crudos fueron transformados en elipticidad molar por residuo (MRW) cuyas unidades son: $\text{deg} \cdot \text{dmol}^{-1} \cdot \text{cm}^2$, que normaliza por paso de luz, concentración y número de enlaces peptídicos:

$$[\Theta]_{MRW} = \text{deg} / l \times c \times 10 \times n \quad (1)$$

Donde:

Deg = señal cruda en mdeg

l = paso de luz en cm

c = concentración de proteína en molar

n = número de enlaces peptídicos

10 = factor que transforma en dmol

Para las determinaciones de estabilidad térmica, se aplicó una rampa de temperatura de 10 a 80 °C y de 80 a 10 °C, a una velocidad de barrido de 5 °C/min. Se tomaron espectros cada 5 °C o se registró el cambio de señal a una longitud de onda fija.

Fluorescencia

Todos los experimentos fueron realizados en un fluorímetro Jasco FP-6500. Para las mediciones del espectro de emisión de fluorescencia del triptofano, se registró la fluorescencia entre los 310 y 450 nm, con una longitud de onda de excitación de 295 nm. Para monitorear transiciones, se utilizó en centro de masa del espectral (CSM, de las siglas en inglés) el cual es calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$CSM = \frac{\sum (v_i F_i)}{\sum F_i} \quad (2)$$

Donde:

F_i = es la señal de fluorescencia

v_i = es la longitud de onda i

Los espectros de fluorescencia de tioflavina T y ANS fueron registrados entre los 420 y 600 nm, con con longitud de onda de excitación de 442 nm para ThT y de 370 nm para ANS.

En todos los casos, los datos fueron analizados luego de substrar la señal aportada por la solución *buffer*.

Determinación de sulfhidrilos libres con DTNB (reactivo de Ellman)

Esta técnica se basa en la detección colorimétrica a 412 nm del anión 2-nitrobenzoato (TNB) que es liberado luego de la reacción del 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico), DTNB con el tiolato de una cisteína. Se realizó una curva patrón con DTT (idealmente se realiza con cisteína). Se midieron a 412 nm, las muestras incógnita de NS1, NS1SOs y las mismas en 5M de Gdm.Cl. Se determinó la absorbancia de las muestras por triplicado y estos valores fueron utilizados para estimar los μM de sulfhidrilos reactivos por μM de proteína. Un μmol de NS1 contiene 4 μmoles de sulfhidrilos. La solución de proteína, previo a las mediciones fue filtrada en una columna PD-10 (Pharmacia) para eliminar la presencia de tioles como el DTT de la solución.

Proteólisis limitada

Para el ensayo de proteólisis limitada se utilizaron las enzimas Tripsina y Quimotripsina (Sigma). Se realizaron incubaciones de 2 horas a distintas relaciones de enzima/proteína a 37 °C. Se utilizó una concentración de NS1 de 0.5 mg/ml, de 1 mg/ml para Quimotripsina y 0.5 mg/ml para Tripsina. Las relaciones que se mantuvieron fueron 1/20 y 1/50 para Tripsina y 1/20, 1/50 y 1/200 para Quimotripsina. Se tomaron alícuotas a los 5 y 120 minutos. La reacción se detuvo por incubación a 100 °C por 5 minutos y luego fueron guardadas a -20 °C hasta su uso. Cada muestra fue corrida en un gel SDS-PAGE 17 %.

Microscopía de fuerza atómica

Los experimentos fueron realizados en un instrumento Nanoscope III Multimode-AFM (Digital Instruments, Veeco Metrology, Santa Barbara, CA) utilizando el modo "tapping". NS1SOs fueron diluidos a 5 ng/ul en solución Tris-HCl 10 mM pH 8 con 4 mM de MgCl_2 . Cinco microlitros de muestra fue lavada con 1 ml de agua milli-Q para remover las moléculas que se encontraban firmemente unidas a la mica, y luego secada con nitrógeno. Se capturaron imágenes de 512 pixeles. Las imágenes fueron procesadas utilizando el programa Nanoscope, para remover el ruido de base. Luego se utilizó el programa WsxM 4.0 beta 5.3, para el análisis de los resultados.

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

Muestra y condiciones de medición

Luego de explorar una amplia gama de condiciones, la condición elegida para realizar las mediciones consistió en una muestra entre 150-300 μM de concentración de proteína

marcada con ^{15}N ó $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$, en tampón químico Tris-HCl 10 mM pH 7.5, 200 mM NaCl y TCEP 1 mM, en una mezcla de 95 % agua y 5 % D_2O . Las mediciones se realizaron a 25 °C en un espectrómetro Bruker 600 MHz Avance III equipado con una crio-sonda. Los datos fueron procesados en estaciones Silicon Graphics utilizando NMRPipe (Delaglio, 1995) y analizados con NMRview (Johnson, 2004).

Medidas de difusión

Se realizaron medidas de difusión por la técnica: *pulse field gradient NMR* [77]. Se utilizó Dioxano (10 μl , 2 % en agua) a una muestra de 300 μl como estándar interno. La duración de los pulsos y tiempos de retardo en la secuencia se mantuvieron constantes y una serie de espectros fueron adquiridos con la fuerza del gradiente de difusión variando entre 5 % y 95 % como valor máximo. El tiempo entre los gradientes de pulso fue de 4 ms y la duración del retardo fue calibrado para la muestra, con el fin de dar un decaimiento máximo de 80-90 % para las señales de la proteína y del dioxanos. El radio hidrodinámico (R_h) fue calculado como sigue a continuación:

$$R_h = (D_{\text{diox}}/D_{\text{NS1}}) \times R_h (\text{diox}) \quad (3)$$

Donde:

D_{diox} y D_{NS1} = son los coeficientes de difusión del dioxanos y NS1, respectivamente.

$R_h (\text{diox})$ = es el radio hidrodinámico efectivo del dioxanos (2.12 Å). Las mediciones fueron reproducidas al menos 3 veces.

Medidas de ^{15}N T_2

Medidas de ^{15}N T_2 para obtener información de la dinámica conformacional de NS1 se realizaron a una frecuencia de 60.83 MHz ^{15}N , utilizando esquemas de pulsos estándar. Los tiempos de relajación utilizados fueron: 15.6, 34.1, 47.0, 62.7, 78.4 y 94.1 ms. Los datos fueron ajustados utilizando una rutina de *Rate Analysis* del programa NMRview. Los errores fueron de entre 2 a 4 %.

Mecanismo de Plegado de NS1

Desplegado al equilibrio

Para las mediciones al equilibrio, cantidades crecientes de Gdm.Cl (de 0 a 6.0 M) fueron incubadas, en tubos separados, junto con NS1 a 10 μM de concentración final en solución 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, y 1 mM DTT, por 3 horas a 20 °C. Luego de centrifugar la muestra se midieron los espectros de CD en el UV lejano y de fluorescencia del triptofano. Los

datos fueron ajustados siguiendo un modelo de dos estados (Nativo-Desplegado) y los parámetros termodinámicos se determinaron a partir del ajuste no lineal, utilizando la siguiente ecuación:

$$y = \frac{\left[S_n + S_u \exp\left(\frac{-\Delta G^{H2O} + mx}{RT}\right) \right]}{1 + \exp\left(\frac{-\Delta G^{H2O} + mx}{RT}\right)} \quad (4)$$

Donde:

y = es la señal espectroscópica

S_n y S_u = representan las señales espectroscópicas de proteína plegada y desplegada, respectivamente.

ΔG y m = representan el cambio de energía libre entre el estado plegado y desplegado, y la pendiente de esa transición.

x = es la concentración de desnaturizante.

T = es la temperatura en grados Kelvin

R = es la constante universal de gases 1.987 kcal/mol).

Cinética de desplegamiento

Para las medidas cinéticas de desplegamiento, NS1 de un *stock* concentrado fue diluida 10 veces por mezclado manual en solución 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, y 1 mM DTT con la concentración indicada de Gdm.Cl para cada caso, para una concentración final de proteína de 8 μ M. Las cinéticas monitoreadas por CD fueron registradas a 216 nm de longitud de onda, con un ancho de banda de 10 nm y un tiempo de respuesta de 4 segundos. Se observó una disminución en la señal de elipticidad hasta alcanzar un estado estacionario. Las cinéticas de fluorescencia fueron monitoreadas al medir la fluorescencia del único triptofano en NS1. Para ello, se utilizó una longitud de onda de excitación de 295 nm y una longitud de onda de emisión a los 325 nm. El cambio de fluorescencia (una disminución de la intensidad) fue medido hasta alcanzar un estado estacionario. Todos los experimentos se realizaron a temperatura constante de 20 °C.

Cinética de plegamiento

Para las medidas de plegamiento de NS1, se utilizó una solución *stock* de proteína desplegada y equilibrada por al menos 3 horas en 5.0 M de Gdm.Cl. La misma fue diluida 10 veces por mezclado manual en tampón químico Tris-HCl 10 mM pH 8.0, 200 mM NaCl, y 1 mM DTT

con la concentración indicada de Gdm.Cl, para una concentración final de NS1 de 8 μM . Las cinéticas de fluorescencia fueron monitoreadas con los mismos parámetros descriptos para el desplegado, con un resultante incremento en la intensidad de fluorescencia del triptofano.

Cinéticas de plegado por *Stopped-Flow*

Las cinéticas de plegado fueron realizadas en un instrumento de *stopped-flow* o flujo detenido SX18MV (Applied Photophysics, Leatherhead, UK) por dilución de NS1 desplegada en 5.0 M de Gdm.Cl de un *stock* concentrado a 60 μM en solución 10mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 200 mM NaCl y 1mM DTT. La concentración final de proteína para estos experimentos fue de 6 μM . La longitud de onda de excitación fue de 280 nm y se utilizó un filtro de paso alto de emisión a 320 nm.

Análisis de los datos de plegado y desplegado

Las constantes observadas para cada reacción de plegado y desplegado fue obtenida a partir del ajuste de las cinéticas, utilizando una ecuación de hasta 3 funciones exponenciales (según se requiera):

$$F(t) = \sum A_n \exp(-k_n t) + F_\infty \quad (5)$$

Donde, $F(t)$ y F_∞ son las señales observadas a un tiempo t y tiempo infinito, respectivamente. A_n y k_n son la amplitud del cambio de señal y la constante de velocidad, respectivamente, para cada proceso. Cuando fue requerido se utilizó una función lineal en la fase estacionaria. El ajuste de los datos fue realizado utilizando el programa Profit (Quantum Zurich). El criterio seguido para elegir el mínimo número de exponenciales, que provee del mejor ajuste en cada curva fue el siguiente: 1) dispersión al azar de residuales; 2) reducción significativa del valor de desviación estándar (al menor un quinto del valor del parámetro); 3) mejora significativa del valor de Chi-cuadrado obtenido del ajuste (siempre en relación con la ecuación con menor número de parámetros).

Al tratar los datos de replegado, 3 fases fueron observadas para todas las reacciones, tanto para los experimentos de mezclado manual como para los experimentos de *stopped-flow* o flujo detenido. Como la fase mas lenta de los experimentos de *stopped-flow* y la fase más rápida de los experimentos de replegado por mezclado manual compartieron constantes similares, se realizó un ajuste global de los datos de replegado para la mayoría de las concentraciones de Gdm.Cl probadas, utilizando una ecuación con 5 funciones exponenciales, donde una de las constantes observadas se mantuvo fija, mientras que todas las amplitudes y las demás constantes

fueron ajustadas independientemente. Todas las curvas fueron normalizadas para realizar este ajuste.

Seguido al ajuste de los datos, el logaritmo natural de las constantes observadas en función de la concentración de Gdm.Cl fue utilizada para obtener un gráfico de Chevrón para el plegado de NS1. Asumiendo un modelo de dos estados para el plegado de NS1, se pueden obtener las siguientes relaciones entre las constantes cinéticas y al equilibrio [81]:



$$K_{eq} = k_f / k_u$$

(7)

Donde, U y N son los estados nativo y desplegado, respectivamente, K_{eq} es la constante de plegado al equilibrio, y k_f y k_u son las constantes microscópicas para el plegado y desplegado, respectivamente. K_{eq} se obtuvo de los experimentos realizados al equilibrio, con un valor de 6.48×10^{-8} . La constante k_u fue obtenida del gráfico de Chevrón, por extrapolación del valor del $\ln k_{obs}$ a 0M de Gdm.Cl del ajuste lineal de la rama de desplegado, la cual muestra una dependencia lineal con [Gdm.Cl]. Utilizando el modelo de dos estados descrito en la ecuación 6 y 7, se calculó k_f a partir de K_{eq} y k_u .

El parámetro m_{eq} es una medida de la dependencia de la energía libre de desplegado en función de la concentración de desnaturalizante, y a partir de los experimentos realizado al equilibrio se obtuvo un valor de $2.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$. Los valores de m_{eq} fueron mostrados ser empíricamente proporcionales a cambios en el área accesible al solvente (ΔASA) de la proteína nativa al desplegarse [80]. En forma similar, los parámetros cinéticos m describen la dependencia de la energía libre de activación para las reacciones de plegado y desplegado en función de la concentración de desnaturalizante. El parámetro cinético m_u es considerado reflejar cambios en ΔASA desde en estado desplegado al estado de transición (TSE), mientras que el parámetro m_f refleja cambios en ΔASA entre el estado nativo y el TSE. El parámetro m_u fue obtenido del gráfico de Chevrón, como la pendiente del ajuste lineal de la rama de desplegado, multiplicado por RT , donde R es la constante universal de gases ($1.9872 \times 10^{-3} \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) y T es la temperatura del experimento en °K. Siguiendo el modelo de dos estado, m_{eq} es relacionado con m_u y m_f siguiente manera:

$$m_{eq} = m_u - m_f \quad (8)$$

Por lo tanto, calculamos m_f utilizando la ecuación 8 y los parámetros obtenidos m_{eq} y m_u . Con el fin de obtener información en relación al ocultamiento de superficies accesibles al solvente en el estado de transición, se calculó un parámetro alfa, como se describe a continuación:

$$\alpha = -m_f / m_{eq} \quad (9)$$

El parámetro alfa puede ser interpretado como el porcentaje relativo de área de superficies accesibles al solvente en la reacción de plegamiento partiendo del estado desplegado al TSE. En el caso más simple, este parámetro toma valores entre 0 y 1m donde 1 indica un porcentaje relativo de ocultamiento de áreas de superficie accesibles al solvente en el estado de transición similar al estado nativo, y 0 indica una accesibilidad al solvente en el estado de transición, similar al estado desplegado.

Mecanismo de ensamblado de NS1SOs

Cinética de oligomerización

El proceso de oligomerización fue monitoreado por cambios en la señal de CD en el UV lejano a 220 nm o por cambios en la fluorescencia de ThT a partir de experimentos de salto de temperatura. En estos experimentos, NS1 de una solución *stock* mantenida a 4 °C fue transferida a una cubeta conteniendo 10 mM Tris-HCl pH 8 y DTT 1 mM, mantenida a la temperatura indicada en cada experimento. Los experimentos de dependencia de concentración fueron medidos variando la concentración de NS1 de 2.5 a 10 μ M a 47 °C.

Unión a Tioflavina T (ThT)

La reacción de oligomerización fue medida mediante el incremento en la fluorescencia de ThT en el tiempo, luego transferir NS1 de un *stock* concentrado a una cubeta conteniendo *buffer* equilibrado con una concentración final de ThT de 20 μ M. NS1 no une ThT, mientras que NS1SOs si lo hace. Por lo tanto, el incremento en la fluorescencia de ThT fue utilizado como sonda de oligomerización de NS1. La longitud de onda de excitación utilizada fue de 446 nm y los cambios en la señal fueron monitoreados a 490 nm, utilizando un ancho de banda de excitación de 1 nm y ancho de banda de emisión de 20 nm.

Oligomerización por dispersión de luz dinámica

La distribución del tamaño de partículas para NS1 fue obtenida por un instrumento de DLS Zetasizer Nano S, previamente descrito. Se utilizó una concentración de NS1 de 17 μM en solución 10 mM Tris-HCl pH 8 con 1 mM DTT. Esta muestra fue incubada a 40 °C (controlada por un sistema de control Peltier) y los cambios en el tiempo del tamaño de las partículas fue monitoreado. Cada medición fue un promedio de 10 escaneos de 10 segundos cada uno.

Experimentos de doble salto de temperatura

NS1 de un *stock* concentrado mantenido a 4 °C fue transferido a una solución 10 mM Tris-HCl pH 8 con 1 mM DTT a 47 °C, con una concentración final de proteína de 12 μM . Luego de diferentes tiempos en el rango de 50 a 2000 segundos, la muestra fue transferida a una celda mantenida a 20 °C y la señal de CD en el UV lejano a los 220 nm fue monitoreada. Luego de alcanzar la fase estacionaria, se midió el espectro en el UV lejano y las muestras fueron corridas en una columna de exclusión molecular S-75.

Análisis de los datos de oligomerización

Las curvas de los experimentos de dependencia de concentración fueron normalizados y utilizados para el análisis del modelo. Para la determinación del tamaño del núcleo, se utilizó un modelo limitado cinéticamente, desarrollado por Zlotnick et al [93],

$$\log[\text{NS1SOs}] = \log k + n \times \log[\text{NS1}_{\text{monómero}}] \quad (10)$$

Donde, k es una constante de proporcionalidad y n es el tamaño del núcleo. La fluorescencia de ThT fue utilizado como sonda del proceso de ensamblado de NS1SOs. La concentración de NS1SOs y la concentración de NS1 representan la concentración de oligómeros y monómeros, respectivamente y fueron calculados a cinco tiempos diferentes a lo largo de la fase exponencial (en el rango de 150 a 600 segundos). Para cada tiempo y concentración, se definió: $[\text{NS1SOs}] = [\text{NS1 total}] \times \text{la fluorescencia normalizada de ThT}$; y que $[\text{NS1}_{\text{monómero}}] = [\text{NS1 total}] \times (1 - \text{la fluorescencia normalizada de ThT})$. Estos parámetros se utilizaron para crear un gráfico los-log. El tamaño del núcleo fue entonces estimado del promedio de las pendientes del gráfico log-log de $[\text{NS1SOs}]$ en función de $[\text{NS1}_{\text{monómero}}]$ para todas las curvas. El valor obtenido fue un promedio de los valores obtenidos de cada *set* de datos de los diferentes tiempos analizados.

La velocidad de elongación para cada curva fue determinada a partir de la pendiente de las mismas, tomando puntos que tienen como centro al 25 % del cambio de señal. El orden de la reacción de ensamblado fue determinado a partir de la pendiente de un gráfico log-log de la

velocidad de elongación en función de la concentración total de NS1, como se muestra a continuación:

$$\log(VE) = l \times \log[NSI_{total}] + C \quad (11)$$

Donde, VE es la velocidad de elongación, NSI_{Total} es la concentración total de NS1, l es el orden de la reacción y C es una constante.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lamb RA, Parks, G.D. (2007) Paramyxoviridae: The viruses and Their Replication. In: Knipe D.M. HPM, editor. *Fields in Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
2. Collins PL, and Crowe, J. E. (2007) Respiratory syncytial virus and metapneumovirus. In: Knipe DM, Howley, P.M., editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 1601-1646.
3. Samal SS (2011) *The Biology of Paramyxoviruses*. Norfolk, UK: Caister Academic Press.
4. Freymuth F (2004) The human metapneumovirus. In: Agut H BF, Ingrand D, Tordo N, editor. *Virologie*. Agut H, Barin F, Ingrand D, Tordo N ed. pp. 413-423.
5. Klein MI, Coviello S, Bauer G, Benitez A, Serra ME, et al. (2006) The impact of infection with human metapneumovirus and other respiratory viruses in young infants and children at high risk for severe pulmonary disease. *J Infect Dis* 193: 1544-1551.
6. Viegas M, Barrero PR, Maffey AF, Mistchenko AS (2004) Respiratory viruses seasonality in children under five years of age in Buenos Aires, Argentina: a five-year analysis. *J Infect* 49: 222-228.
7. Walsh EE, Falsey AR (2012) Respiratory syncytial virus infection in adult populations. *Infect Disord Drug Targets* 12: 98-102.
8. Empey KM, Peebles RS, Jr., Kolls JK (2010) Pharmacologic advances in the treatment and prevention of respiratory syncytial virus. *Clin Infect Dis* 50: 1258-1267.
9. Collins PL, Melero JA (2011) Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. *Virus Res* 162: 80-99.
10. Welliver RC (2004) Respiratory syncytial virus infection: therapy and prevention. *Paediatr Respir Rev* 5 Suppl A: S127-133.
11. Mufson MA, Orvell C, Rafnar B, Norrby E (1985) Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 66 (Pt 10): 2111-2124.
12. Parveen S, Sullender WM, Fowler K, Lefkowitz EJ, Kapoor SK, et al. (2006) Genetic variability in the G protein gene of group A and B respiratory syncytial viruses from India. *J Clin Microbiol* 44: 3055-3064.
13. Matheson JW, Rich FJ, Cohet C, Grimwood K, Huang QS, et al. (2006) Distinct patterns of evolution between respiratory syncytial virus subgroups A and B from New Zealand isolates collected over thirty-seven years. *J Med Virol* 78: 1354-1364.
14. Martinello RA, Chen MD, Weibel C, Kahn JS (2002) Correlation between respiratory syncytial virus genotype and severity of illness. *J Infect Dis* 186: 839-842.
15. Ling Z, Tran KC, Arnold JJ, Teng MN (2008) Purification and characterization of recombinant human respiratory syncytial virus nonstructural protein NS1. *Protein Expr Purif* 57: 261-270.
16. Conzelmann KK (2005) Transcriptional activation of alpha/beta interferon genes: interference by nonsegmented negative-strand RNA viruses. *J Virol* 79: 5241-5248.
17. Fontana JM, Bankamp B, Rota PA (2008) Inhibition of interferon induction and signaling by paramyxoviruses. *Immunol Rev* 225: 46-67.
18. Parks GD, Alexander-Miller MA Paramyxovirus activation and inhibition of innate immune responses. *J Mol Biol* 425: 4872-4892.
19. Basler CF, Garcia-Sastre A (2002) Viruses and the type I interferon antiviral system: induction and evasion. *Int Rev Immunol* 21: 305-337.
20. Randall RE, Goodbourn S (2008) Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* 89: 1-47.
21. Myong S, Cui S, Cornish PV, Kirchhofer A, Gack MU, et al. (2009) Cytosolic viral sensor RIG-I is a 5'-triphosphate-dependent translocase on double-stranded RNA. *Science* 323: 1070-1074.
22. Melchjorsen J (2013) Learning from the messengers: innate sensing of viruses and cytokine regulation of immunity - clues for treatments and vaccines. *Viruses* 5: 470-527.

23. Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, et al. (2005) IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 6: 981-988.
24. Bowie AG, Unterholzner L (2008) Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 8: 911-922.
25. Hiscott J (2007) Triggering the innate antiviral response through IRF-3 activation. *J Biol Chem* 282: 15325-15329.
26. Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, et al. (2000) Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 1: 398-401.
27. Sasai M, Shingai M, Funami K, Yoneyama M, Fujita T, et al. (2006) NAK-associated protein 1 participates in both the TLR3 and the cytoplasmic pathways in type I IFN induction. *J Immunol* 177: 8676-8683.
28. Israel A (2000) The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB? *Trends Cell Biol* 10: 129-133.
29. Schindler C, Plumlee C (2008) Interferons pen the JAK-STAT pathway. *Semin Cell Dev Biol* 19: 311-318.
30. Stark GR (2007) How cells respond to interferons revisited: from early history to current complexity. *Cytokine Growth Factor Rev* 18: 419-423.
31. Sen GC, Sarkar SN (2007) The interferon-stimulated genes: targets of direct signaling by interferons, double-stranded RNA, and viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 316: 233-250.
32. Spann KM, Tran KC, Chi B, Rabin RL, Collins PL (2004) Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages [corrected]. *J Virol* 78: 4363-4369.
33. Spann KM, Tran KC, Collins PL (2005) Effects of nonstructural proteins NS1 and NS2 of human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF-kappaB, and proinflammatory cytokines. *J Virol* 79: 5353-5362.
34. Lo MS, Brazas RM, Holtzman MJ (2005) Respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 mediate inhibition of Stat2 expression and alpha/beta interferon responsiveness. *J Virol* 79: 9315-9319.
35. Bossert B, Conzelmann KK (2002) Respiratory syncytial virus (RSV) nonstructural (NS) proteins as host range determinants: a chimeric bovine RSV with NS genes from human RSV is attenuated in interferon-competent bovine cells. *J Virol* 76: 4287-4293.
36. Ramaswamy M, Shi L, Varga SM, Barik S, Behlke MA, et al. (2006) Respiratory syncytial virus nonstructural protein 2 specifically inhibits type I interferon signal transduction. *Virology* 344: 328-339.
37. Jin H, Cheng X, Traina-Dorge VL, Park HJ, Zhou H, et al. (2003) Evaluation of recombinant respiratory syncytial virus gene deletion mutants in African green monkeys for their potential as live attenuated vaccine candidates. *Vaccine* 21: 3647-3652.
38. Whitehead SS, Bukreyev A, Teng MN, Firestone CY, St Claire M, et al. (1999) Recombinant respiratory syncytial virus bearing a deletion of either the NS2 or SH gene is attenuated in chimpanzees. *J Virol* 73: 3438-3442.
39. Jin H, Zhou H, Cheng X, Tang R, Munoz M, et al. (2000) Recombinant respiratory syncytial viruses with deletions in the NS1, NS2, SH, and M2-2 genes are attenuated in vitro and in vivo. *Virology* 273: 210-218.
40. Swedan S, Musiyenko A, Barik S (2009) Respiratory syncytial virus nonstructural proteins decrease levels of multiple members of the cellular interferon pathways. *J Virol* 83: 9682-9693.
41. Boyapalle S, Wong T, Garay J, Teng M, San Juan-Vergara H, et al. (2012) Respiratory syncytial virus NS1 protein colocalizes with mitochondrial antiviral signaling protein MAVS following infection. *PLoS One* 7: e29386.

42. Ling Z, Tran KC, Teng MN (2009) Human respiratory syncytial virus nonstructural protein NS2 antagonizes the activation of beta interferon transcription by interacting with RIG-I. *J Virol* 83: 3734-3742.
43. Swedan S, Andrews J, Majumdar T, Musiyenko A, Barik S (2011) Multiple functional domains and complexes of the two nonstructural proteins of human respiratory syncytial virus contribute to interferon suppression and cellular location. *J Virol* 85: 10090-10100.
44. Ren J, Liu T, Pang L, Li K, Garofalo RP, et al. (2011) A novel mechanism for the inhibition of interferon regulatory factor-3-dependent gene expression by human respiratory syncytial virus NS1 protein. *J Gen Virol* 92: 2153-2159.
45. Elliott J, Lynch OT, Suessmuth Y, Qian P, Boyd CR, et al. (2007) Respiratory syncytial virus NS1 protein degrades STAT2 by using the Elongin-Cullin E3 ligase. *J Virol* 81: 3428-3436.
46. Moore EC, Barber J, Tripp RA (2008) Respiratory syncytial virus (RSV) attachment and nonstructural proteins modify the type I interferon response associated with suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins and IFN-stimulated gene-15 (ISG15). *Virol J* 5: 116.
47. Goswami R, Majumdar T, Dhar J, Chattopadhyay S, Bandyopadhyay SK, et al. (2013) Viral degradasome hijacks mitochondria to suppress innate immunity. *Cell Res* 23: 1025-1042.
48. Hengst U, Kiefer P (2000) Domains of human respiratory syncytial virus P protein essential for homodimerization and for binding to N and NS1 protein. *Virus Genes* 20: 221-225.
49. Wu W, Tran KC, Teng MN, Heesom KJ, Matthews DA, et al. (2012) The interactome of the human respiratory syncytial virus NS1 protein highlights multiple effects on host cell biology. *J Virol* 86: 7777-7789.
50. Hastie ML, Headlam MJ, Patel NB, Bukreyev AA, Buchholz UJ, et al. (2012) The human respiratory syncytial virus nonstructural protein 1 regulates type I and type II interferon pathways. *Mol Cell Proteomics* 11: 108-127.
51. Tan YR, Peng D, Chen CM, Qin XQ (2012) Nonstructural protein-1 of respiratory syncytial virus regulates HOX gene expression through interacting with histone. *Mol Biol Rep* 40: 675-679.
52. Bitko V, Shulyayeva O, Mazumder B, Musiyenko A, Ramaswamy M, et al. (2007) Nonstructural proteins of respiratory syncytial virus suppress premature apoptosis by an NF-kappaB-dependent, interferon-independent mechanism and facilitate virus growth. *J Virol* 81: 1786-1795.
53. Munir S, Le Nouen C, Luongo C, Buchholz UJ, Collins PL, et al. (2008) Nonstructural proteins 1 and 2 of respiratory syncytial virus suppress maturation of human dendritic cells. *J Virol* 82: 8780-8796.
54. Munir S, Hillyer P, Le Nouen C, Buchholz UJ, Rabin RL, et al. (2011) Respiratory syncytial virus interferon antagonist NS1 protein suppresses and skews the human T lymphocyte response. *PLoS Pathog* 7: e1001336.
55. Atreya PL, Peeples ME, Collins PL (1998) The NS1 protein of human respiratory syncytial virus is a potent inhibitor of minigenome transcription and RNA replication. *J Virol* 72: 1452-1461.
56. Gotoh B, Komatsu T, Takeuchi K, Yokoo J (2001) Paramyxovirus accessory proteins as interferon antagonists. *Microbiol Immunol* 45: 787-800.
57. Paterson RG, Leser GP, Shaughnessy MA, Lamb RA (1995) The paramyxovirus SV5 V protein binds two atoms of zinc and is a structural component of virions. *Virology* 208: 121-131.
58. Li T, Chen X, Garbutt KC, Zhou P, Zheng N (2006) Structure of DDB1 in complex with a paramyxovirus V protein: viral hijack of a propeller cluster in ubiquitin ligase. *Cell* 124: 105-117.

59. Poole E, He B, Lamb RA, Randall RE, Goodbourn S (2002) The V proteins of simian virus 5 and other paramyxoviruses inhibit induction of interferon-beta. *Virology* 303: 33-46.
60. Schuhmann KM, Pfaller CK, Conzelmann KK (2011) The measles virus V protein binds to p65 (RelA) to suppress NF-kappaB activity. *J Virol* 85: 3162-3171.
61. Sakaguchi T, Irie T, Kuwayama M, Ueno T, Yoshida A, et al. (2011) Analysis of interaction of Sendai virus V protein and melanoma differentiation-associated gene 5. *Microbiol Immunol* 55: 760-767.
62. Irie T, Kiyotani K, Igarashi T, Yoshida A, Sakaguchi T (2012) Inhibition of interferon regulatory factor 3 activation by paramyxovirus V protein. *J Virol* 86: 7136-7145.
63. Pfaller CK, Conzelmann KK (2008) Measles virus V protein is a decoy substrate for IkappaB kinase alpha and prevents Toll-like receptor 7/9-mediated interferon induction. *J Virol* 82: 12365-12373.
64. Rodriguez JJ, Parisien JP, Horvath CM (2002) Nipah virus V protein evades alpha and gamma interferons by preventing STAT1 and STAT2 activation and nuclear accumulation. *J Virol* 76: 11476-11483.
65. Ulane CM, Kentsis A, Cruz CD, Parisien JP, Schneider KL, et al. (2005) Composition and assembly of STAT-targeting ubiquitin ligase complexes: paramyxovirus V protein carboxyl terminus is an oligomerization domain. *J Virol* 79: 10180-10189.
66. Motz C, Schuhmann KM, Kirchhofer A, Moldt M, Witte G, et al. (2013) Paramyxovirus V proteins disrupt the fold of the RNA sensor MDA5 to inhibit antiviral signaling. *Science* 339: 690-693.
67. Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, Pyles G, Chanock RM, et al. (1969) Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol* 89: 422-434.
68. Castilow EM, Olson MR, Varga SM (2007) Understanding respiratory syncytial virus (RSV) vaccine-enhanced disease. *Immunol Res* 39: 225-239.
69. Delgado MF, Coviello S, Monsalvo AC, Melendi GA, Hernandez JZ, et al. (2009) Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease. *Nat Med* 15: 34-41.
70. Karron RA, Wright PF, Belshe RB, Thumar B, Casey R, et al. (2005) Identification of a recombinant live attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate that is highly attenuated in infants. *J Infect Dis* 191: 1093-1104.
71. Wright PF, Karron RA, Madhi SA, Treanor JJ, King JC, et al. (2006) The interferon antagonist NS2 protein of respiratory syncytial virus is an important virulence determinant for humans. *J Infect Dis* 193: 573-581.
72. Miroux B, Walker JE (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* 260: 289-298.
73. Pribic R, van Stokkum IH, Chapman D, Haris PI, Bloemendal M (1993) Protein secondary structure from Fourier transform infrared and/or circular dichroism spectra. *Anal Biochem* 214: 366-378.
74. Lakowicz JR (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*: Springer.
75. Fasman G (1999) *Circular Dichroism and The Conformational Analysis of Biomolecules*. New York: Press, P, Ed.
76. Fontana A, de Laureto PP, Spolaore B, Frare E, Picotti P, et al. (2004) Probing protein structure by limited proteolysis. *Acta Biochim Pol* 51: 299-321.
77. Merrill (1993) NMR diffusion measurements using a composite gradient PGSE sequence. *J Magn Reson*.
78. Uversky VN (2002) What does it mean to be natively unfolded? *Eur J Biochem* 269: 2-12.

79. Pace CN (1986) Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol* 131: 266-280.
80. Myers JK, Pace CN, Scholtz JM (1995) Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci* 4: 2138-2148.
81. Buchner J, Kiefhaber T (2005) *Protein folding handbook*; Thomas BJaK, editor: Weinheim: Wiley-VCH.
82. Leffler JE (1953) Parameters for the Description of Transition States. *Science* 117: 340-341.
83. Zhang T, Faraggi E, Xue B, Dunker AK, Uversky VN, et al. SPINE-D: accurate prediction of short and long disordered regions by a single neural-network based method. *J Biomol Struct Dyn* 29: 799-813.
84. Brandts JF, Halvorson HR, Brennan M (1975) Consideration of the Possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues. *Biochemistry* 14: 4953-4963.
85. Tsytlonok M, Itzhaki LS (2012) The how's and why's of protein folding intermediates. *Arch Biochem Biophys* 531: 14-23.
86. Kiefhaber T, Quaas R, Hahn U, Schmid FX (1990) Folding of ribonuclease T1. 1. Existence of multiple unfolded states created by proline isomerization. *Biochemistry* 29: 3053-3061.
87. Kiefhaber T, Schmid FX (1992) Kinetic coupling between protein folding and prolyl isomerization. II. Folding of ribonuclease A and ribonuclease T1. *J Mol Biol* 224: 231-240.
88. Sanchez IE, Morillas M, Zobeley E, Kiefhaber T, Glockshuber R (2004) Fast folding of the two-domain semliki forest virus capsid protein explains co-translational proteolytic activity. *J Mol Biol* 338: 159-167.
89. Pappenberger G, Aygun H, Engels JW, Reimer U, Fischer G, et al. (2001) Nonprolyl cis peptide bonds in unfolded proteins cause complex folding kinetics. *Nat Struct Biol* 8: 452-458.
90. Morris AM, Watzky MA, Finke RG (2009) Protein aggregation kinetics, mechanism, and curve-fitting: a review of the literature. *Biochim Biophys Acta* 1794: 375-397.
91. Wang J, Xia H, Zhang Y, Lu H, Kamat R, et al. (2013) Nucleation-controlled polymerization of nanoparticles into supramolecular structures. *J Am Chem Soc* 135: 11417-11420.
92. Bemporad F, Chiti F (2012) Protein misfolded oligomers: experimental approaches, mechanism of formation, and structure-toxicity relationships. *Chem Biol* 19: 315-327.
93. Zlotnick A, Johnson JM, Wingfield PW, Stahl SJ, Endres D (1999) A theoretical model successfully identifies features of hepatitis B virus capsid assembly. *Biochemistry* 38: 14644-14652.
94. Claes PM KA (1992) *An on-line dynamic light scattering instrument for macromolecular characterization*; SE Harding VS, editor.
95. Chemes LB, Glavina J, Faivovich J, de Prat-Gay G, Sanchez IE (2012) Evolution of linear motifs within the papillomavirus E7 oncoprotein. *J Mol Biol* 422: 336-346.
96. Noval MG, Gallo M, Perrone S, Salvay AG, Chemes LB, et al. (2013) Conformational dissection of a viral intrinsically disordered domain involved in cellular transformation. *PLoS One* 8: e72760.
97. Kim PS, Baldwin RL (1982) Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding. *Annu Rev Biochem* 51: 459-489.
98. Kim PS, Baldwin RL (1990) Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Annu Rev Biochem* 59: 631-660.
99. Fassolari M, Chemes LB, Gallo M, Smal C, Sanchez IE, et al. (2013) Minute-timescale prolyl isomerization governs antibody recognition of an intrinsically disordered immunodominant epitope. *J Biol Chem*.
100. Andreotti AH (2006) Opening the pore hinges on proline. *Nat Chem Biol* 2: 13-14.

101. Chiti F, Webster P, Taddei N, Clark A, Stefani M, et al. (1999) Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 3590-3594.
102. Chiti F, Taddei N, Bucciantini M, White P, Ramponi G, et al. (2000) Mutational analysis of the propensity for amyloid formation by a globular protein. *EMBO J* 19: 1441-1449.
103. Haass C, Selkoe DJ (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 101-112.
104. Pepys MB, Hawkins PN, Booth DR, Vigushin DM, Tennent GA, et al. (1993) Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis. *Nature* 362: 553-557.
105. Gejyo F, Yamada T, Odani S, Nakagawa Y, Arakawa M, et al. (1985) A new form of amyloid protein associated with chronic hemodialysis was identified as beta 2-microglobulin. *Biochem Biophys Res Commun* 129: 701-706.
106. Ferrao-Gonzales AD, Souto SO, Silva JL, Foguel D (2000) The preaggregated state of an amyloidogenic protein: hydrostatic pressure converts native transthyretin into the amyloidogenic state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6445-6450.
107. Chiti F, Dobson CM (2009) Amyloid formation by globular proteins under native conditions. *Nat Chem Biol* 5: 15-22.
108. Fowler DM, Koulov AV, Alory-Jost C, Marks MS, Balch WE, et al. (2006) Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS Biol* 4: e6.
109. Alonso LG, Garcia-Alai MM, Smal C, Centeno JM, Iacono R, et al. (2004) The HPV16 E7 viral oncoprotein self-assembles into defined spherical oligomers. *Biochemistry* 43: 3310-3317.
110. Wetzler DE, Castano EM, de Prat-Gay G (2007) A quasi-spontaneous amyloid route in a DNA binding gene regulatory domain: The papillomavirus HPV16 E2 protein. *Protein Sci* 16: 744-754.
111. Smal C, Alonso LG, Wetzler DE, Heer A, de Prat Gay G (2012) Ordered self-assembly mechanism of a spherical oncoprotein oligomer triggered by zinc removal and stabilized by an intrinsically disordered domain. *PLoS One* 7: e36457.
112. Freire E, Oddo C, Frappier L, de Prat-Gay G (2008) Kinetically driven refolding of the hyperstable EBNA1 origin DNA-binding dimeric beta-barrel domain into amyloid-like spherical oligomers. *Proteins* 70: 450-461.
113. Dantur K, Alonso L, Castano E, Morelli L, Centeno-Crowley JM, et al. (2009) Cytosolic accumulation of HPV16 E7 oligomers supports different transformation routes for the prototypic viral oncoprotein: the amyloid-cancer connection. *Int J Cancer* 125: 1902-1911.
114. Chevalier C, Al Bazzal A, Vidic J, Fevrier V, Bourdieu C, et al. (2010) PB1-F2 influenza A virus protein adopts a beta-sheet conformation and forms amyloid fibers in membrane environments. *J Biol Chem* 285: 13233-13243.
115. Lomakin A, Chung DS, Benedek GB, Kirschner DA, Teplow DB (1996) On the nucleation and growth of amyloid beta-protein fibrils: detection of nuclei and quantitation of rate constants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 1125-1129.
116. Bader R, Bamford R, Zurdo J, Luisi BF, Dobson CM (2006) Probing the mechanism of amyloidogenesis through a tandem repeat of the PI3-SH3 domain suggests a generic model for protein aggregation and fibril formation. *J Mol Biol* 356: 189-208.
117. Gosal WS, Morten IJ, Hewitt EW, Smith DA, Thomson NH, et al. (2005) Competing pathways determine fibril morphology in the self-assembly of beta2-microglobulin into amyloid. *J Mol Biol* 351: 850-864.
118. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

ANEXO


```

HRSV-Along          MGSNSLSMIKVRQLQNLFDNDEVALLKITCYTDKLIHLTALAKAVIHTIKLNGIVFVHVI 60
HRSV-AU35030      MGSNSLSMIKVRQLQNLFDNDEVALLKITCYTDKLIHLTALAKAVIHTIKLNGIVFVHVI 60
HRSV-A2           MGSNSLSMIKVRQLQNLFDNDEVALLKITCYTDKLIHLTALAKAVIHTIKLNGIVFVHVI 60
HRSV-B9320       MGSNSLSMIKVRQLQNLFDNDEVALLKITCYTDKLIHLTALAKAAIHTIKLNGIVFIHVI 60
HRSVB1           MGSNSLSMIKVRQLQNLFDNDEVALLKITCYTDKLIHLTALAKAAIHTIKLNGIVFIHVI 60
HRSV-BP24568     MGSNSLSMIKVRQLQNLFDNDEVALLKITCYTDKLIHLTALAKAVIHTIKLNGIVFIHVI 60
**.*
TSSDICPNNIIVVKSNTTTPALQNGGYIEMMELTHCSQPNGLIDDNCEIKFSKKLSDS 120
TSSDICPNNIIVVKSNTTTPALQNGGYIEMMELTHCSQPNGLIDDNCEIKFSKKLSDS 120
TSSDICPNNIIVVKSNTTTPVLPQNGGYIEMMELTHCSQPNGLIDDNCEIKFSKKLSDS 120
TSSEVCPDNNIIVVKSNTTTPILQNGGYIEMELIELTHCSQLNGLMDDNCEIKFSKRLSDS 120
TSSEVCPDNNIIVVKSNTTTPILQNGGYIEMELIELTHCSQLNGLMDDNCEIKFSKRLSDS 120
TSSEVCPDNNIIVVKSNTTTPILQNGGYIEMELIELTHCSQLNGLMDDNCEIKFSKRLSDS 120
***.*.*
TNTNYMQLSELLGFDLNP 139
TNTNYMQLSELLGFDLNP 139
TNTNYMQLSELLGFDLNP 139
VNTDYNQISDLLGLDLS 139
VNTNYMQLSELLGFDLNP 139
VNTNYMQLSELLGFDLNP 139
***.*.*

```

Figura suplementaria A1. Alineamiento múltiple de secuencias de NS1 humanas. Se muestra el alineamiento múltiple de secuencias de NS1 humanas de los subtipo virales A y B. Secuencias del subtipo A: Long, U35030, A2; secuencias del subtipo B: 9320, B1 y P24568.

```

HRSVA2      MGSNLSMIKVR LQNLFDNDEVALLKITCVTDKLIHLTNALAKAVIHTIKLNGIVFVHVI 60
HRSVB1      MGCNLSMIKVR LQNLFDNDEVALLKITCVTDKLIHLTNALAKAAIHTIKLNGIVFIHVI 60
NS1_BRSVA   MGSETLSVIQVRLRNIYDNDKVALLKITCHIMRLILLTHLAKSVIHTIKLSGIVFIHII 60
NS1_MPV15   NGCNVMMELDYG-----GRAAWLAFHITWFDKRSDLLETILRGARVCNTWQDQRLSVYLV 53
          * * : : * * * * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : :
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

HRSVA2      TSSDICPNMNIIVVKS NFTTIPV LQNGGYIEMMELTHCSQPNGLLDDNCEIKFSKRLSDS 120
HRSVB1      TSSEVCPDNNIVVKS NFTTIPV LQNGGYIEMELIETHCSQLNGLLMDDNCEIKFSKRLSDS 120
NS1_BRSVA   TSSDYCPTSDIINSANFTSMPILQNGGYIEMELMELTHCFQINGLIDDNCEITFSKRLSDS 120
NS1_MPV15   G-RDCNLLRPFVQA AKFIHN--TRRG-----QTLTHWFIKNI VFSS-----TCQETEP 98
          : : : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : :
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

HRSVA2      TMTWYMNQLSELLGFDLMP-----139
HRSVB1      VMTWYMNQISDLLGLD LMS-----139
NS1_BRSVA   ELAKYSNQLSTLLGLM-----136
NS1_MPV15   PIDPTCELLVELLISG-----113
          : : : : * * : :
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

```

Figura suplementaria A2. Alineamiento múltiple de secuencias de NS1 de diferentes especies. Se muestra el alineamiento de secuencias de NS1 humana de los subtipos A y B (HRSVA2 y HRSVB1) con proteínas homólogas de la especie bovina (BRSVA) y de la especie murina (MPV15).

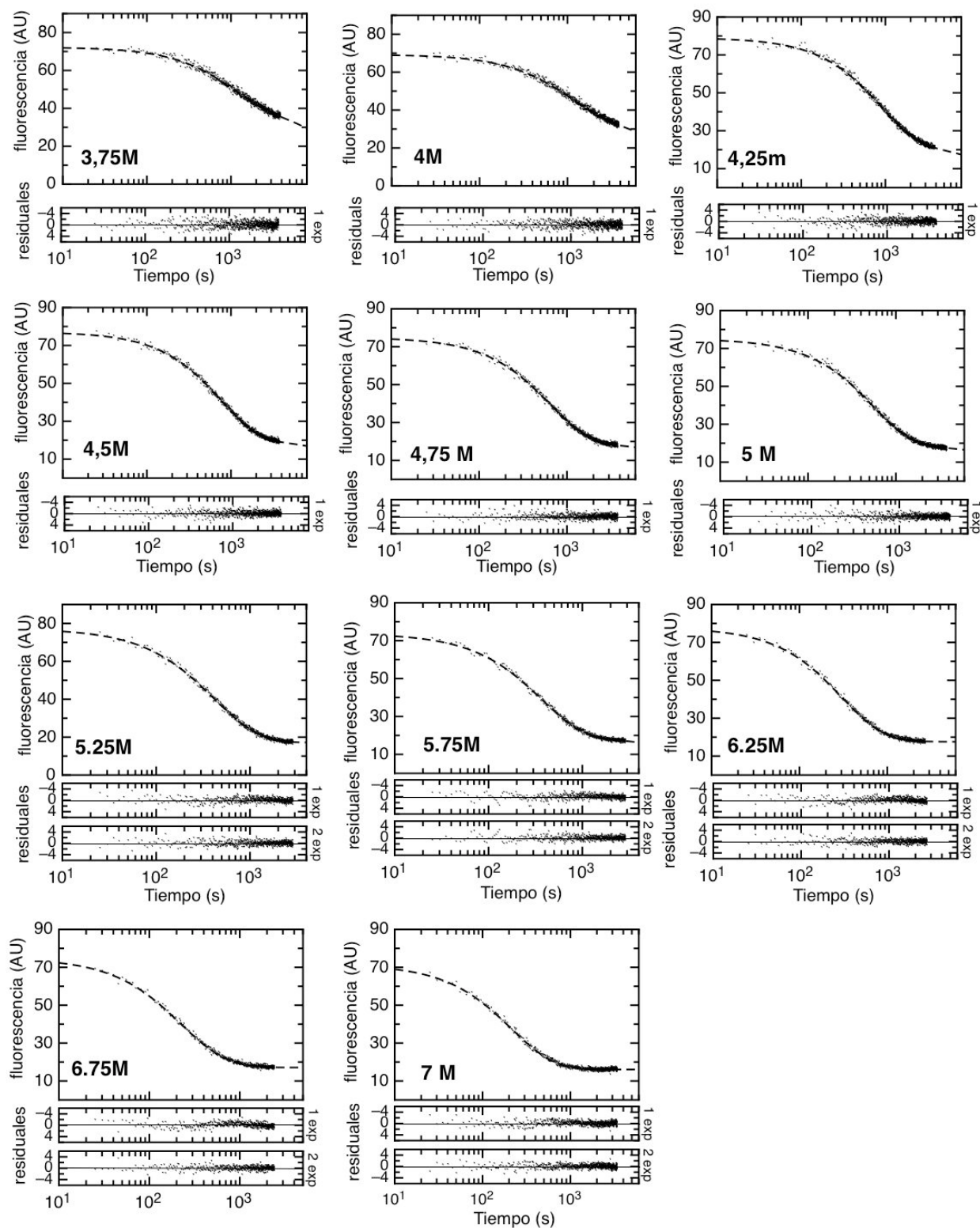


Figura suplementaria A3 Cinética de desplegamiento con Gdm.Cl monitoreado por fluorescencia. Se muestran las cinéticas de desplegamiento, monitoreado por la fluorescencia del triptofano a 325 nm realizadas por mezclado manual a diferentes concentraciones de Gdm.Cl. Las curvas fueron ajustadas utilizando funciones exponenciales simples y dobles. La línea punteada indica el mejor ajuste obtenido, con sus residuales (en rojo) debajo de cada gráfico. Se utilizó una concentración de NS1 de 8 μ M.

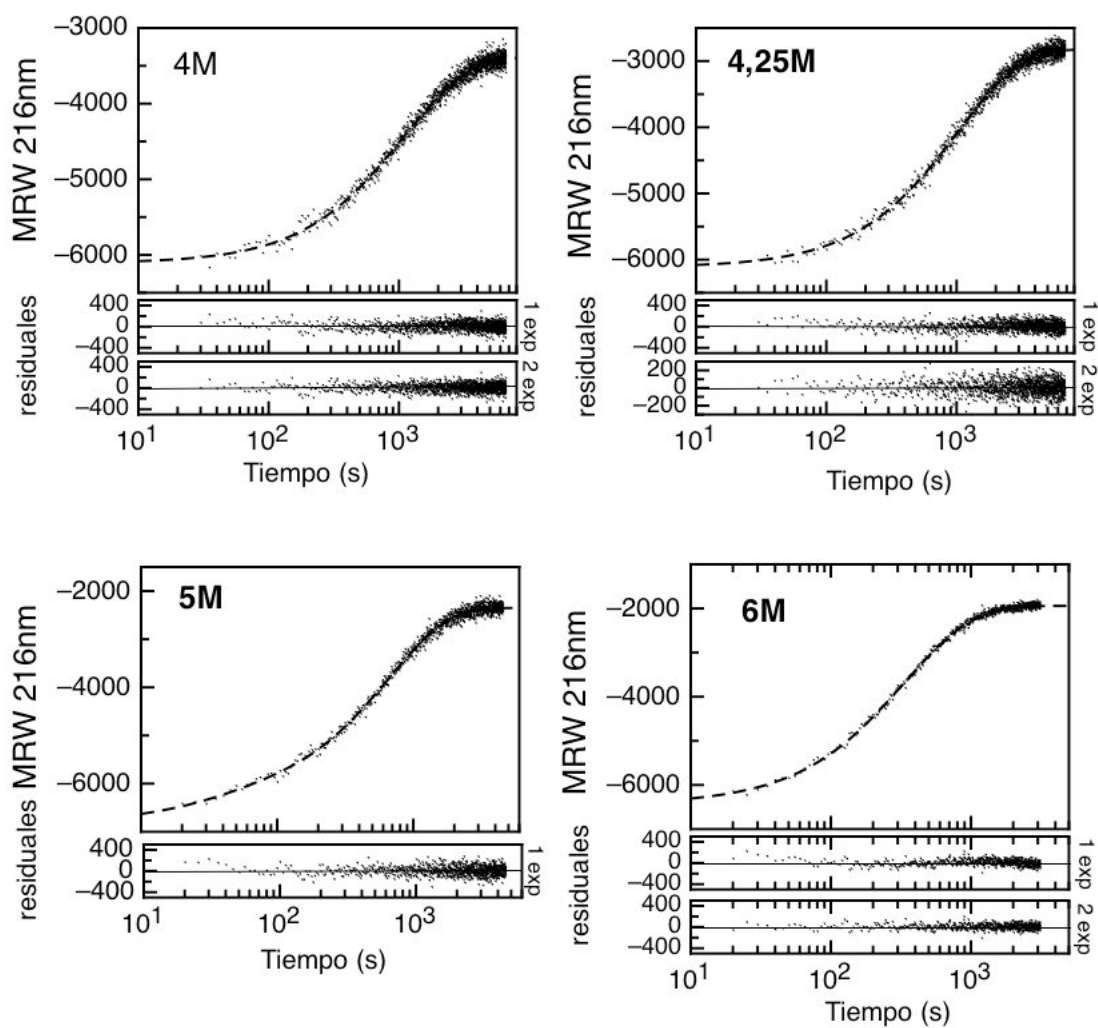


Figura suplementaria A4 Cinética de desplegamiento por Gdm.Cl, monitoreado por dicroísmo circular. Cinética de desplegamiento a diferentes concentraciones de Gdm.Cl. Las curvas fueron ajustadas utilizando funciones exponenciales simples y dobles. La línea punteada indica el mejor ajuste obtenido, con sus residuales debajo de cada gráfico. Se utilizó una concentración de NS1 de 8 μ M.

Tabla suplementaria A1 - Constantes obtenidas del desplegamiento de NS1 por fluorescencia

[Gdm.Cl] (M)	$k_1 s^{-1}^{\text{a}}$	% A_1^*	$k_2 s^{-1}^{\text{a}}$	% A_2^*
3.75	$(9.7 \pm 0.4) \times 10^{-4}$	100	-	-
4.0	$(9.8 \pm 0.4) \times 10^{-4}$	100	-	-
4.25	$(1.1 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	100	-	-
4.5	$(1.3 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	100	-	-
4.75	$(1.6 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	100	-	-
5.0	$(1.8 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	100	-	-
5.25	$(3.6 \pm 0.8) \times 10^{-3}$	38	$(1.8 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	62
5.75	$(3.8 \pm 0.8) \times 10^{-3}$	47	$(2.0 \pm 0.3) \times 10^{-3}$	53
6.0	$(4.6 \pm 0.8) \times 10^{-3}$	38	$(2.4 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	62
6.25	$(3.7 \pm 0.3) \times 10^{-3}$	87	$(1.6 \pm 0.4) \times 10^{-3}$	13
6.75	$(5.4 \pm 0.4) \times 10^{-3}$	75	$(2.2 \pm 0.3) \times 10^{-3}$	25
7.0	$(6.2 \pm 0.9) \times 10^{-3}$	51	$(3.2 \pm 0.4) \times 10^{-3}$	49

^aConstantes observadas para cada condición de desnaturalizante.

* Valores relativos de amplitudes obtenidos a partir de los datos de los ajustes realizados para cada condición y los valores correspondientes a proteína desplegada y plegada.

Tabla suplementaria A2 - Constantes obtenidas del desplegamiento de NS1 por dicroísmo circular

[Gdm.Cl] (M)	$k_1 s^{-1+}$	% A_1^*	$k_2 s^{-1+}$	% A_2^*
4.0	$(9.4 \pm 0.2) \times 10^{-4}$	100	-	-
4.25	$(9.7 \pm 0.1) \times 10^{-4}$	100	-	-
5.0	$(1.6 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	100	-	-
6.0	$(4.0 \pm 0.5) \times 10^{-3}$	52	$(2.0 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	48

⁺Constantes observadas para cada condición de desnaturalizante.

* Valores relativos de amplitudes obtenidos a partir de los datos de los ajustes realizados para cada condición y los valores correspondientes a proteína desplegada y plegada.

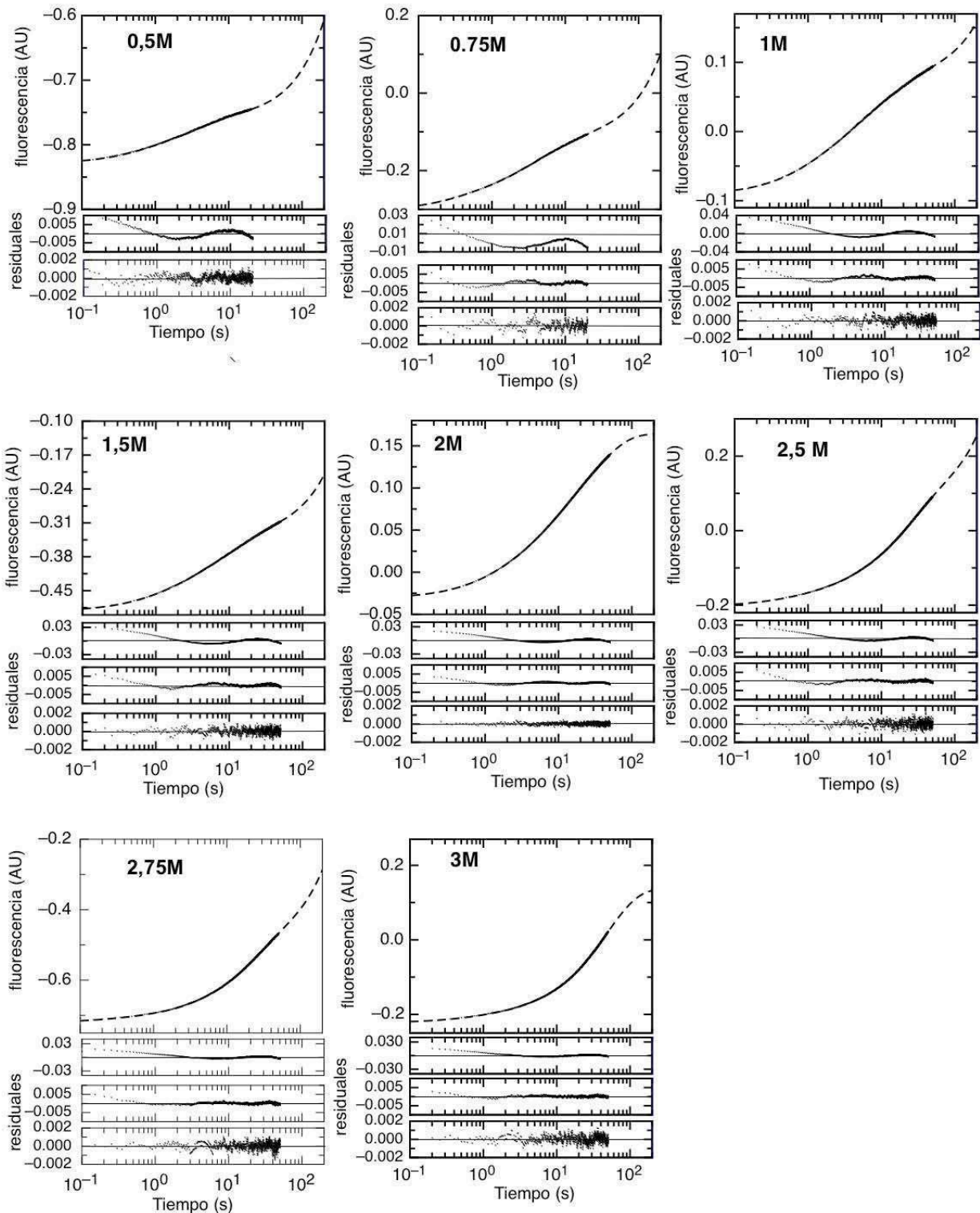


Figura suplementaria A5 Cinética de plegamiento de NS1 por “stopped flow”. Se muestra la cinética de plegamiento monitoreada por “stopped flow” realizado a diferentes concentraciones de Gdm.Cl. Se registró la fluorescencia del triptofano de NS1 a una concentración final de proteína de 6 μ M. La curva fue ajustada utilizando ecuaciones con una, dos o tres funciones exponenciales. Se muestra el mejor ajuste como línea punteada con sus residuales en rojo debajo de cada gráfico.

Tabla suplementaria A3- Constantes obtenidas del replegado por “Stopped Flow”

[Gdm.Cl] (M)	$k_1 s^{-1}\alpha$	% A ₁ *	$k_2 s^{-1}\alpha$	% A ₂ *	$K_3 s^{-1}\alpha$	% A ₃ *
0.5	1.6± 0.4	31	0.3± 0.03	69	-	-
0.75	3.3± 0.2	18	0.5± 0.04	42	0.1± 0.04	40
1.0	1.5± 0.3	16	0.3± 0.09	40	(7.0± 0.3)x10 ⁻²	42
1.5	1.4± 0.9	19	0.3± 0.08	31	(7.8± 0.1)x10 ⁻²	51
2.0	1.1± 0.3	11	0.2± 0.08	24	(5.8± 0.1)x10 ⁻²	65
2.5	2.1± 0.1	1	0.3± 0.01	2	(4.5± 0.8)x10 ⁻²	97
2.75	2.5± 0.2	1	0.3± 0.01	1	(4.1± 0.9)x10 ⁻²	98
3.0	1.7± 0.1	1	0.3± 0.1	1	(2.1± 0.8)x10 ⁻²	98

* Valores relativos de amplitudes. Valores calculados utilizando los datos obtenidos a partir del ajuste en cada condición teniendo en cuenta que las amplitudes representan el 100% del cambio de señal. Sin embargo, dado que no pudimos establecer los valores correspondientes a proteína plegada y desplegada estos porcentajes no representan el 100% del cambio de señal real.

α Constantes observadas para cada condición de desnaturizante.

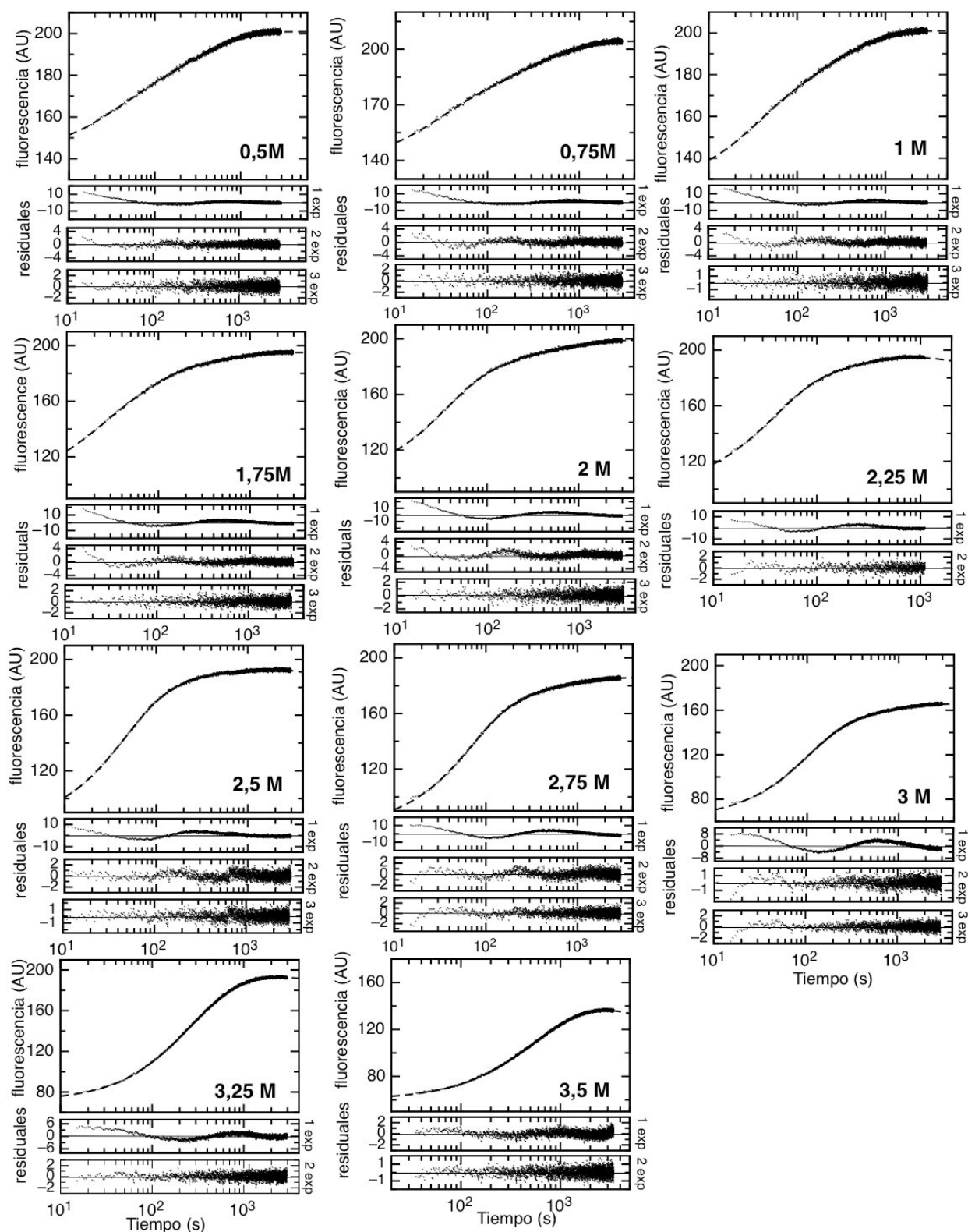


Figura suplementaria A6 Cinética de plegamiento de NS1 por mezclado manual. Se muestra el cambio de fluorescencia de triptofano a diferentes concentraciones de Gdm.Cl. La cinética de plegamiento fue realizada por mezclado manual a una concentración final de NS1 de 8 μ M. La curva fue ajustada utilizando ecuaciones con una, dos o tres funciones exponenciales. Se muestra el mejor ajuste como línea punteada con sus residuales debajo de cada gráfico.

Tabla suplementaria A4 - Constantes obtenidas del replegado por mezclado manual

[Gdm.Cl] (M)	$K_4 s^{-1}\alpha$	% A_4 *	$K_5 s^{-1}\alpha$	% A_5 *	$K_6 s^{-1}\alpha$	% A_6 *	% “Burst phase” #
0.5	$(4.6 \pm 0.6) \times 10^{-2}$	12	$(1.2 \pm 0.8) \times 10^{-2}$	13	$(2.1 \pm 0.6) \times 10^{-3}$	16	59
0.75	$(4.2 \pm 0.3) \times 10^{-2}$	19	$(7.9 \pm 0.4) \times 10^{-3}$	14	$(1.7 \pm 0.3) \times 10^{-3}$	14	53
1.0	$(3.8 \pm 0.2) \times 10^{-2}$	21	$(8.5 \pm 0.5) \times 10^{-3}$	17	$(1.9 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	14	48
1.75	$(6.1 \pm 0.5) \times 10^{-2}$	27	$(1.5 \pm 0.4) \times 10^{-2}$	30	$(1.9 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	10	33
2.0	$(3.2 \pm 0.4) \times 10^{-2}$	45	$(8.0 \pm 0.5) \times 10^{-3}$	15	$(1.2 \pm 0.6) \times 10^{-3}$	9	31
2.25	$(2.7 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	54	$(4.3 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	16	-	-	30
2.5	$(2.5 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	57	$(8.0 \pm 0.5) \times 10^{-3}$	18	$(7.2 \pm 0.5) \times 10^{-4}$	8	17
2.75	$(1.6 \pm 0.3) \times 10^{-2}$	55	$(5.1 \pm 0.5) \times 10^{-3}$	13	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	13	19
3.0	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	54	$(4.0 \pm 0.6) \times 10^{-3}$	10	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	10	26
3.25	$(6.0 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	50	$(2.3 \pm 0.4) \times 10^{-3}$	40			10
3.5	$(3.1 \pm 0.3) \times 10^{-3}$	30	$(1.3 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	70			-

* Valores relativos de amplitudes obtenidos a partir de los datos de los ajustes realizados para cada condición y los valores correspondientes a proteína desplegada y plegada. El % de la fase “burst” es el porcentaje de cambio de señal no explicado por las amplitudes obtenidas.

α Constantes observadas para cada condición de desnaturalizante. Se enumeran k_4 , k_5 , k_6 teniendo en cuenta que las constantes k_1 , k_2 , k_3 fueron obtenidas por “stopped flow”.

El porcentaje de la fase “burst” se consideró como el cambio de señal que no pudo ser explicado por las amplitudes obtenidas de cada ajuste.

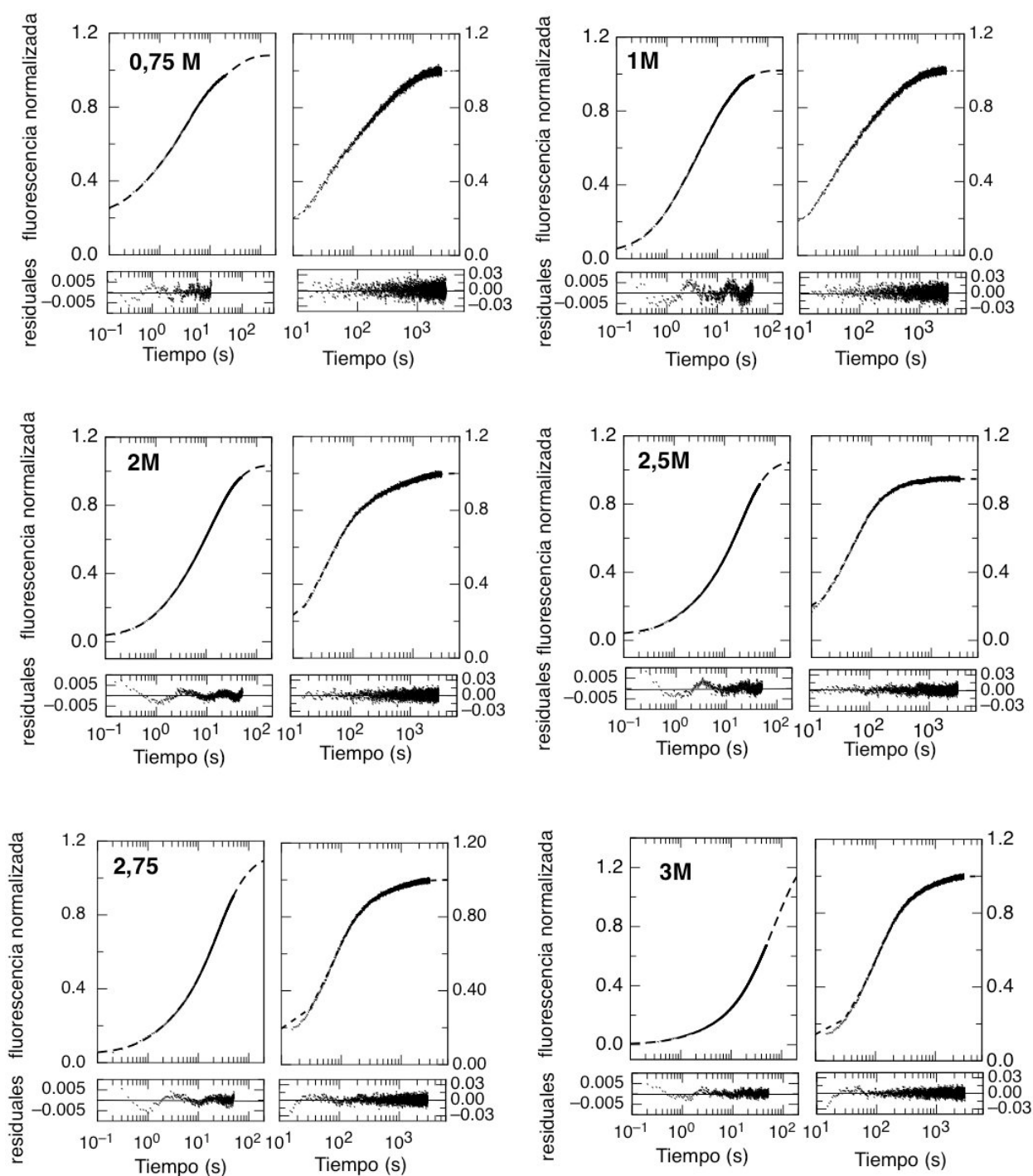


Figura suplementaria A7 Ajuste global de las curvas de replegado. Se muestran los ajuste globales del replegado de NS1 a diferentes concentraciones de Gdm.Cl. Las señales de fluorescencia fueron normalizadas, tanto las obtenidas por “stopped-flow” (izquierda) como por mezclado manual (derecha). Los residuales obtenidos se muestran debajo de cada gráfico y la línea discontinua representa el ajuste realizado.