



Universitat de Girona

**PAPER DEL NUCLI HIDROFÒBIC PRINCIPAL
DE LA RN_{asa} A EN EL PLEGAMENT I
DESPLEGAMENT INDUÏTS PER PRESSIÓ I
TEMPERATURA**

Josep FONT i SADURNÍ

**ISBN: 84-689-9920-2
Dipòsit legal: GI-856-2006**



UNIVERSITAT DE GIRONA

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA
ÀREA DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
LABORATORI D'ENGINYERIA DE PROTEÏNES

Tesi Doctoral

**Paper del nucli hidrofòbic principal de la RNasa A en el
plegament i desplegament induïts per pressió i temperatura**

Josep Font i Sadurní

2006



UNIVERSITAT DE GIRONA

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA
ÀREA DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
LABORATORI D'ENGINYERIA DE PROTEÏNES

**Paper del nucli hidrofòbic principal de la RNasa A en el
plegament i desplegament induïts per pressió i temperatura**

Memòria presentada per adquirir el grau de
Doctor Europeu per la Universitat de Girona, per

Josep Font i Sadurní

Vist-i-plau
La Directora de Tesi

Vist-i-plau
El Director de Tesi

Dra. Maria Vilanova i Brugués
Catedràtica
de Bioquímica i Biologia Molecular

Dr. Marc Ribó i Panosa
Professor Titular
de Bioquímica i Biologia Molecular

Girona, Abril de 2006

Als meus pares

Agraïments

«...em paro a pensar i viatge en el temps. Fa 5 anys vaig pujar a aquest tren sense saber ben bé cap a on es dirigia i ara arribo a la meva estació, em toca baixar, crec que n'agafaré un altre, vull continuar. Miro enrere i recordo a tota la gent que ha compartit amb mi aquest trajecte. Alguns ja heu baixat, d'altres continuareu, alguns només us he vist esperant en les estacions que hem anat passant... Potser algú baixarà amb mi, potser algú m'acompanyarà en el meu nou tren, no ho sé. Recordo tots els bons moments que he passat amb tots vosaltres, no aconsegueixo recordar cap mal moment, potser perquè han estat poc importants o fàcils d'oblidar al vostre costat. Vull dir-vos adéu, vull agrair-vos moltes coses, no em surten les paraules, crec que un simple GRÀCIES pot ajudar-me...»

M'agradaria agrair-vos, Dra. Maria Vilanova i Brugués i Dr. Marc Ribó i Panosa la oportunitat que em vareu brindar, en el seu moment, per incorporar-me en el grup de recerca d'Enginyeria de Proteïnes de la Universitat de Girona. Gràcies per la vostra orientació i consells.

Vull agrair també a totes aquelles institucions que han finançat l'inici del meu viatge. La Universitat de Girona per la concessió d'una beca de recerca UdG, la xarxa europea COST pel finançament de les Short-Term Scientific Missions, la fundació Joan Bruguera per la concessió d'una beca de recerca a Montpellier. Així mateix vull agrair al "Ministerio de Educación y Ciencia" i a la Generalitat de Catalunya, les quals han finançat, a través dels ajuts BMC2000-0138-CO2-02, BMC2003-08485-CO2-02 i SGR00-00064 respectivament, el projecte de recerca en el qual s'emmarca aquesta tesi.

Je veux vous remercier, professeurs Claude Balny et Reinhard Lange, pour votre hospitalité et votre amitié. Aussi, toutes les personnes de l'unité 128 et 710 de l'Inserm. Remercier les "filles" pour m'avoir accueilli si bien. Remercier a monsieur Valentine pour arrange tout ce que je cassai. Enfin, toutes les personnes qui ont fait mes séjours en France inoubliables. Et surtout te remercier a toi, Joan, pour tout ce que tu as fait pour moi.

Quiero agradecer también al Dr. Douglas V. Laurents, tus consejos y tus chistes me han acompañado durante una larga temporada.

I want to thank "Kasia", a very good friend. Thanks for those great conversations on msn, thanks for helping me in my bad moments

He vist passar molta gent per a la Universitat de Girona. A tots els que heu compartit amb mi tots aquests anys, a tota la gent del passadís... Bona sort i moltes gràcies.

A tota la gent de del meu laboratori, Toni, Teresa, Montse, Pere, Gerard, Jess,... Gràcies per tots els consells, tots els cafès i tots aquells moments que hem viscut... De debò, moltes gràcies.

I a vosaltres "kefe's", "marines", tota la gent de Calella, no tinc paraules per agrair-vos tot el que heu fet per mi. No sé ben bé en què m'he convertit... però del que estic segur és que és gràcies a vosaltres.

El meu últim agraïment i el més important... Pare, Mare, Ester, sempre heu estat al meu costat, sempre heu cregut amb mi fins i tot quan jo no hi creia. Us he reservat un bitllet en el meu nou tren, m'agradaria que m'acompanyessiu. Us he d'agrair tantes coses que no sé ni per on començar, per tant ho resumiré tot amb una forta abraçada...

Índex

Índex geneal	i
Presentació	iii
Llista d'abreviatures	v
Resum / Summary	vii

INTRODUCCIÓ **1**

1. El plegament proteic	3
1.1. El postulat d'Anfinsen i la paradoxa de Levinthal	5
1.2. Les vies de plegament proteic	6
1.2.1. Models clàssics del plegament proteic	6
1.2.2. Detecció i caracterització d'intermediaris del plegament proteic	8
1.2.3. La teoria de l'estat de transició i l'anàlisi dels valors Φ	11
1.2.4. Els paisatges energètics: La visió actual del plegament proteic	13
1.3. La pressió com a eina d'estudi de l'estabilitat i el plegament proteic	16
2. La Ribonucleasa de pàncrees boví: (RNasa A)	21
2.1. Estructura tridimensional de la RNasa A: l'estat natiu	22
2.2. L'estat desnaturalitzat per pressió de la RNasa A	23
2.3. Estudis de desplegament en l'equilibri	25
2.4. L'estabilitat de la RNasa A estudiada per mutagènesi dirigida utilitzant pressió	27

OBJECTIUS **29**

Objectius	31
Objectives	33

<u>RESULTATS I DISCUSSIÓ</u>	35
Capítol I	37
Pressure- and Temperature-Induced Unfolding Studies: Thermodynamics of Core Hydrophobicity and Packing of Ribonucleasa A	
Capítol II	73
The Contribution of the Residues from The Main Hydrophobic Core of Ribonuclease A to Its Pressure-Folding Transition State	
Capítol III	105
Pressure-Jump Induced Kinetics Reveals a Hydration Dependent Folding/Unfolding Mechanism of Ribonuclease A	
<u>DISCUSSIÓ GENERAL</u>	139
<u>CONCLUSIONS</u>	155
Conclusions	157
Conclusions	161
<u>BIBLIOGRAFIA GENERAL</u>	163
<u>APÈNDIX</u>	173
Material i mètodes	175

Presentació

En l'estructura de la tesi doctoral que teniu a les mans, els tres capítols que componen l'apartat de resultats i discussió segueixen el format d'articles científics. Tots ells s'han enviat a revistes d'àmbit internacional trobant-se en procés de revisió. En aquesta memòria s'ha respectat l'estructura i el llenguatge original dels articles, per facilitar la seva lectura per part dels avaluadors i membres del tribunal, que pertanyen a centres de recerca d'altres estats europeus diferents de la nació on es presenta aquesta tesi (d'acord amb la normativa vigent per a la obtenció del doctorat europeu). No obstant, al final de la present tesi s'adjunta un annex de material i mètodes que no pretén altra cosa que recopilar i traduir aquella metodologia més específica que ha estat utilitzada al llarg de tot el treball.

In the structure of this thesis, the chapters that constitute the results and discussion section follow the scientific articles format. All of them have been submitted to international scientific journals, being all under revision at the moment. In this memory the original structure and languages of the articles have been respected, in order to facilitate its comprehension by the evaluators and members of the jury, who belong to research centres of countries different from the nation where this thesis is presented (according to the present regulation for the European PhD degree acquisition). Nevertheless, at the end of this thesis it has been enclosed a material and methods chapter with the purpose of compiling and translating the most specific methodology used throughout this work.

Llistat d'abreviatures

$\Delta\alpha_U$:	Coefficient d'expansió tèrmica entre els estats plegat i desplegat d'una proteïna	H/D :	Hidrogen/deuteri
ΔG :	Estabilitat conformacional d'una proteïna o variació d'energia lliure de Gibbs de desplegament	kDa :	Quilodalton
$\Delta G^\#$:	Variació d'energia lliure de Gibbs en l'estat de transició	kJ :	Quilojoule
ΔG_P :	Variació d'energia lliure de Gibbs del desplegament induït per pressió	MPa :	1 Megapascal = 10 bars = 10 atmosferes = 10 kg/cm ²
ΔG_T :	Variació d'energia lliure de Gibbs del desplegament induït per temperatura	NMR :	Ressonància magnètica nuclear
ΔG_{tr} :	Variació d'energia lliure de transferència de l'aigua a n-octanol	1D¹H-NMR :	Ressonància magnètica nuclear monodimensional
$\Delta^2 G_{int}$:	Energia d'interacció de dobles mutants	2D-NMR :	Ressonància magnètica nuclear bidimensional
$\Delta\Delta G$:	Diferència d'estabilitat conformacional, entre dues proteïnes	P_{1/2} :	Punt mig de la transició de desnaturalització per pressió
$\Delta\Delta G^\#_{TS-D}$:	Diferència de la variació d'energia lliure de Gibbs entre l'estat de transició i l'estat desplegat, entre dues proteïnes.	PDB :	Banc de dades de proteïnes
$\Delta\Delta G_{N-D}$:	Diferència de la variació d'energia lliure de Gibbs entre l'estat natiu i l'estat desplegat, entre dues proteïnes	RNA :	Àcid ribonucleic
$\Delta\Delta G_{bur}$:	Diferència d'estabilitat conformacional corregit per la variabilitat en l'accessibilitat al solvent, entre dues proteïnes	SAXS :	Escombrat de raigs X d'angle petit
ΔV :	Variació de volum de desplegament	T_{1/2} :	Punt mig de la transició de desnaturalització per temperatura
$\Delta V^\#$:	Variació de volum en l'estat de transició	TS :	Estat de transició
ΔV_{res} :	Variació de volum del residu en l'interior de la proteïna	U_{cis} :	Estructura desplegada de la proteïna RNasa A, en la seva conformació nativa CIS de l'enllaç asn113-pro114
β :	Coefficient de compressibilitat isotèrmica	U_{trans} :	Estructura desplegada de la proteïna RNasa A, en la seva conformació TRANS de l'enllaç asn113-pro114
β_P :	Valor anàleg de pressió al valor β -Tanford	Xaa-Pro :	Enllaç imida entre una prolina i l'aminoàcid que la precedeix
Φ_f :	Valor phi de plegament		
FTIR :	Espectroscòpia a l'infraroig amb transformada de Fourier		

Resum

Utilitzant temperatura i pressió com a agents desnaturalitzants s'ha explorat la contribució a l'estabilitat de diferents residus del principal nucli hidrofòbic de la RNasa A, essent els més crítics per a la estabilitat: V54, V57, I106 i V108. Aquests experiments han mostrat que les diferències en l'estabilitat poden ser atribuïdes tant a les interaccions hidrofòbiques com a la densitat d'empaquetament, amb magnituds energètiques equivalents. L'estudi de diferents variants de la RNasa A, suggereix que el principal nucli hidrofòbic d'aquest enzim, està fortament empaquetat i ha revelat l'existència de reordenacions en l'interior de la proteïna, fins i tot després de delecions dràstiques.

La tècnica de salts de pressió i el mètode dels valors Φ , han permès estudiar el paper de les interaccions hidrofòbiques establertes pels residus que pertanyen al principal nucli hidrofòbic de la RNasa A en el seu estat de transició induït per pressió. La mitjana dels valors de Φ_f ha estat de 0.43, la qual cosa situa l'estat de transició a mig camí entre l'estat plegat i el desplegat. Des del punt de vista de les interaccions formades, l'estructura de l'estat de transició és una forma relativament i uniformement expandida de l'estructura plegada. Per altra banda, la mitjana dels valors de β_p és de 0,4, la qual cosa significa que l'estat de transició és en un 40% igual a l'estat plegat, des del punt de vista de la compactació. En conjunt, aquests resultats suggereixen que l'estat de transició induït per pressió de la RNasa A, s'assemblaria a un glòbul col·lapsat amb una cadena polipeptídica estructurada però amb un debilitat nucli hidrofòbic.

S'ha explorat també, el paisatge energètic del plegament/desplegament proteic de la variant Y115W de la RNasa A, mitjançant cinètiques de relaxació induïdes per salts de pressió. S'ha comparat el comportament de la proteïna a diferents temperatures, mostrant en tots els casos cinètiques mono-exponencials en el procés de replegament. Per contra, les cinètiques de desplegament han presentat perfils bifàsics a pressions baixes (per sota de $P_{1/2}$) i monofàsics a pressions altes, excepte a 50°C on totes les cinètiques s'han mostrat monofàsiques. L'anàlisi del volum d'activació de la fase ràpida suggereix un canvi estructural de l'estat de transició del desplegament dependent de la temperatura. Aquest estat de transició sembla interaccionar fortament amb la capa d'hidratació d'aquest estat, tal i com indiquen els resultats en presència de glicerol.

Aquest estudi constitueix la primera evidència, detallada cinèticament, d'un paisatge energètic complex del plegament proteic en funció de la temperatura i pressió.

Summary

Using temperature and pressure as denaturants we have explored the contributions to stability of the hydrophobic core residues of RNase A with the positions most critical for stability being V54, V57, I106 and V108. It is also shown that the stability differences can be attributed to both hydrophobic interactions and packing density with an equivalent energetic magnitude. These results are consistent with an exquisite tight core packing and the existence of rearrangements in the protein interior even after drastic deleterious substitutions.

The role of hydrophobic interactions established by the residues that belong to the main hydrophobic core of RNase A in its pressure-folding transition state, was investigated using the Φ -value method. The folding kinetics was studied using pressure-jump techniques both in the pressurization and depressurization directions. The structure of the transition state of the hydrophobic core of RNase A, from the point of view of formed interactions, is a relatively, uniformly expanded form of the folded structure with a mean Φ_f -value of 0.43. This places it half way between the folded and unfolded states. On the other hand, for the variants, the average of βp -values is 0.4, suggesting a transition state that is 40% native-like. Altogether the results suggest that the pressure-folding transition state of RNase A, looks like a collapsed globule with some secondary structure and a weakened hydrophobic core.

Pressure-jump induced relaxation kinetics was used to explore the energy landscape of protein folding/unfolding of Y115W variant of RNase A. Whereas downward p -jumps resulted always in single exponential kinetics, the kinetics induced by upward p -jumps was biphasic in the low pressure range (below $P_{1/2}$) and monophasic at higher pressures. At 50 °C, only one phase was observable. Analysis of the activation volume of the fast phase suggests a temperature dependent structural shift of the unfolding transition state. The latter appears to interact strongly with the hydration shell, as indicated by results in the presence of glycerol. The present report gives first detailed kinetic evidence of a temperature and pressure dependent complex protein folding energy landscape.

INTRODUCCIÓ

1. El plegament proteic

Les proteïnes són les macromolècules encarregades de portar a terme les diferents funcions biològiques codificades en els gens, per tant són unes de les macromolècules més importants per a la vida. Existeixen diferents funcions associades a les proteïnes, com són el moviment, la síntesi i degradació de diferents materials, múltiples funcions reguladores, participació en la replicació de l'ADN per promoure la divisió cel·lular, etc....

Existeix una relació directa entre la funció de les proteïnes i la seva estructura o forma. Si es conegués l'estructura de totes les proteïnes es veuria que existeixen diferències molt importants en quan a la seva forma, característica que els permet realitzar la funció per a la qual estan dissenyades. De fet, el nom de proteïna prové del mot grec *proteus*, deu grec que adoptava múltiples formes; a l'any 1830, G.J.Muder va escriure en la revista *Journal für Praktische Chemie* «...la substància orgànica que està present en tots els constituents del cos animal, i que es trobarà aviat en el regne vegetal, podria ser denominat “proteïna”... del grec *proteus*, per ser un constituent primari...».

Les proteïnes presents en un organisme viu es fabriquen mitjançant la unió d'aminoàcids en una cadena lineal, que constitueix el que s'anomena cadena polipeptídica. L'ordre d'aquests aminoàcids en la seqüència ve definit per l'ordre de nucleòtids que conté un gen determinat en les cadenes d'ADN. Els mecanismes pels quals aquesta cadena polipeptídica assoleix la seva estructura tridimensional i funcional, ha intrigat als científics durant moltes dècades, és el que s'anomena plegament proteic.

A començaments del segle XX, època on es desconeixia tot sobre la seqüència o l'estructura tridimensional de les proteïnes, i en el qual, fins i tot alguns científics no consideraven les proteïnes com a molècules reals, Wu [1] va analitzar-ne el procés de desplegament i la recuperació de l'estat natiu. Als anys 30, moltes publicacions ja mostraven la reversibilitat del procés de desplegament, destacant el concepte de que el procés de plegament era un procés espontani. Als anys 50, autors com Linderström-Lang, Lumry, Klotz i Kauzmann entre d'altres, subratllaven la importància de les interaccions no covalents en l'estabilitat de les proteïnes. El 1959 va sorgir un concepte important quan Kauzmann, va suggerir que l'efecte hidrofòbic era la força conductora que dirigia el procés de plegament proteic [2].

A principis del 1960, la determinació de l'estructura de proteïnes mitjançant la cristal·lografia i difracció de Raigs X (als 80 s'hi va unir l'espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear, NMR) proporcionava una nova base per a l'anàlisi estructural i per a l'estudi del procés de plegament. Als anys 70, Anfisen va tenir èxit amb els seus intents d'aconseguir un enzim completament actiu després de replegar la Ribonucleasa de pàncrees boví o Ribonucleasa A completament desplegada i reduïda. Aquest triomf es va traduir en el seu famós postulat, on deia que el plegament d'una proteïna està determinat en la seva seqüència primària. Es va proposar també, que aquests mateixos mecanismes eren els que estaven involucrats en el plegament "in vivo". A partir d'aquest moment i gràcies al nombre creixent de treballs sobre el plegament proteic i també al progrés en els plantejaments i en la instrumentació experimental, s'ha aprofundit enormement en el coneixement del camí de plegament proteic.

El nombre creixent d'estructures tridimensionals en el Brookhaven PDB (35026 al febrer del 2006) ha mostrat que el nombre de plegaments és relativament petit, amb l'existència de 32 arquitectures diferents dels dominis de plegament [3]. El 1987, el descobriment de les xaperones moleculars va provocar un nou debat sobre el procés de plegament. No obstant, l'evidència generada al llarg del anys corrobora l'anomenat

postulat d'Anfinsen [4], fins i tot pel plegament *in vivo* el qual es troba assistit per xaperones moleculars. La qüestió fonamental continua essent com la seqüència codifica per al plegament d'una proteïna. Diversos models han estat proposats al llarg dels anys per tal de descriure el mecanisme de plegament. El desenvolupament d'estudis teòrics des de finals dels anys 70 va proporcionar noves perspectives per aquest problema. Amb la convergència d'estudis teòrics i experimentals, als anys 90 va emergir progressivament una visió unificada del plegament proteic, la qual es va anomenar "new view" i que actualment podríem anomenar "present view".

El plegament proteic és un tema d'un gran interès intel·lectual ja que completa la transferència d'informació de ADN al producte, és a dir, a la proteïna activa; representa la última part del missatge genètic en diferents sentits; en un sentit, representa el primer pas de la morfogènesi. Tal i com va descriure Jaques Monod "Dans le processus de structuration d'une protéine globulaire, on peut voir à la fois l'image microscopique et la source de développement épigénétique de l'organisme lui-même" [5]. A més a més, els principis fonamentals del plegament proteic tenen aplicacions pràctiques en la comprensió de diferents processos cel·lulars, diferents patologies, en l'explotació dels avenços obtinguts a partir de la genòmica i en el disseny de noves proteïnes amb funcions especials.

Per altra banda, els desenvolupaments espectaculars en biologia molecular han proporcionat accés a milers de seqüències genòmiques incloent el genoma humà, fent més urgent la solució del problema del plegament proteic. Ha proporcionat estímuls reals per la recerca en la predicció d'estructures. El procés de replegament és crucial en la producció industrial de proteïnes recombinants. El disseny de noves proteïnes també requereix el coneixement del mecanisme de plegament. I ara sabem que diverses patologies resulten de l'agregació o del plegament incorrecte de proteïnes. Per tant, entendre els mecanismes del plegament proteic representa un dels reptes més importants de la biologia avui en dia. Aquest camp extremadament actiu de la recerca, involucra tant aspectes biològics, com químics, bioquímics, físics i fins i tot bioinformàtics.

1.1. El postulat d'Anfinsen i la paradoxa de Levinthal

L'èxit remarcable d'Anfinsen amb el seu experiment sobre el replegament de la Ribonucleasa A *in vitro* recuperant l'activitat completa de l'enzim, va marcar el

començament d'una intensa recerca sobre el plegament proteic. La seva conclusió va ser concisa "All the information necessary to achieve the native conformation of a protein in a given environment is contained in its amino acid sequence"[4]. El corol·lari d'aquest postulat és el control termodinàmic del plegament proteic, el que significa que la conformació nativa representa un mínim de l'energia lliure de Gibbs.

Aquest postulat va ser discutit per Levinthal basant-se en els temps relativament curts requerits per al plegament proteic tant *in vitro* com *in vivo*, els quals són de l'ordre de segons o minuts [6]. De fet, per a una proteïna composta per una cadena polipeptídica d'uns 100 aminoàcids, i assumint que cada aminoàcid té només dues possibles conformacions, existeixen al voltant de 10^{30} possibles conformacions de la cadena. Si s'assumeix que es necessiten només 10^{-11} segons per passar d'una conformació a l'altra, aleshores el temps requerit per una cerca a l'atzar de totes les conformacions seria de 10^{11} anys. Aquesta situació ha estat anomenada la paradoxa de Levinthal i ha dominat les discussions en les últimes tres dècades, proporcionant diferents models pel plegament proteic. S'han proposat diferents mecanismes per solucionar la paradoxa de Levinthal. Pel mateix Levinthal i després per Wetlaufer [7], el plegament proteic estaria sota un control cinètic en lloc d'un control termodinàmic. És a dir, l'estructura d'una proteïna biològicament activa correspondria a una conformació de mínima energia assolible cinèticament.

1.2. Les vies del plegament proteic

1.2.1. Models clàssics del plegament proteic

Com a conseqüència del temps, que suposa la cerca a l'atzar de la conformació nativa, la concepció del plegament proteic va encaminar-se a la definició de vies de plegament que fessin compatibles els models amb els temps de plegament reals de les proteïnes. Així, s'han proposat diferents models sorgits tant de consideracions teòriques. [8-12], de simulacions [13-18], com d'observacions experimentals [19-21].

El model clàssic de *nucleació-propagació*, el qual s'aplica a transicions cabdell-hèlix [22, 23], implica un pas de nucleació seguit per una ràpida propagació on el pas limitant seria el procés de nucleació. Aquest model va ser proposat inicialment per explicar els resultats cinètics del replegament obtinguts per a la Ribonucleasa A. Encara que es consideri la cooperativitat del procés, el model es va abandonar després d'obtenir

nous resultats experimentals [24]. Més recentment Fersht va proposar el model de *nucleació-condensació* [25]. Aquest model proposava la formació d'un nucli local dèbil estabilitzat per interaccions de llarg abast.

Durant molts anys es va acceptar un model *jeràrquic i seqüencial* de plegament proteic el qual va ser defensat per diversos autors [21, 25]. D'acord amb aquest model, el primer esdeveniment, la nucleació, és seguida per una ràpida formació d'estructures secundàries les quals s'associen per generar estructures supersecundàries, els dominis i finalment la proteïna activa, seguint una única ruta. Igualment el model "*framework*" implica que les estructures secundàries es formen en una pas inicial del procés de plegament abans que les estructures terciàries tinguin lloc. Aquest model emfatitza el paper de les interaccions de curt abast en el direccionament del plegament proteic [26].

Tenint en compte les estructures tridimensionals de les proteïnes, es va proposar un model *modular*. Els dominis consisteixen en subestructures compactes dins de molècules proteiques més llargues de 15 o 20 kDa. Els dominis han estat considerats com unitats de plegament capaces de plegar-se independentment, els quals s'agrupen per donar lloc a la proteïna nativa [27, 28]. Es va suggerir que no només els dominis sinó també els sub-dominis es poden considerar com a unitats de plegament [29, 30]. El model *modular* també accepta un únic camí jeràrquic de plegament.

El model de *difusió-colisió* va ser desenvolupat a l'any 1976 per Karplus i Weaver [8] i revisat el 1994 [9] amb l'ajuda de dades experimentals més recents. Assumeix que la nucleació ocorre simultàniament en diverses parts de la cadena polipeptídica generant microestructures que difonen, associades i cohesionades, per formar subestructures amb una conformació nativa. Aquestes microestructures tenen un temps de vida controlat per una difusió de segments, per tant el plegament d'una cadena aminoacídica de 100 o 200 aminoàcids pot dur-se a terme en un temps realment petit (menys d'un segon). D'acord amb aquest model, el plegament ocorre a través de diversos passos de difusió-colisió.

El model de *col·lapse hidrofòbic* considera que el primer esdeveniment del plegament proteic consisteix en un col·lapse que ocorre via interaccions de llarg abast, després o en el mateix moment que la formació de les estructures secundàries [31]. Aquest model va ser proposat per Kauzmann i inspirat en l'efecte hidrofòbic.

El model de *puzle*, va ser introduït per Harrison i Durbin al 1985 [32]. Els autors proposen l'existència de múltiples camins del plegament proteic, com en el muntatge d'un puzle en el qual existeixen múltiples rutes per aconseguir una única solució final. D'acord amb aquest model, la identificació d'intermediaris representa una descripció cinètica més que una d'estructural, cada intermediari consisteix en un conjunt d'espècies heterogènies en ràpid equilibri. Aquest model presenta algunes similituds amb el proposat per Karplus i Weaver. No obstant aquest model ha estat objecte de controvèrsia en els últims anys.

1.2.2. Detecció i caracterització d'intermediaris del plegament proteic

El procés de desplegament/replegament sota condicions d'equilibri sovint s'ha descrit com un procés en dos estats, el qual presenta transicions molt cooperatives. L'aproximació en dos estats és acceptada sovint per proteïnes petites; els intermediaris són generalment inestables i pobrament poblats a l'equilibri. Quan el procés de plegament segueix una aproximació en dos estats, el canvi d'energia lliure de desplegament, ΔG , pot ser determinat fàcilment. Aquest valor oscil·la entre 5 i 15 kcal/mol per a la majoria de proteïnes, indicant una estabilitat relativament baixa [33-35], sobretot quan es compara amb l'energia d'algunes interaccions febles.

Els intents per resoldre la paradoxa de Levinthal han estimulat molts estudis cinètics. Aquestes investigacions han demostrat l'existència d'intermediaris en els camins de plegament, fins i tot quan l'aproximació en dos estats descriu el procés global. Frequentment, per moltes proteïnes, s'han observat cinètiques monofàsiques de desplegament i cinètiques polifàsiques de replegament. La caracterització estructural d'intermediaris és un prerequisite per solucionar el problema del plegament. No obstant, hi ha dos grans impediments per a caracteritzar aquestes espècies; l'alta cooperativitat i la rapidesa del procés. Com que les espècies d'intermediaris tenen generalment un temps de vida molt curt, l'anàlisi de les seves propietats estructurals esdevé complex. Tot i aquestes dificultats inherents, s'han esmerçat molts esforços per caracteritzar aquestes espècies transitòries. Els avenços tecnològics han permès caracteritzar estructuralment alguns d'aquests intermediaris. A més a més, per algunes proteïnes, s'han acumulat intermediaris transitoris de plegament utilitzant pH baixos, enginyeria de proteïnes, o treballant amb fragments de proteïnes incapaçs de completar el procés

de plegament, fent possible la seva caracterització. Més recentment, mètodes de cinètiques que arriben a detectar processos que tenen lloc en l'escala de submil·lisegons han millorat el temps de resolució dels estudis cinètics, permetent la detecció d'esdeveniments en les etapes inicials del plegament.

L'enginyeria de proteïnes també s'ha utilitzat eficientment per establir intermediaris o per explorar regions particulars, i també per analitzar l'estat de transició durant el procés de plegament [36-38]. Un altre enfoc utilitzat freqüentment és l'estudi de fragments de proteïnes [39, 40]. S'ha vist que per a diferents proteïnes s'acumulaven espècies transitòries de plegament a pH baixos, particularment per la α -lactalbumina, permetent l'estudi de les seves propietats estructurals [41].

Ohgushi i Wada [42] van classificar espècies de "molten globule". Ptitsyn i col·laboradors [43] van suggerir que el "molten globule" és un intermediari general en els camins de plegament de proteïnes. Com que en la literatura el terme "molten globule" era una mica confós, Goldberg i col·laboradors van introduir el terme "specific molten globule" amb una definició precisa [44]: el "molten globule" o "glòbul fos" és un intermediari bastant compacte amb un alt contingut d'estructura secundària nativa però amb una estructura terciària fluctuant i conté superfícies hidrofòbiques accessibles les quals s'uneixen a un colorant hidrofòbic com el ANS (anilinonaphtalene sulfonate). La presència d'aquest intermediari anomenat "glòbul fos" ha estat descrita per diverses proteïnes [37, 41, 45, 46].

No obstant, les estructures secundàries observades en els passos inicials del procés de plegament no són sempre estructures semblants a estructures natives. Per diverses proteïnes en els passos inicials del plegament es troben formades estructures secundàries no-natives [43, 47].

Una espècie intermediària que precedeix el "glòbul fos" va ser identificada per Ptitsyn [48] i per Uversky [49, 50]. Aquesta espècie és menys compacte que el "glòbul fos", exhibeix regions hidrofòbiques accessibles al solvent i posseeix un contingut significatiu d'estructura secundària, però menor al del "glòbul fos". Va ser anomenat "pre-glòbul fos" per Jeng i Englander, i la seva presència s'ha observat durant el replegament en diverses proteïnes [51-53]. En referència al "glòbul fos" es van publicar molts treballs durant els anys 90. Les propietats i el paper de l'estat de "glòbul fos" en el procés de plegament va ser revisat per Arai i Kuwajima [54]. La ràpida formació

d'intermediaris transitoris amb un contingut significatiu d'estructura secundària ha estat confirmat per un gran nombre d'experiments [53-55]. Tanmateix, aquestes espècies transitòries apareixen en el temps mort de l'aparell de "stopped flow" emprat en l'experiment i és possible que la seva formació estigui precedida per un esdeveniment previ.

D'acord amb un altre punt de vista, l'esdeveniment primerenc en el plegament d'una cadena polipeptídica és el col·lapse hidrofòbic el qual pot precedir o bé transcórrer simultàniament a la formació d'estructura secundària. Aquests processos anirien seguits per la reorganització d'un petit nombre d'estats condensats, tal i com va postular Dill [31]. Aquest punt de vista emfatitza tant l'efecte hidrofòbic, proposat primer per Kauzman, com el paper de les interaccions de llarg abast en la iniciació del plegament proteic. Diversos estudis experimentals estan d'acord amb aquest mecanisme i s'han caracteritzat per diverses proteïnes, microestructures residuals durant el procés de desplegament [38, 56-58]. Aquestes microestructures, podrien estar involucrades en el procés de plegament com a centres de nucleació hidrofòbics.

La caracterització d'esdeveniments que inicien el procés és crucial per resoldre el mecanisme de plegament proteic. S'han aconseguit avenços tècnics recents per millorar el temps de resolució en estudis cinètics [59]. Així s'han desenvolupat tècniques de barreja en l'escala de submillesegons [60, 61]. S'han descrit també, tècniques sense barreja com els clàssics salts de temperatura [62], salts de temperatura en nanosegons induïts per laser infraroig [63], salts de temperatura en picosegons [64], fotòlisis amb làser en nanosegons [65], transferència òptica d'electrons [66], i mètodes de NMR dinàmica [67]. Aquestes tècniques permeten la detecció d'esdeveniments molt ràpids que ocorren en una escala de temps més petita que un microsegon. El límit màxim per la velocitat del plegament proteic s'ha descrit com $1\mu\text{s}^{-1}$ [68] en concordança amb estimacions teòriques [69].

A partir d'aquests estudis, sembla que els esdeveniments de fase ràpida del plegament proteic consisteixen en un col·lapse hidrofòbic acompanyat per la formació d'estructures secundàries, encara que aquest segon aspecte depèn de la proteïna.

La formació del "glòbul fos" ocorre després dels esdeveniments de fase molt ràpida, els quals podrien ser seguits per esdeveniments de velocitats mitjanes que precedeixen el pas limitant de la velocitat que permet arribar a les proteïnes natives i

funcionals. Aquest últim pas inclou l'ordenament precís dels elements d'estructura secundària [70] i el correcte empaquetament del nucli hidrofòbic [71]. En algunes proteïnes, però no en totes, consisteix en la isomerització cis-trans de les prolines [19, 72], la remodelació dels ponts disulfur [27], el correcte aparellament de dominis en proteïnes multidominis i l'assemblatge de subunitats en proteïnes oligomèriques [25, 73]. Per diverses proteïnes, l'etapa limitant de la velocitat consisteix en un reordenament d'espècies mal plegades.

1.2.3. La teoria de l'estat de transició i l'anàlisi dels valors Φ

La reacció de plegament o desplegament d'una proteïna, com qualsevol reacció química, passa per un o més estats de major energia que els estats que immediatament el precedeixen o segueixen en la reacció i que es denominen estats de transició (figura 1.2).

L'existència d'un o més estats de transició ve determinada per la presència o no d'intermediaris de plegament al llarg de la coordenada de reacció. Així doncs per aquelles proteïnes que no presenten cap intermediari estable i que per tant la reacció de plegament es dona en dos estats, natiu i desplegat, només existirà un sol estat de transició. A diferència dels intermediaris de plegament, que no posseeixen una energia tant elevada i són conformacions més estables, els estats de transició són molt difícils d'estudiar degut a la seva gran inestabilitat.

En l'estat de transició part de les interaccions de l'estat desplegat estan trencades, mentre que part de les interaccions de l'estat natiu estan formades. L'estat de transició representa l'etapa limitant del procés i la seva formació determinarà la velocitat de la reacció.

Com ja s'ha comentat anteriorment, actualment s'accepta l'estat de transició no com a una única conformació, sinó com a un conjunt de conformacions estructurals i energèticament semblants.

Un dels mètodes experimentals més potents per tal de caracteritzar l'estat de transició del plegament proteic, l'únic estat existent entre N (natiu) i D (desplegat) en una reacció de dos estats, és l'anàlisi dels valors Φ , inicialment desenvolupat per Fersht i col·laboradors [74]. La importància crucial de l'anàlisi dels valors Φ és que ens permet

estudiar les interaccions de les cadenes laterals en l'estat de transició, les quals poden ser utilitzades per deduir informació sobre l'estructura secundària i terciària d'aquest estat de transició.

L'estratègia per analitzar l'estat de transició experimentalment és utilitzar les cinètiques de plegament/desplegament i l'anàlisi dels valors Φ [74-76]. Fins avui ha estat aplicat amb diferents graus de complexitat a més de dues dotzenes de proteïnes [77]. En molts d'aquests estudis, les cinètiques dels processos de plegament/desplegament es van seguir utilitzant tècniques de "stopped-flow", utilitzant desnaturalitzants químics per induir les transicions. En comparació, hi ha pocs treballs en els quals es descriu l'estat de transició del procés de plegament/desplegament d'una proteïna induït per un agent físic, com és la pressió. Amb el desenvolupament de les tècniques de salts de pressió el nombre d'estudis cinètics de plegament duts a terme ha anat creixent utilitzant diferents proteïnes. Alguns estudis han utilitzat només pressió [78-81], o pressió juntament amb altres agents desnaturalitzants [82], per estudiar les cinètiques de plegament de la proteïna salvatge, incloent la RNasa A [83]. Molts pocs treballs tracten de la utilització de mutants per estudiar l'estat de transició del procés de plegament induït per disminució de pressió d'una proteïna [84, 85].

El mètode dels valors Φ es pot explicar de manera senzilla; en primer lloc i mitjançant mutagènesis dirigida s'elimina la interacció a estudiar d'una cadena lateral amb la resta de residus de la proteïna. A continuació i utilitzant tècniques termodinàmiques a l'equilibri, es calcula l'energia lliure de Gibbs del procés de desplegament tant per la proteïna salvatge com per la proteïna mutant. Per altra banda, mitjançant estudis cinètics es calcula l'energia lliure d'activació de la reacció tant per la proteïna salvatge com per la proteïna mutant. Finalment es calcula el valor de Φ tal i com descriu la equació (1)

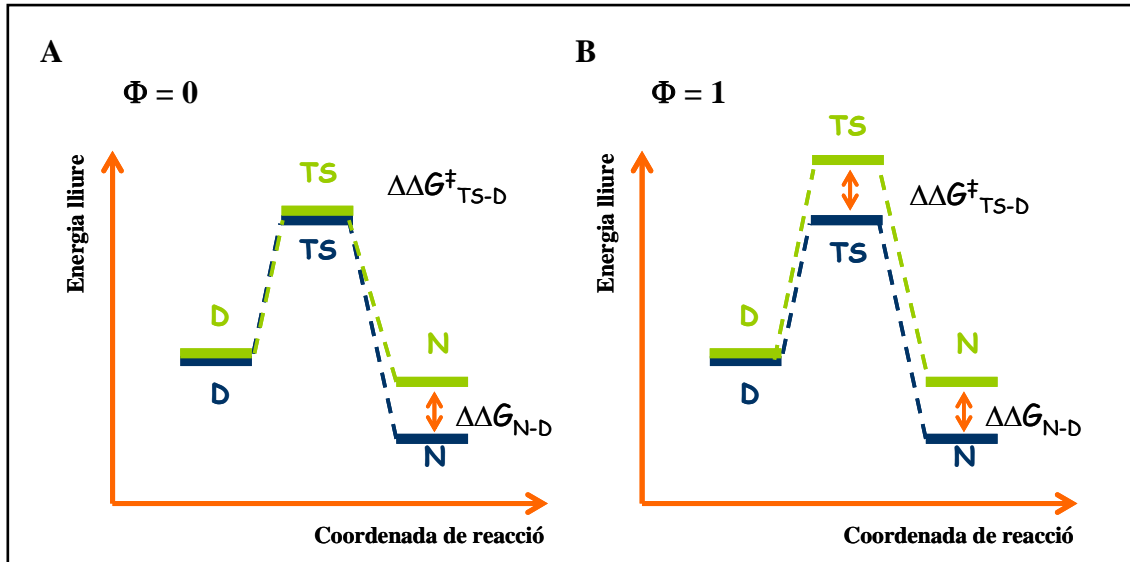
$$\Phi_f = \Delta G_{TS-Dwt} - \Delta G_{TS-Dmut} / \Delta G_{N-Dmut} - \Delta G_{N-Dwt} = \Delta \Delta G_{TS-D} / \Delta \Delta G_{N-D} \quad (1)$$

D'aquesta manera un valor de Φ_f de 0 significa que l'energia de l'estat de transició en la proteïna mutada està igual d'alterada que en l'estat desplegat. Mentre que un valor de Φ_f (de plegament) de 1 significa que l'energia de l'estat de transició en la proteïna mutada està igual d'alterada que en l'estat natiu. Així també, un valor de Φ_f de 0 significa que les interaccions existents en l'estat de transició en el punt de la mutació són iguals a les que estableix aquell residu en l'estat desnaturalitzat, mentre que un

valor de Φ_f de 1 significa que les interaccions que estableix el residu mutat en l'estat de transició són iguals a les que trobem a l'estat natiu de la proteïna (fig 1.1).

Així doncs, es podria resumir que, realitzant un nombre suficient de mutacions, es poden definir quines regions de l'estat de transició presenten una estructura nativa i quines no presenten una estructura nativa formada.

Figura 1.1



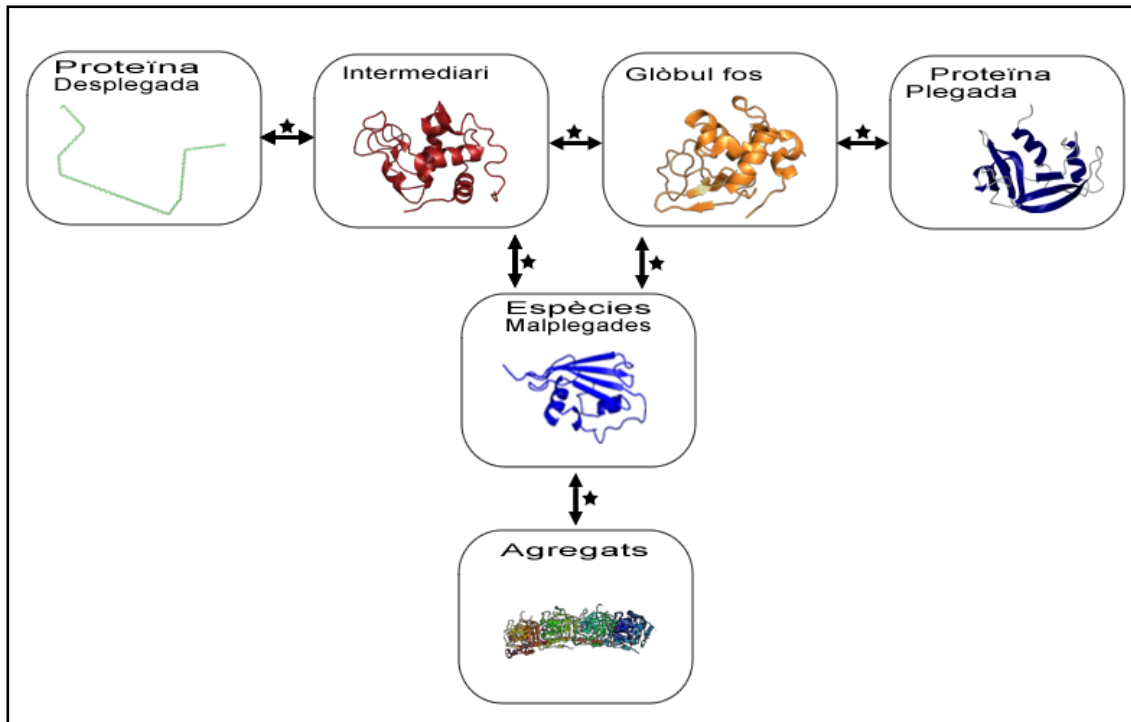
Representació esquemàtica de l'anàlisi dels valors Φ . Es representa el perfil energètic de la reacció i esquemes de les diverses conformacions de la proteïna durant el plegament. (A) la mutació afecta a una interacció present a l'estat natiu N, però no a l'estat de transició TS ni a l'estat desnaturalitzat D. (B) La mutació afecta a una interacció present a N i a TS, però no a D. S'indica en blau fosc el diagrama energètic de la proteïna salvatge, i en verd clar el diagrama de la proteïna mutant.

1.2.4. Els paisatges energètics: La visió actual del plegament proteic

A partir de la gran quantitat d'estudis experimentals sobre plegament proteic, molts investigadors han acceptat un model seqüencial del camí de plegament tal i com es mostra en la figura 1.2. Aquest camí inclou una competició cinètica entre el plegament correcte i una reacció paral·lela la qual genera espècies mal plegades i eventuais agregats. Més recentment, va sorgir un model unificat de plegament proteic a partir d'estudis teòrics, el qual es basa en la superfície energètica efectiva d'una cadena polipeptídica. Aquest model va ser introduït per Wolynes i col·laboradors [86]. Es va anomenar "new view" i descriu el procés de plegament en termes d'un paisatge energètic i d'un embut de plegament. El model ha evolucionat durant els últims anys a partir tant de resultats experimentals com teòrics, a través de la utilització de models

més simplificats. Aquest model descriu el comportament termodinàmic i cinètic de la transformació d'un conjunt de molècules desplegadas cap a un estat predominant natiu, com s'il·lustra esquemàticament en la figura 1.3. Així doncs, tal com van escriure Wolynes i col·laboradors "to fold, a protein navigates with remarkable ease through a complicated landscape" [86]. D'acord amb aquesta visió, el plegament proteic consisteix en una organització progressiva d'un conjunt d'estructures parcialment plegades, que sorgeixen a través de diferents rutes [87-89]. Una gran varietat de mecanismes de plegament sorgeixen a partir del paisatge energètic depenent dels paràmetres energètics i les condicions. Cap al final de l'embut de plegament, el nombre de conformacions proteiques decreix tant com l'entropia de la cadena. Així mateix, com més accentuat és el pendent més ràpid és el plegament.

Figura 1.2

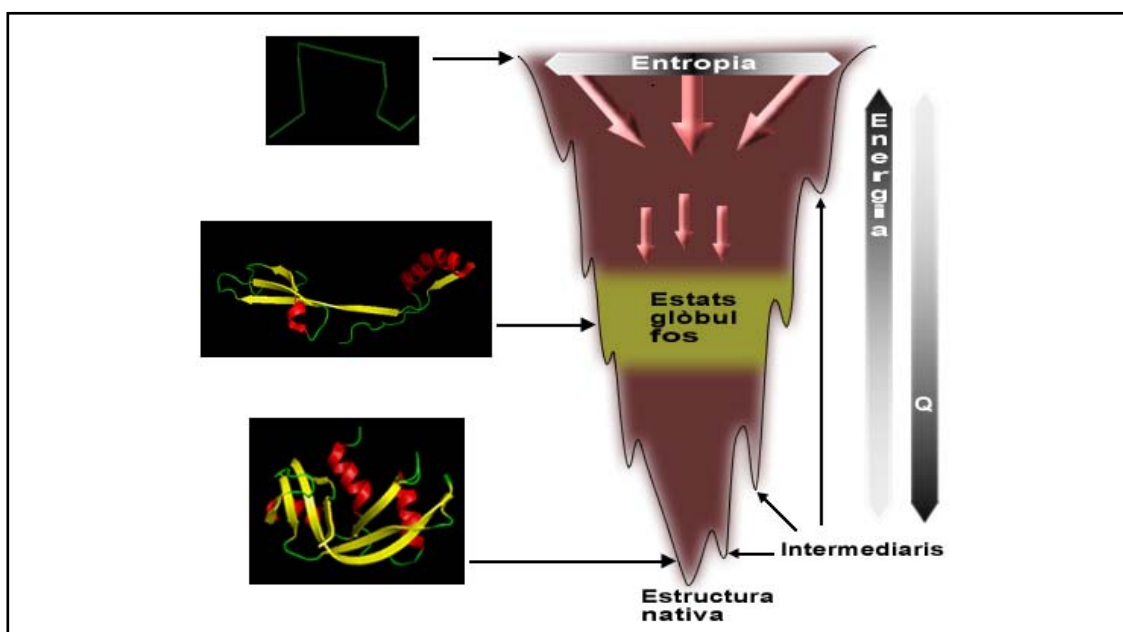


Representació esquemàtica del plegament proteic. Entre cada estat existeix el que s'anomena estat de transició (★), de major energia que l'estat que immediatament el precedeix. No totes les espècies són freqüents en un plegament determinat.

El paisatge energètic més simple del plegament proteic s'assembla a un embut parcialment rugós bidimensional (fig 1.3), on les rugositats locals corresponen a trampes transitòries de la proteïna en uns mínims d'energia lliure locals. En la figura 1.4 (A) es representa un embut llis idealitzat en tres dimensions; en aquest cas, el procés de plegament és molt ràpid i segueix un comportament en dos estats. Els processos de

plegament i desplegament seguirien un mateix camí. En la figura 1.4 (B) es mostra un paisatge energètic rugós en tres dimensions on les trapes cinètiques sorgeixen de barreres energètiques prèvies; aquest paisatge energètic correspondria a un plegament lent en múltiples estats. Quan les barreres locals són prou altes, les molècules proteiques poden quedar atrapades i, depenent de la naturalesa dels estats, eventualment, agregar.

Figura 1.3

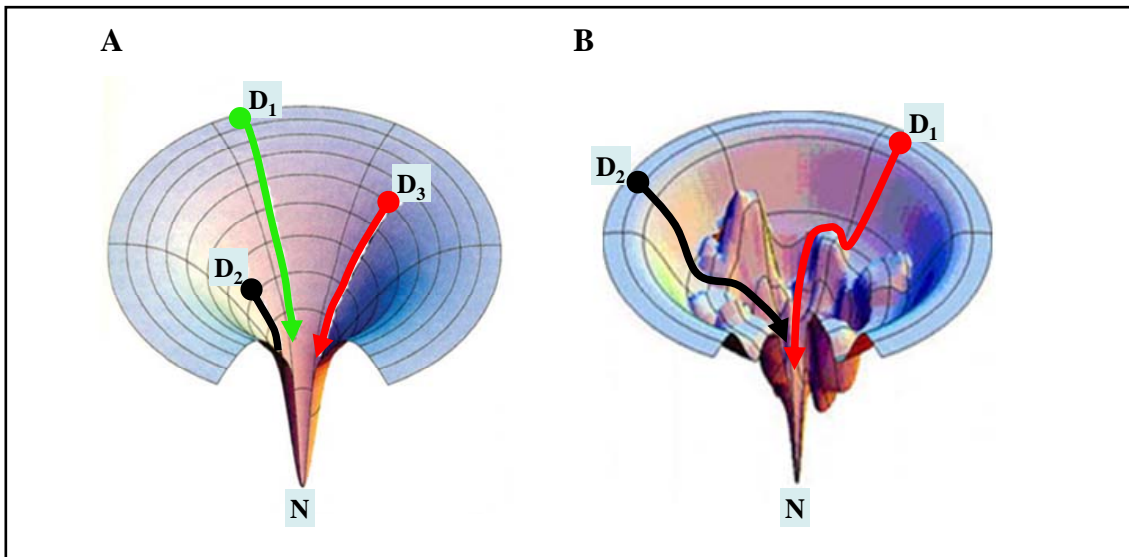


Representació esquemàtica bidimensional d'un embut de plegament en dues dimensions. L'amplada de l'embut representa l'entropia, mentre que la profunditat de l'embut, representa l'energia. S'observa la presència dels estats de glòbul fos i d'intermediaris de plegament. Q és la fracció de contactes natis presents a cada conformació.

Tal com van escriure Dobson i Karplus [90] “An important aspect of the new view is that it provides a simple way of understanding why the Levinthal paradox is not a real problem”. El paisatge energètic i l'analogia de l'embut de plegament proporciona un marc conceptual per entendre diferents escenaris del plegament proteic i també pel plegament incorrecte i l'agregació de proteïnes. Aquesta visió és de fet una racionalització del model de puzle [32].

Així doncs, aquesta nova visió o visió actual ha reemplaçat progressivament el model clàssic d'un camí de plegament seqüencial i jeràrquic i ara és generalment més acceptat. Fins i tot, Baldwin ho va reconèixer al 1994 “ In retrospect, it seems that Harrison and Durbin may have had the right idea” [91].

Figura 1.4



Representació tridimensional de diferents paisatges energètics. En l'eix vertical es representa l'energia lliure, mentre que els eixos horitzontals representen els graus de llibertat de les diferents conformacions. Cada conformació possible està representada en un punt en el paisatge. D_1 , D_2 i D_3 representen estats desplegats de la proteïna mentre que N representa l'estat natiu d'aquesta. (A) Representació d'un paisatge ideal, per tant poc probable. El paisatge és llis, el plegament és ràpid. Els camins de plegament i desplegament de la proteïna seran els mateixos. (B) Representació d'un embut de plegament abrupte. Presència de mínims energètics locals poblats per espècies intermediàries. Els camins de plegament i desplegament de la proteïna seran diferents. [92]

Resultats experimentals recents són conseqüents amb aquesta visió. Hi ha una creixent quantitat d'evidències mostrant que la cadena polipeptídica estesa inicial, es plega a través de poblacions heterogènies d'espècies intermediàries parcialment plegades en un equilibri fluctuant. Interpretacions recents d'experiments d'enginyeria de proteïnes, donen suport a la idea que l'estat de transició per la reacció de plegament consisteix en una distribució d'estructures més que en una sola estructura [93].

1.3. La pressió com a eina d'estudi de l'estabilitat i el plegament proteic

Ara que estem entrant en la era de la genòmica estructural, la utilització de la informació estructural en la investigació de la funcionalitat proteica esdevé cada vegada més freqüent.

No obstant, la funcionalitat proteica no està basada en una estructura estàtica sinó més aviat en una estructura dinàmica. Des dels treballs als anys 70 de les primeres mesures de bescanvi d'hidrogen i "fluorescence quenching", i les primeres simulacions

per dinàmica molecular, la comunitat biofísica/bioquímica ha mostrat un interès creixent en les fluctuacions de l'estructura proteica.

L'ordre conformacional s'ha associat a la funció en molts casos, incloent unió a lligands i catàlisis i també interaccions proteïnes-àcids nucleics. No obstant, identificar i estudiar els subestats conformacionals proteics funcionalment rellevants no és senzill, en gran part degut a que els estats objecte d'interès representen una població baixa. En aquest context, la pressió ha esdevingut una eina única per provar la proximitat d'aquests subestats a l'estat desplegat o a l'estat plegat. L'alta pressió té la propietat que la pertorbació que provoca en les macromolècules en solució depèn únicament dels canvis de volum del procés [94]. Aquesta característica contrasta amb les pertorbacions causades per l'alta temperatura i els agents desnaturalitzants químics, els efectes dels quals depenen d'altres factors. Un increment en la temperatura produeix canvis simultanis en l'energia i el volum total, mentre que els efectes d'un desnaturalitzant químic depèn de les seves propietats d'interacció amb la molècula d'estudi. Tot i així, per algunes proteïnes, la pressió sola no causa una desnaturalització completa degut a petits canvis en el volum o a una gran estabilitat. Aquest fet fa necessari combinar la pressió amb la temperatura (alta o baixa) i/o amb agents desnaturalitzants químics [95, 96].

En general, els estats conformacionals de les proteïnes difereixen en el seu grau d'organització i per tant en la solvatació, una peculiaritat que pot ser explotada utilitzant la pressió hidrostàtica. De fet, l'efecte de la pressió en l'estructura proteica afavoreix els estats que mostren el volum específic més petit, ja que la derivada del canvi en l'energia lliure de Gibbs entre dos estats en funció de la pressió és igual a la seva diferència en volum. Per tant, l'aplicació de la pressió pot portar a una població de conformacions de proteïna, incloent estats poc excitats i conformacions parcialment o completament desplegades, ja que tots aquests estats exhibeixen un grau d'ordre baix, i per tant estan més solvatades, que l'estat natiu. Utilitzant la pertorbació per pressió també es pot mesurar el coeficient de compressibilitat isotèrmic $\beta = (-1/V)(dV/dp)$, de diversos estats de les proteïnes. La compressibilitat macroscòpica està relacionada amb la fluctuació del volum (dV/V) en l'estat conformacional, i pot aportar informació addicional sobre la dinàmica estructural. Per exemple, mesures utilitzant NMR de proteïnes natives o d'intermediaris de plegament en funció de la pressió, indiquen la compressibilitat de

cada residu, proporcionant, per tant, coneixements sobre la fluctuació en el volum (i per tant de la dinàmica) de tota l'estructura.

El decrement en el volum específic induït per pressió i observat en el desplegament parcial o global d'una proteïna nativa es creu que pot ésser degut a la combinació de diversos efectes: l'electroestricció de les molècules d'aigua al voltant dels nous grups carregats i polars exposats al solvent, al decrement en volum específic dels residus hidrofòbics després de la transferència de l'interior proteic no polar a l'aigua, i a l'eliminació dels defectes d'empaquetament. La magnitud de la disminució en volum en el desplegament és petita, aproximadament 0,5-1% del total del volum específic de la proteïna, i els canvis de volum per les poblacions d'intermediaris tendeixen a ser encara més petits. Tot i així, donada l'estabilitat marginal de la majoria de proteïnes, els canvis de volum d'aquesta magnitud normalment resulten en un desplegament complet per sota de 800MPa.

La magnitud relativa de les contribucions individuals de l'electroestricció, la hidratació o els defectes d'empaquetament al valor del canvi de volum en l'equilibri conformacional proteic, encara no ha estat clarificat i, en el cas que el canvi de volum estigui acompanyant a l'exposició dels residus hidrofòbics, fins i tot el signe de la contribució del canvi de volum encara és objecte de debat [97].

L'alta pressió es pot utilitzar també per aconseguir temperatures per sota de zero, que no impliquin congelació de la mostra, per tal d'estudiar la desnaturalització per fred i/o per estudis dissociatius ja que disminueix el punt de congelació de l'aigua (per exemple a -20°C a 200MPa) [98]. Pel que fa a la solvatació hidrofòbica, la pressió i les baixes temperatures tenen un efecte additiu. Les conformacions parcialment plegades de moltes proteïnes desnaturalitzades per pressió inclouen una quantitat substancial d'aigua, i la desnaturalització per pressió no té lloc quan l'aigua és retinguda [99]. D'aquesta manera, en termes de volum i d'hidratació, les proteïnes no s'ajusten al model hidrofòbic tal i com clàssicament s'entén, encara que avenços teòrics recents indiquen una relació entre la hidratació hidrofòbica i el volum exclòs [100, 101]. A més a més, estrictament parlant, és precisament en les característiques d'empaquetament de les proteïnes on resideixen l'especificitat de les seves estructures individuals i la seva estabilitat [102, 103]. S'han obtingut evidències que suggereixen que les cavitats internes en l'estructura d'una proteïna contribueixen en la magnitud del canvi de volum observat [104], però s'han d'estudiar més casos per determinar el grau amb què les

cavitats internes i els defectes d'empaquetament contribueixen a l'efecte de la pressió en l'estructura proteica.

En els últims anys, s'han realitzat un gran nombre d'estudis dels efectes de la pressió en l'estructura proteica utilitzant NMR multidimensional d'alta resolució. Estudis de NMR d'una o dues dimensions de diverses proteïnes han revelat efectes suaus de pressió en els seus estats plegats [105]. Molts d'aquests efectes són deguts a la compressibilitat dels ponts d'hidrogen, la qual varia al llarg de l'estructura d'una proteïna donada, i segons els angles de torsió i l'orientació de les hèlix. Fuentes i Wand [106] han demostrat, examinant la dependència del bescanvi d'hidrogen de la pressió hidrostàtica, que diferents regions de l'apocitocrom b_{562} exhibeixen diferents sensibilitats a la pressió.

A part de modificar les poblacions minoritàries d'estats conformacionals alternatius que no difereixen gaire de l'estat natiu, la pressió pot provocar un desplegament més substancial. Un nombre relativament gran de treballs indiquen que la desnaturalització proteica a l'equilibri induïda per pressió va associada a canvis de volum de desplegament d'entre -10 i -250 ml mol⁻¹ [107]. Estudis de NMR d'una i dues dimensions a altes pressions han revelat la presència d'estructura secundària residual en els estats desnaturalitzats per pressió, com és el cas del repressor Arc [108, 109]. També s'han observat poblacions d'intermediaris parcialment plegats durant el desplegament per pressió pel lisozim i la dihidrofolat reductasa [88].

Estudis comparatius de nucleasa estafilococal utilitzant fluorescència a altes pressions, espectroscòpia a l'infraroig amb transformada de Fourier (FTIR), NMR i escombrat de raigs X d'angle petit (SAXS) [79, 110, 111] indiquen que la pressió provoca una disrupció completa de l'estructura terciària, deixant present només un petit grau residual de estructura secundària semblant a un full β .

Els estudis cinètics sota altes pressions s'han iniciat recentment [78, 112]. Els estudis de relaxació de salts de pressió poden revelar la base cinètica per la desestabilització de l'estat natiu de les proteïnes sota pressió. Encara que els salts de temperatura s'han utilitzat com un mètode de relaxació en el passat, els investigadors han començat a utilitzar els salts de pressió com una via per a pertorbar un equilibri. El sistema es desplaça cap a aquest nou equilibri a través d'un temps de relaxació que és l'invers de la constant de velocitat. En el cas de la nucleasa estafilococal, els temps de

relaxació mesurats per salts de pressió amb fluorescència, FTIR, NMR i SAXS van ser idèntics, indicant que els paràmetres d'ordre depenen de la velocitat limitant del mateix pas [79, 110, 111]. Cal dir que per aquesta proteïna i pel repressor trp, salts de pressió, tant positius com negatius, tornant a pressió atmosfèrica, donaven un perfil de relaxació mono-exponencial sense fase de “burst”, implicant la desestabilització dels intermediaris i una modificació del conjunt desplegat. En aquest i d'altres estudis descrits [80, 82], l'efecte de la pressió provoca una disminució significativa de la velocitat de plegament, mentre que la velocitat de desplegament, o bé es veu només lleugerament afectada o tendeix a incrementar amb l'augment de la pressió. Aplicant la teoria de l'estat de transició de Eyring, la disminució de la velocitat de plegament induïda per la pressió pot ser entesa en termes d'un volum d'activació positiu pel plegament, indicant que el pas des de l'estat desplegat a l'estat de transició està acompanyat per deshidratació i col·lapse de la cadena (acompanyat dels corresponents defectes d'empaquetament) resultant en un increment del volum específic. En tots els casos estudiats fins avui, els valors de volum d'activació pel plegament i el desplegament posicionen l'estat de transició més a prop de l'estat plegat al llarg de la coordenada de reacció corresponent al volum específic.

La teoria del paisatge energètic ha portat a un mecanisme de plegament, unificat, proporcionant un context per a millors aproximacions experimentals i teòriques [88, 113]. Aquesta visió actual del plegament contrasta amb el concepte inicial d'un sol camí de plegament amb uns intermediaris químics perfectament definits.

La forma de l'embut s'origina amb l'increment de la fracció de molècules amb contactes nadius (paràmetre Q) (figura 1.3) a mesura que progressa la reacció [113]. El coeficient de difusió configuracional depèn tant dels moviments locals permesos per la proteïna com de la rugositat de la superfície del paisatge energètic [88]. En alguns casos, la pressió podria incrementar la rugositat local d'un paisatge limitant els moviments locals permesos per la proteïna i d'aquesta manera disminuir el coeficient de difusió mentre energèticament es desestabilitzarien trampes degut a l'increment de volum específic. Aquesta possibilitat es podria utilitzar per a explicar els comportaments cinètics simplificats en algunes proteïnes malgrat la disminució observada en les constants de velocitat de plegament. Aquesta disminució en la velocitat de plegament també es podria explicar per un efecte directe en la barrera energètica (ΔG^\ddagger). En altres casos, la profunditat de les trampes en l'embut pot augmentar i per tant

estabilitzar els intermediaris. En aquesta darrera situació les configuracions atrapades es troben més hidratades i tenen, per tant, un volum més petit. En aquest cas, la rugositat del paisatge incrementa i els intermediaris que estan només poblats transitòriament en els experiments de replegament a pressió atmosfèrica, i són per tant més difícils de detectar, poden ser caracteritzats sota altes pressions [108, 109, 114-118].

2. La Ribonucleasa de pàncrees boví (RNasa A)

Per tal de comprendre el plegament d'una proteïna, és important caracteritzar els diferents estats involucrats en el procés. És a dir, l'estat natiu o plegat, l'estat desplegat, els estats intermediaris (si n'hi ha) i els estats de transició. Aquesta caracterització cal realitzar-la tant estructuralment com termodinàmicament i establir les relacions cinètiques entre els diferents estats. La cristal·lografia de raigs X i l'espectroscòpia de NMR han estat àmpliament utilitzades en la determinació de l'estructura tridimensional de l'estat natiu de les proteïnes. En la caracterització de l'estat desplegat s'han utilitzat diferents tècniques biofísiques especialment l'espectroscòpia NMR heteronuclear multidimensional. En el cas de proteïnes que presenten intermediaris de plegament, s'han utilitzat també una gran diversitat de tècniques per tal de caracteritzar-los. Els estats de transició, degut a la seva naturalesa efímera constitueixen els "intermediaris" productius menys abundants en el camí de plegament de la proteïna.

Això impedeix estudiar-los experimentalment d'una forma directa i ha motivat el desenvolupament de mètodes indirectes per a la seva caracterització. En aquestes aproximacions a l'estudi dels estats de transició, les característiques d'aquestes espècies es van deduir inicialment a partir de les conseqüències cinètiques derivades de canvis en les condicions experimentals [119] i posteriorment a partir de com es veia afectada la cinètica de plegament degut a una mutació determinada en la seqüència d'aminoàcids. Aquesta segona estratègia es basa en l'anomenat mètode d'enginyeria de proteïnes o anàlisi dels valors Φ inicialment desenvolupat per Fersht i col·laboradors [74]. Aquest mètode d'estudi, ha esdevingut un dels mètodes amb més potencial per a l'estudi i caracterització dels estats de transició del plegament proteic (veure apartat 1.2.3.).

La majoria d'aquests estudis han estat realitzats a pressió atmosfèrica utilitzant diferents agents físico-químics pertorbadors de l'equilibri de plegament com ara la temperatura, pH o reactius químics com la urea o el clorur de guanidina. Els efectes de

la pressió en les proteïnes són coneguts des de les observacions realitzades inicialment per Bridgman [120]. I tanmateix, durant molt de temps l'estudi de les biomolècules sota condicions de pressió alta s'ha vist dificultat, en bona part degut a limitacions tècniques. Actualment però, la majoria de les metodologies emprades per a estudiar el comportament de les macromolècules, i en particular l'estudi del plegament proteic, s'han adaptat per tal de poder treballar a les altes pressions [121].

La Ribonucleasa A (RNasa A E.C. 3.1.27.5.) ha estat també utilitzada com a model per a estudiar els efectes de la pressió en les diferents etapes involucrades en el plegament d'una cadena polipeptídica. En estudis previs a la realització d'aquest treball s'ha combinat l'enginyeria de proteïnes i diferents tècniques físico-químiques amb la finalitat d'estudiar l'estat plegat, l'estat desplegat i l'estat de transició del plegament proteic induïts per pressió de la RNasa A. Cal fer esment també que la RNasa A ha estat subjecte d'una gran quantitat d'estudis de plegament utilitzant una gran diversitat de tècniques [122-125]. Això la converteix en un bon model atès que permet la comparació dels resultats obtinguts utilitzant diferents agents desnaturalitzants. Aquesta secció però se centrarà en els resultats obtinguts utilitzant pressió com a agent desnaturalitzant per a l'estudi dels diferents estats del plegament de la RNasa A.

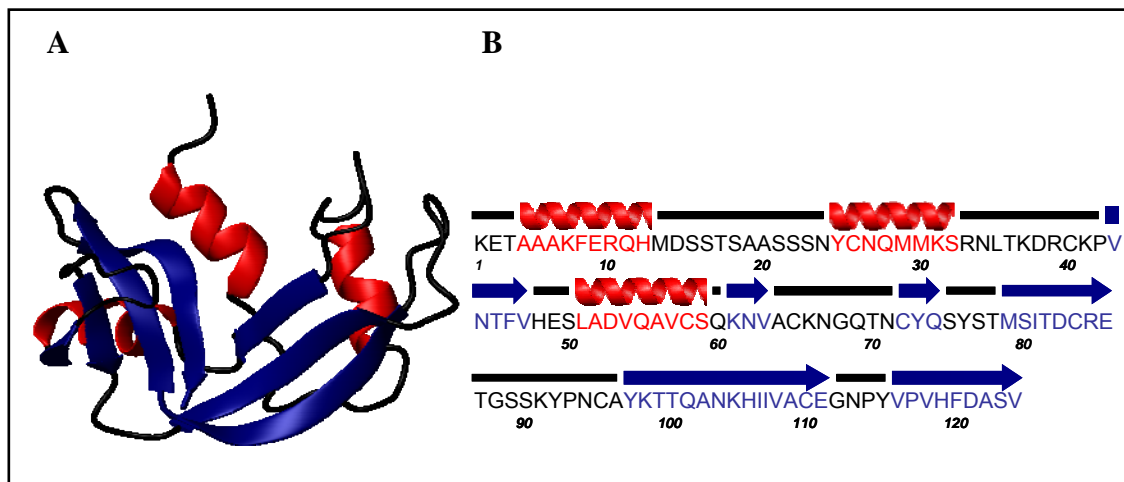
2.1. Estructura tridimensional de la RNasa A: l'estat natiu

La RNasa A és una proteïna d'un sol domini que catalitza la degradació de l'RNA. Conté 124 residus, amb quatre ponts disulfur a les posicions 26-84, 40-95, 58-110 i 65-72. La seva estructura és ben coneguda. Ha estat resolta mitjançant raigs-X [126, 127] i NMR [128, 129]. L'estructura consisteix en tres hèlix α : hèlix α I (residus 4-12), hèlix α II (residus 25-32) i hèlix α III (residus 51-59), i un full β antiparal·lel format per la cadena β I (residus 43-47), la cadena β II (residus 61-63), la cadena β III (residus 72-74), la cadena β IV (residus 79-86), la cadena β V (residus 97-111) i la cadena β VI (residus 116-124) (figura 1.4). Hi ha també quatre residus de prolina a les posicions 42, 93, 114, 117, dues de les quals, Pro93 i Pro114, es troben en l'estat natiu en posició *cis*.

La RNasa A es pot convertir en RNasa S per la hidròlisi de l'enllaç peptídic entre la Ala20 i la Ser21 utilitzant la subtilisina. Els dos fragments, S-peptid (residus 1-20) i la S-proteïna (residus 21-124), es poden aïllar i reconstituir per donar un complex

no covalent completament funcional. L'estructura cristal·logràfica de la RNasa S és molt similar a l'estructura de la RNasa A [130], encara que mostra una estabilitat menor [131-133].

Figura 1.4



Representació esquemàtica de la molècula de RNasa A a partir de l'estructura cristal·lina [127], visualitzada amb el programa MOLMOL [134]. S'assenyalen els elements predominants d'estructura secundària (A) i a partir de la seqüència d'aminoàcids amb la corresponent assignació d'estructura secundària calculada amb el programa PROCHECK [135] (B).

2.2. L'estat desnaturalitzat per pressió de la RNasa A

Molts estudis de l'estat desnaturalitzat per pressió de la RNasa A estan d'acord, en què aquest estat es troba molt lluny de considerar-se una estructura completament desplegada i que conté una quantitat significativa d'estructura secundària.

En un estudi molt interessant del grup de Jonas [136, 137] es van analitzar i comparar els estats desnaturalitzats per fred, calor i pressió de la RNasa A utilitzant l'espectroscòpia NMR, monodimensional i bidimensional, centrant-se en les regions aromàtiques i alifàtiques. Una troballa significativa en aquest treball va ser que l'estat desnaturalitzat per pressió de la RNasa A a pH baixos retenia estructura plegada, en particular prop de l'extrem N-terminal.

En aquestes condicions l'estat desnaturalitzat per pressió de la RNasa A exhibeix certes característiques d'un "glòbul fos" o un estat intermediari compacte, el qual sembla una molècula col·lapsada amb estructura secundària semblant a l'estat natiu i amb un interior líquid. A més a més, mentre s'estudiava el bescanvi d'hidrogen/deuteri d'aquest estat desnaturalitzat per pressió de la RNasa A es va trobar que les estructures

estabilitzades per ponts d'hidrogen protegeixen els hidrògens amida de l'esquelet del bescanvi amb el solvent, principalment en el nucli de fulls β . Aquest fet dóna encara més suport a la existència d'un estat desnaturalitzat amb una estructura semblant a un "glòbul fos".

A partir d'aquests estudis es va concloure que les estructures dels estats desnaturalitzats per pressió i per fred són diferents de l'estructura de l'estat desnaturalitzat per calor: mentre que els primers presenten algun tipus d'estructura residual, en particular al voltant del residu His12, aquestes estructures no són presents en l'estat desnaturalitzat per calor tant a altres pressions com a pressió atmosfèrica. La comparació dels espectres dels estats desnaturalitzats per pressió i per fred de la RNasa A indica que l'estat desnaturalitzat per fred encara està més estructurat que l'estat desnaturalitzat per pressió en la regió N-terminal.

L'estat desnaturalitzat per pressió de la RNasa A també ha estat estudiat per diferents grups utilitzant diferents tècniques espectroscòpiques [83, 138, 139]. Els resultats del nostre grup i els de Panick i Winter estan d'acord amb els obtinguts per NMR i amb el fet que l'estat desnaturalitzat per pressió de la RNasa A reté un grau significatiu d'estructura secundària. En el nostre cas utilitzant FTIR, aquest fet és cert fins i tot en aquelles variants més desestabilitzades [138]. En els espectres per FTIR, es va observar que el màxim de la banda amida I' de l'espectre de l'estat desnaturalitzat per pressió de la RNasa A és diferent del màxim de l'espectre de l'estat desnaturalitzat per calor, la qual cosa indica que els dos estats són estructuralment diferents. La major intensitat a 1670 cm^{-1} de l'espectre de l'estat desnaturalitzat per temperatura suggereix un major contingut en llaços, mentre que la major intensitat a 1630 cm^{-1} de l'espectre de l'estat desnaturalitzat per pressió indica un major contingut en fulls β . Els resultats trobats per Takeda i col·laboradors indiquen que els estats desnaturalitzats per pressió i per temperatura de la RNasa A no retenen estructura residual, però els grups de l'esquelet peptídic de l'estat desnaturalitzat per pressió estan hidratats d'una manera més estable. La discrepància entre els resultats descrits per Takeda [139] i els altres treballs esmentats no és del tot clara. En relació amb aquests resultats cal esmentar que els mateixos autors han dut a terme estudis comparatius dels estats desnaturalitzats per pressió de la RNasa A i la RNasa S en els quals han trobat que l'estat desnaturalitzat per pressió de la forma S no és tant desestructurat com el de la forma A [140]. Aquest

resultat sembla sorprenent, ja que la forma S presenta una estabilitat conformacional reduïda [131-133] comparada amb la RNasa A.

En general, les evidències experimentals indiquen que els estats desnaturalitzats per pressió de les proteïnes retenen més estructures secundàries que els estats desnaturalitzats per temperatura o agents químics, i la RNasa A no n'és cap excepció.

2.3. Estudis de desplegament en l'equilibri

La RNasa A es desplega a pressions relativament altes, tot i que els paràmetres termodinàmics varien depenent de les condicions experimentals (pH i temperatura). Per exemple, a pH 2.5 i 20°C té un valor al mig de la transició de 600 MPa [83], mentre que a pH 5.0 i 40°C aquest valor està al voltant de 500 MPa [141]. Aquests valors són alts comparats amb altres proteïnes i són deguts probablement a la presència dels quatre ponts disulfur que uneixen els vuit residus de cisteïna que té la RNasa A. Sota diferents condicions experimentals, el procés de desplegament per pressió de la RNasa A és completament reversible i segueix un mecanisme en dos estats. Aquest fet permet el càlcul dels paràmetres termodinàmics, entre els quals, el volum de reacció és d'especial interès. Des dels primers estudis de Gill i Glogovsky [142] i Brandts i col·laboradors [143] fins als estudis més recents [83, 138, 141, 144, 145], s'ha trobat sempre un valor negatiu per el volum de reacció (ΔV) de la RNasa A. Aquest volum de reacció es va observar que depenia de la temperatura i el pH de la mostra [146]. En un estudi inicial [147], es va proposar un diagrama de fases de pressió-temperatura de forma el·líptica on, per a la majoria de temperatures, el canvi de volum de desplegament era més petit que zero. A més a més, quan es va seguir el procés de desplegament per pressió de la RNasa A a diferents temperatures, mantenint el pH constant, els volums de reacció de desplegament trobats van ser negatius per a totes les temperatures assajades [143]. Aquest resultat demostra que l'expansivitat tèrmica del volum molar parcial de l'estat desplegat és més gran que el de l'estat natiu. S'han observat resultats similars per altres proteïnes, proporcionant una explicació plausible pel canvi de signe del volum de reacció de desplegament a altes temperatures [146].

Tal com s'ha esmentat abans, tot i que està àmpliament acceptat que el signe del volum de reacció en el desplegament per pressió de les proteïnes és negatiu, almenys en temperatures no extremes, encara és tema de controvèrsia què contribueix realment a la

magnitud d'aquest canvi de volum del desplegament a l'equilibri [146]. No obstant, es pensa que pot ser degut a deficiències en l'empaquetament de l'estat natiu [100, 104, 148] i diferències en les interaccions amb el solvent entre l'estat natiu i l'estat desplegat [100, 149]. L'estructura de la RNasa A nativa no presenta cavitats prou grans com per acomodar molècules d'aigua en el seu interior [127]. El canvi de volum més gran descrit és de -59 ml/mol [136] que correspon només a un 0,52% del volum total de la proteïna. Així doncs, fins i tot petites diferències en la proteïna nativa podrien contribuir al volum de reacció.

Altres contribucions a ΔV són degudes a canvis en les interaccions entre el solvent i la cadena polipeptídica. Aquest efecte és especialment pronunciat al voltant dels grups carregats (electroestricció). Atès que els estudis de desplegament induït per pressió de la RNasa A s'han dut a terme a diferents pH, des de 2.0 fins a 7.0 [146], no es pot descartar que l'electroestricció contribueixi als valors de ΔV de la RNasa A, especialment per aquells experiments a valors alts de pH on els grups carboxil estan ionitzats parcialment o completament. La RNasa A és una proteïna bàsica en la qual hi ha un predomini de grups bàsics respecte al nombre de grups àcids. Com que no es troben grups bàsics enterrats a l'interior de la proteïna nativa, no és d'esperar que hi hagi contribucions degudes a l'electroestricció al voltant de les càrregues positives [127]. No es pot descartar però, una contribució dels grups àcids, depenent del pH de l'experiment, als canvis de ΔV , tot i que aquesta contribució sigui probablement molt petita. Per tant, és possible assumir que la disminució en volum de l'estat desplegat per pressió de la RNasa A és principalment una conseqüència de les deficiències d'empaquetament en el cor hidrofòbic de la proteïna, així com dels canvis en les interaccions amb el solvent per part de la cadena polipeptídica, mentre que la contribució de l'electroestricció seria mínima. Això estaria amb concordança amb el que està descrit per altres proteïnes [82, 104, 148, 150].

Quan es va estudiar l'evolució de l'estructura secundària i terciària de la RNasa A en funció de l'increment de pressió, emprant FTIR i espectroscòpia d'absorció en l'ultraviolat de quarta derivada [83, 138, 141], transicions locals i globals mostraren un comportament similar suggerint un mecanisme de desnaturalització concertat. Es van observar, trencaments simultanis d'elements d'estructura secundària i canvis pronunciats en l'ambient dels grups de la cadena lateral de les tirosines, la qual cosa suggerí que es tractava d'un procés de desplegament altament cooperatiu. Això no està

d'acord amb resultats obtinguts per NMR [136]. En aquest treball Zhang i col·laboradors, observaren que cada un dels residus de histidina seguia una corba de desnaturalització diferent, el que indicava que es tractava d'un procés de desplegament no cooperatiu. No obstant, els mateixos autors reivindicaven que degut als límits d'exactitud experimental en determinar el grau de desplegament a cada pressió, no podien interpretar els seus resultats experimentals com una prova inequívoca de què el procés de desplegament per pressió de la RNasa A no era cooperatiu. De fet, un estudi independent [144], on el desplegament per pressió de la RNasa A era seguit per NMR, conclouia que els canvis en la intensitat de les ressonàncies dels protons ϵ de les histidines es produïen de forma paral·lela, la qual cosa suggeria que el procés de desplegament podria ser un procés cooperatiu.

2.4. L'estabilitat de la RNasa A estudiada per mutagènesi dirigida utilitzant pressió

Scheraga i col·laboradors van utilitzar la mutagènesi dirigida per oligonucleòtid en la RNasa A principalment, per estudiar el camí de plegament oxidatiu i el no oxidatiu a pressió atmosfèrica, alterant els residus de Cys i Pro (per estudiar les reaccions de plegament lent causades per la isomerització cis-trans dels enllaços peptídics Xaa-Pro), respectivament (Shin i col. [151] i Bhat i col. [152], i les referències citades en aquests treballs).

En el nostre grup es van començar a estudiar variants de la RNasa A a altes pressions, introduint canvis en els residus hidrofòbics descrits com a membres del centre d'inici del plegament proteic (CFIS) situat a l'extrem C-terminal de la molècula (aminoàcids 106-118) [153, 154]. La majoria de les substitucions d'aminoàcids van ser dissenyades per ser conservatives, delecions no disruptives. Així doncs les cadenes laterals apolars llargues es van truncar sistemàticament. Es van comparar els processos de desplegament induïts per pressió i temperatura de 13 variants, de les posicions 106, 107, 108, 109, 116 i 118, utilitzant tant l'espectroscòpia d'absorció en l'ultraviolat de quarta derivada com FTIR [138, 141]. També es va seguir el procés de desnaturalització tèrmica utilitzant la calorimetria de rastreig diferencial [155]. Per a totes les variants, es va observar un procés de desplegament en dos estats i reversible, tant per pressió com per temperatura. Amb aquests estudis es van obtenir valors d'energia lliure de

desplegament virtualment idèntics tant pels experiments de desplegament induïts per pressió com pels induïts per temperatura. Aquest fet suggerí que el mecanisme de desplegament és comparable i concertat per tota la sèrie de proteïnes variants i implicà que el procés de desplegament requereix una energia equivalent ja sigui induït per pressió o per temperatura. La correlació observada entre els canvis d'estabilitat per pressió i per temperatura per a les diferents variants mostrà que les substitucions de cada un dels aminoàcids tenien un efecte anàleg en el desplegament induït per pressió i en l'induït per temperatura. No es van trobar diferències significatives en l'estat plegat de les diferents variants en relació a l'enzim salvatge, així la correlació entre els valors de ΔG_P i ΔG_T mostrà que el desplegament per pressió i per temperatura resulta en estructures de l'estat desplegat amb únicament petites diferències energètiques. No obstant, com s'ha apuntat abans, s'han descrit diferències estructurals entre els estats desplegats induïts per pressió i per temperatura de la RNasa A salvatge [136] i també es van trobar canvis entre els estats desplegats induïts per pressió i temperatura de les diferents variants utilitzant FTIR [138]. En resum, encara que els estats desnaturalitzats induïts per pressió i temperatura siguin energèticament equivalents per a totes les variants, presenten diferències estructurals.

El mencionat CFIS es va proposar com a part d'un lloc de nucleació més gran present en un dels dos lòbuls de l'estructura de la RNasa A [132, 156]. Aquest nucli redefinit comprèn les quatre regions β Lys62-Ala64, Cys72-Ser75, Ile106-Cys110 i Val116-His119, juntament amb la cara de l'hèlix α III que conté els residus Val54 i Val57.

A part dels resultats descrits, Chatani i col·laboradors van estudiar el desplegament induït per pressió i per temperatura de variants construïdes a la posició 46 [145] ocupada en l'enzim salvatge per un residu de Phe. Només un dels canvis introduïts en aquesta posició era conservatiu, mentre que les altres dues substitucions introduïdes eren per residus carregats (Phe46Glu i Phe46Lys). En base al canvi de pendent en representar ΔG_P vs ΔG_T , calculats a diferents temperatures per les proteïnes variants respecte a la proteïna salvatge, els autors suggereixen un paper per la Phe46 com a residu clau per l'estabilització d'un segon nucli hidrofòbic, situat al límit dels dos lòbuls de l'estructura de la RNasa A.

OBJECTIUS

Objectius

Està descrit que el principal centre de nucleació o d'inici del plegament de la RNasa A (CFIS) coincideix amb el nucli hidrofòbic més important d'aquest enzim, constituït per les regions plegades en fulla β : Lys62-Ser64, Cys72-Ser75, Ile106-Cys110 i Val116-His119, juntament amb la cara de l'hèlix α III que conté els residus de Val 54 i Val 57. El nostre grup de recerca va iniciar l'estudi de la contribució dels aminoàcids hidrofòbics de la regió 106-118 sobre l'estabilitat de l'enzim comparant el procés de desnaturalització induït per pressió i per temperatura de variants d'aquesta regió. L'estudi tenia com a objectius, en primer lloc, caracteritzar les posicions més crítiques per a l'estabilitat de l'enzim i, en segon lloc, comparar el procés de desnaturalització induït per pressió amb el provocat per temperatura. Malgrat que es coneix des de fa temps que la pressió provoca la desnaturalització proteica, aquest és un procés relativament poc conegut.

En el present treball de tesi ens proposarem continuar els estudis de l'equilibri ampliant el nombre de variants analitzades i alhora començar estudis cinètics de plegament proteic emprant pressió com a inductor del desplegament. A la literatura es troben relativament pocs treballs que combinin l'ús de mutants amb tècniques de salts de pressió amb la qual cosa l'estat de transició del procés de desplegament proteic induït per pressió és molt poc conegut. Així doncs els objectius proposats van ésser:

1. Comprovar quins residus del principal nucli hidrofòbic de la RNasa A eren més crítics per a la seva estabilitat.
2. Comparar el procés de desnaturalització induït per pressió amb el provocat per temperatura emprant un nombre estadísticament significatiu de variants senzilles (fins a 31).
3. Avaluar la importància energètica de les forces hidrofòbiques en front del grau d'empaquetament dels residus del principal nucli hidrofòbic de l'enzim.
4. Comprovar el grau de plasticitat d'aquest nucli hidrofòbic calculant energies d'interacció emprant cicles termodinàmics de dobles mutants.

5. Estudiar l'estat de transició del procés de desplegament de la RNasa A induït per pressió (tècniques de salts de pressió) emprant les variants del nucli hidrofòbic principal més crítiques per a l'estabilitat de l'enzim (mètode dels valors Φ).
6. Comparar la informació obtinguda sobre l'estat de transició del procés de desnaturalització induït per pressió a partir del mètode dels valors Φ amb la informació obtinguda a partir dels volums d'activació.
7. Estudiar la cinètica de plegament de la RNasa A emprant salts de pressió a diferents temperatures, introduint una sonda fluorescent en la regió descrita com a principal centre de nucleació. La sonda fluorescent triada fou la variant Y115W la qual havia estat caracteritzada prèviament des d'un punt de vista termodinàmic i podia aportar informació local sobre la regió estudiada.
8. Estudiar l'efecte de la temperatura i la viscositat del medi sobre les cinètiques de plegament de la variant Y115W de la RNasa A.

Objectives

It is described that the main chain folding initiation site (CFIS) of RNase A belongs to the major hydrophobic core of this enzyme, which comprises four stranded regions: Lys62-Ser64, Cys72-Ser75, Ile106-Cys110 and Val116-His119, together with the face of helix III which contains Val 54 and Val 57 residues. Our research group previously studied the contribution of the hydrophobic residues of the region 106-118 on the RNase A stability comparing the pressure and temperature-unfolding processes of conservative variants on this region. Two aims were pursued; first to characterize the most critical positions for the stability of the enzyme, and second to compare the pressure- and temperature-unfolding processes. Although it is known that pressure induces protein unfolding, this process remains poorly explored.

In the present work one of the goals was to continue the equilibrium-unfolding studies expanding the number of analyzed variants and at the same time, to initiate protein folding kinetic studies using pressure-jump techniques. In the literature, relatively few works deal with the combined use of mutants and pressure-jump technique. Therefore, the pressure-folding transition state of proteins is scarcely known.

The most precise proposed objectives were:

1. To test which residues of the main hydrophobic core of RNase A were more critical for its stability.
2. To compare the pressure- and temperature-unfolding processes by using a significant number of single variants (up to 31).
3. To evaluate the energetic importance of the hydrophobic interactions in front of the packing degree of the residues of the main hydrophobic core of the enzyme.
4. To test the degree of plasticity of the main hydrophobic core of the enzyme by calculating interaction energies using thermodynamic double mutant cycles.
5. To study the pressure-folding transition state of RNase A (pressure-jump technique) using the most critical variants for the stability of the enzyme (Φ -value analysis).

6. To compare the data obtained from the Φ -value analysis regarding the transition state with the data obtained from the activation volumes.
7. To study the folding kinetics of the RNase A using pressure-jump at different temperatures, by introducing a fluorescent probe in the region described as the main CFIS. The fluorescent probe is a Trp residue introduced at position 115. The Y115W RNase A variant was previously characterized from a thermodynamic point of view, and was considered a good candidate to provide local information on the studied region.
8. To study the effect of temperature and viscosity on the folding kinetics of Y115W RNase A variant.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

«Un viatge de mil milles comença amb un pas»
Laozi

Capítol I

**Pressure- and Temperature-Induced
Unfolding Studies: Thermodynamics
of Core Hydrophobicity and Packing
of Ribonucleasa A.**

**Pressure- and Temperature-Induced Unfolding Studies:
Thermodynamics of Core Hydrophobicity and Packing of
Ribonuclease A**

Josep Font¹, Antoni Benito¹, Joan Torrent^{1,2}, Reinhard Lange², Marc Ribó¹ and Maria
Vilanova^{1*}

¹ Laboratori d'Enginyeria de Proteïnes, Departament de Biologia, Facultat de Ciències,
Universitat de Girona, Campus de Montilivi s/n 17071 Girona (Spain).

² INSERM U710, EA3763, Université Montpellier 2, Place Eugène Bataillon, Bat. 24,
CC 105, 34095 Montpellier Cédex 5, France

*To whom correspondence should be addressed. Fax: +34-972-418-150. E-mail:
maria.vilanova@udg.es

Running title: Pressure-and temperature-unfolding of RNase A

ABSTRACT

In this work we demonstrate that heat and pressure induce only slightly different energetic changes in the unfolded state of RNase A. Using pressure and temperature as denaturants on a significant number of variants, and by determining the free energy of unfolding at different temperatures, we estimated the stability of variants unable to complete the unfolding transition owing to the experimental conditions required for the pressure experiments. The overall set of results allowed us to map the contributions to stability of the hydrophobic core residues of RNase A with the positions most critical for stability being V54, V57, I106 and V108. We also show that the stability differences can be attributed to both hydrophobic interactions and packing density with an equivalent energetic magnitude. The main hydrophobic core of RNase A is tightly packed, as shown by the small-to-large and isosteric substitutions. In addition, we found that large changes in the number of methylene groups have non-additive positive stability interaction energies that are consistent with an exquisite tight core packing and the existence of rearrangements of van der Waals' interactions in the protein interior even after drastic deleterious substitutions.

Keywords: hydrophobic interactions; packing interactions; pressure denaturation; ribonuclease A; temperature denaturation; UV-spectroscopy.

INTRODUCTION

The finding that steric factors may be more important in determining the course of protein evolution than functional group conservation or codon similarity is consistent with the fact that protein cores are tightly packed (Richards, F.M. 1977) and that cavities in protein interiors tend to be few in number and small (Connolly, M.L. 1986; Rashin, A.A., et al. 1986). A well packed protein optimizes van der Waals' interactions and minimizes protein cavities. A cavity represents the loss of potential van der Waals' interactions, not to mention the associated entropic cost. The degree to which core packing determines structural individuality and thermodynamic stability is not yet fully understood. Randomization studies have shown that drastic changes in composition may be tolerated in the hydrophobic core, while retaining the ability to fold or function, and suggest that hydrophobicity is a sufficient requirement for core positions (Lim, W.A., and Sauer, R.T. 1989; Baldwin, E.P., et al. 1993; Axe, D.D., et al. 1996). On the contrary, it has been proposed that specific core packing arrangements are critical for maintaining protein stability (Finucane, M.D., and Woolfson, D.N. 1999).

The ability of the local environment to adapt to core substitutions is highly context-dependent, so that the same substitutions made at different positions of the hydrophobic core can have widely varying effects that are difficult to predict, even if structural information is available. The capacity to predict precisely how packing interactions and stability will change following hydrophobic core substitutions is useful in the process of homology modelling of unknown proteins and in understanding how modifications of the core packing may affect protein shape and function.

Several groups (Baldwin, E., et al. 1996; Zhang, H., et al. 1996; Holder, J.B., et al. 2001; Di Nardo, A.A., et al. 2003) have focused on the effects of perturbing the packing of protein hydrophobic cores by altering side chain size and shape, and comparing the importance of packing and hydrophobic interactions in stabilizing the folded state of proteins. Furthermore, accessibility to large set of protein sequences and structures and determination the thermodynamic stability of core variants have shown that packing is a crucial selection factor in the evolution of protein hydrophobic cores (Chen, J., and Stites, W.E. 2001) and that mutations that favor optimal native state interactions have been selected during evolution ahead of those that could increase folding rates (Kim, D.E., et al. 1998).

To improve our knowledge on the relationship between the nature of interactions in the protein interior and the stability of the folded state, and to broaden our study on the effect of pressure as a denaturant compared to temperature we used ribonuclease A (RNase A) as a model.

RNase A (EC. 3.1.27.5) is a single domain protein that contains 124 residues, with four native disulphide bonds at positions 26-84, 40-95, 58-110 and 65-72. Its native structure is well known, it has been solved by X-ray crystallography (Wlodawer, A., and Sjolín, L. 1983; Wlodawer, A., et al. 1988) and by NMR spectroscopy (Rico, M., et al. 1991; Santoro, J., et al. 1993).

In a previous work, our group used site-directed mutagenesis to alter hydrophobic residues described as belonging to a chain folding initiation site (CFIS) located at the C-terminal part of the molecule (amino acids 106-118). The temperature and pressure-equilibrium unfolding of these mutants in relation to the wild-type enzyme were studied using fourth-derivative absorption spectroscopy, FTIR and differential scanning calorimetry (Coll, M.G., et al. 1999; Torrent, J., et al. 1999; Torrent, J., et al. 2001). The above mentioned CFIS was further described as belonging to a wider nucleation site present in one of the two lobes that can be distinguished in the RNase A structure (Neira, J.L., et al. 1999; Kolbanovskaya, E.Y., et al. 2000) which comprises the four stranded region Lys62-Ala64, Cys72-Ser75, Ile106-Cys110 and Val116-His119 together with the face of helix III which contains Val54 and Val57 (see Figure 1). Therefore, we widened our study by looking at different hydrophobic residues from this putative nucleation site. These new variants have been thermodynamically characterized by monitoring the pressure- and temperature-induced unfolding using UV absorption spectroscopy. The results obtained with conservative large-to-small substitutions allow a direct comparative characterization of the stability of an extensive set of variants using pressure and temperature-induced protein unfolding under identical experimental conditions. These data allow us to illustrate a complete map of the contribution of each of the core residues to the stability of the enzyme.

Pressure is used much less as a denaturing agent compared to chemicals or heat. However, it provides information about the thermodynamics of the chemical equilibrium that is reversibly perturbed, including the system volume. Hence, it is of interest to investigate how the pressure data can be connected to data for other denaturing agents (Taulier, N., and Chalikian, T.V. 2002). With this aim, we studied the

relationship between the free energies associated to the pressure- and temperature-induced unfolding of RNase A and variants of the hydrophobic core.

Replacing residues that are critical to stability with larger or isosteric hydrophobic residues allowed us to measure the effect of altering side chain packing in the hydrophobic core. Hence, for these residues we have been able to compare the relative energetic importance of packing and hydrophobicity. Double variants for the more critical positions have led to a deeper understanding of the interactions in the RNase A interior.

RESULTS

The positions selected for study of their contribution to RNase A stability were those defined by Rico and co-workers (Neira, J.L., et al. 1999) as belonging to the putative CFIS and which are occupied by a hydrophobic residue (see Figure 1). Positions V54, V57, I106, I107, V108, A109 have solvent-accessible surfaces smaller than 8 % and are much more buried than V63 (17%), A64 (33.6%), V116 (17.8%) and V118 (17.0%). In addition, V47 (0.6%) and I81 (2.0%) were included in the study because these residues are located at the edge of the main CFIS. All the large-to-small single substitutions (V47A, V47G, V54A, V54G, V57A, V57G, V63A, V63G, A64G, I81V, I81A, I81G, I106V, I106A, I107V, I107A, V108A, V108G, A109G, V116A, V116G, V118A, V118G) are changes that shorten the hydrophobic side chain instead of modifying its shape. The small-to-large (V54I, V54L, V57I, V57L, V108I, V108L), and the isosteric Ile to Leu replacements (I106L, I107L) were used to evaluate the redistribution of side-chains in the protein interior and thus the contribution of packing to the protein stability. Finally, the double-variants (V54A/I106A, V54A/V108A, V57A/I106A, V57A/V108A, V54I/I106A, V54I/V108A, V57I/I106A, V57I/V108A) affecting positions in which substitutions have shown to be more destabilizing have allowed a better understanding of the interactions existing among these hydrophobic core residues.

Characterization of the produced recombinant proteins

The steady-state kinetic parameters for the cleavage of poly(C) and the hydrolysis of C>p by the whole set of single variants of RNase A are very similar to the values found for the wild-type enzyme (results not shown).

CD spectroscopy was used to discern if there are significant structural differences between the RNase A variants. Spectra monitored in the aromatic region showed a very similar optical activity profile for all the variants at both 15°C and 70°C, which suggests that there is a common folded and denatured state for all of them. The α -helix percentage values calculated are in agreement with the value estimated for the wild-type RNase A by X-ray diffraction crystallography (Wlodawer, A., et al. 1988) and in every case the differences observed are within the error of the methodology. Taken together, the activity and CD results indicate that there are no significant structural differences among all the variants or in relation to the wild-type.

Stability Contribution Analysis of the Single Large-to-Small Variants

To complete the work initiated by our group (Coll, M.G., et al. 1999;Torrent, J., et al. 1999;Torrent, J., et al. 2001) and to probe the strategic importance of all the hydrophobic residues within the redefined CFIS to the stability of the protein, temperature- and pressure-induced unfolding of 12 new variants (V47A, V47G, V54A, V54G, V57A, V57G, V63A, V63G, A64G, I81V, I81A, I81G) were monitored by UV absorbance spectroscopy as described in the materials and methods section.

The thermodynamic parameters of both pressure- and temperature-induced unfolding for the wild-type protein and all the variants are presented in Table 1. Relative changes among the ΔG values for the different variants together with the $T_{1/2}$ or $P_{1/2}$ values, give a consistent idea of the relative stabilities, both between the different sites and between different variants at the same site. Although it is tempting to discuss each result from Table 1 in terms of lost and gained interactions, analyzing each particular mutant would lead to a non-productive rationalization. Instead, we will focus on the broader trends that this large data set may show.

For the wild-type and for all the variants, simple two-state reversible transitions were observed. It is worth mentioning that all the single variants resulted in a loss of stability when using either temperature or pressure as a denaturing agent. Among the variants at each site, the stability follows the order Ile > Val > Ala > Gly although the relative stabilities within each series vary slightly.

In all cases Ile to Val is a destabilizing but well-tolerated substitution with average $\Delta\Delta G$ values for temperature and pressure experiments of 4.27 kJ mol⁻¹ and 3.12

kJ mol^{-1} respectively. Since Ile to Val substitutions are not too deleterious, changes to Ala result in a good measure of the relative stabilities of the different variants. Thus, unfolding studies using either pressure or temperature as an equilibrium-perturbing agent indicate that V47, V54, V57 and I81, together with the previously characterized I106 and V108 are the most critical residues for RNase A stability. However, substitutions at positions V63, I107, V116 and V118 suggest a minor role for these residues while A64 and A109, would play an irrelevant role in maintaining overall RNase A stability.

All the transition curves for the large-to-small variants could be recorded completely when using temperature as a denaturing agent. However, when using pressure, unfolding transition curves for V47G, V54G, V57G, I81G, and V108G were incomplete because all these variants have a $T_{1/2}$ value less than or equal to 41.0°C , and thus at 40°C , the temperature at which the pressure experiments were performed, it was not possible to determine the post-transition region of the curve.

To overcome this technical inconvenient when comparing the wild-type protein with the most unstable variants two approaches were used. First, the pressure unfolding of wild-type RNase A, V54A, V57A, V108A, V54G, V57G, V108G, I106A, I106V and A64G was monitored at various temperatures below the corresponding $T_{1/2}$ values. The thermodynamic parameters (ΔG_P , ΔV) obtained from pressure transition curves at different temperatures are shown in Table 2. ΔG_T was calculated at the temperatures at which pressure-induced-unfolding experiments were conducted. Fitted curves of ΔG_P obtained at different temperatures vs. ΔG_T calculated at the corresponding temperatures were used to estimate the ΔG_P values at 40°C of the V54G, V57G and V108G variants using the experimental ΔG_T values at 40°C from Table 1. Estimated ΔG_P values at 40°C using this approach are listed in Table 2. In the variants for which they are available, these estimated values can be compared with the experimental ΔG_P values from Table 1. A very good linear correlation is obtained, with $R = 0.96$ or higher. All the variants showed $\Delta G_P/\Delta G_T$ values between 1.57 ± 0.2 (for the wild-type protein) and 0.92 ± 0.12 (for the V57G variant).

In a second approach, the ΔG_P values at 40°C for these proteins were also estimated using the linear equation derived from the fitting of ΔG_T vs. ΔG_P experimentally obtained for all the variants (data from Table 1). Within experimental

errors, ΔG values are very similar for pressure and thermal unfolding. Therefore, it is possible to estimate (Table 2) the ΔG_P (40°C) of V47G, V54G, V57G, I81G, and V108G for which transitions were incomplete at 40°C. Hence, this approach allows the thermodynamic parameters of very unstable variants to be estimated and compared to the wild-type protein for a given temperature, provided that highly destabilized variants follow a similar linear $\Delta G_P / \Delta G_T$ relationship.

Remarkably, there is a good correspondence among the estimated ΔG_P values (Table 2) when using the linear equation obtained for the ΔG_P vs. ΔG_T at different temperatures for each particular variant or when using the linear equation derived from ΔG_P vs. ΔG_T obtained for the different variants at 40°C. While the latter approach can be used for estimating ΔG at 40°C for any variant, the former, measuring ΔG_P of a particular variant at different temperatures, allows this parameter to be estimated at any temperature, provided that linearity holds at the temperatures at which ΔG_P is estimated.

For wild-type RNase A and some of the variants, an experimental value of ΔG_P at 40°C is available. In such cases good correlation is also found between the experimental and estimated values of ΔG_P at 40°C obtained by the two approaches. It is also apparent (Table 2) that the second approach yields estimated values closer to the experimental ΔG_P value determined at 40°C in most of the cases analyzed.

Stability Contribution Analysis of the Single Small-to-Large Variants and Isothermic Substitutions

To further understand the nature of the contribution of the residues most critical to RNase A stability, the effects of altering side chain packing in the hydrophobic core were quantitatively investigated by introducing small-to-large substitutions, for which Val residues of positions 54, 57, and 108 were replaced by Ile or Leu. These positions were selected because of their critical role in stability and because all of their C β -C β atomic distances are ≤ 6.61 Å which indicates that they are in close proximity in the tertiary structure and that their side chains pack against each other. All unfolding transitions were observed to be reversible. The fitted thermodynamic parameters are listed in Table 1, together with those of I106 and I107 characterized in a previous work (Torrent, J., et al. 1999). Isothermic Ile to Leu substitutions are slightly more destabilizing

than the Ile to Val substitutions, which indicates that moving a single methyl group in the protein interior has a higher energetic cost than removing the same group. The effect varies, depending on the position, and is likely influenced by either the hydrophobicity and/or the degree of packing surrounding a particular side-chain. A highly packed interior might easily circumvent the loss of a single methyl group, but it might not be able to accommodate the redistribution of this same group.

Substituting a Val for an Ile or Leu or vice versa did not stabilize the protein in all the variants tested. The isosteric Ile to Leu changes were also unfavourable from an energetic point of view. The relative stabilities due to the presence of different side chains at a given position are shown in Table 3. These data are used in the discussion to evaluate the contribution of packing interactions to the stability of RNase A.

Double variants: Interaction Energy Analysis

Eight double variants involving positions 54, 57, 106 and 108 were constructed to gain a better understanding of the interactions between the residues of the hydrophobic core shown to be critical for RNase A stability. These positions were selected because residues V54 and V57 are located in α -helix III. This secondary structure element packs against the C-terminal β -hairpin, in which the most critical positions for RNase A stability are I106 and V108. Additional reasons were their contribution to the enzyme stability and their proximity in the tertiary structure. The C β -C β distances found for these residues are the smallest of all the distances determined for residues in this study. Furthermore, without taking hydrogens into consideration, these residues have a carbon atom at a distance closer than 4Å from each other. Variants V54A/I106A, V54A/V108A, V57A/I106A, V57A/V108A were double large-to-small variants while V54I/I106A, V54I/V108A, V57I/I106A and V57I/V108A partially compensated the side chain truncation. Overall, all the double variants resulted in losing a varying number (1 to 5) of methyl/methylene groups.

The free energies of temperature-induced unfolding were calculated at 40°C for comparison to the values for the single variants. As shown in Table 4, all of the double variants were more unstable than the wild-type protein. V54A/I106A and V54A/V108A variants have negative ΔG values, which indicates that these positions are not completely folded at 40°C. V57A/I106A and V57A/V108A were not successfully

produced and strong aggregation was observed during the refolding step, which suggests that the refolding and/or the stability is seriously compromised.

Stability changes in the double mutants in relation to the wild-type RNase A ($\Delta\Delta G_{\text{double}}$) are compared in Table 4 to the sum of stability changes of the corresponding single mutants ($\Sigma\Delta\Delta G_{\text{single}}$). The free energy of interaction ($\Delta^2 G_{\text{int}}$) is calculated as described in the materials and methods section. For all the variants, $\Delta\Delta G_{\text{double}} < \Sigma\Delta\Delta G_{\text{single}}$ and thus the $\Sigma\Delta\Delta G_{\text{single}}/\Delta\Delta G_{\text{double}}$ ratio is far from the unity in all the variants which indicates, that the two substituted side chains in these double variants interact strongly with each other.

DISCUSSION

Pressure versus thermal unfolding

In this study we used the dependence of Tyr absorbance on the environmental conditions to monitor the structural changes in the RNase A structure upon denaturation by temperature or pressure. For all the variants, a two state reversible unfolding process is observed for both pressure and temperature. Good correlation ($R = 0.95$) was found between ΔG_P and ΔG_T at 40 °C, for all the variants. The slope, $\Delta G_P(40^\circ\text{C})/\Delta G_T(40^\circ\text{C}) = 1.20 \pm 0.08$, provides an average value of the connection between the two thermodynamic parameters. This correlation implies that for the whole series of variants, the unfolding process requires equivalent energy for both denaturing agents.

Taking into account the fact that significant differences in the folded state have not been observed, as can be deduced from kinetic and CD results, it can be inferred from the $\Delta G_P(40^\circ\text{C})/\Delta G_T(40^\circ\text{C})$ value that pressure and temperature lead to unfolded state structures with only slight energetic differences. The virtual equivalence of free energy for unfolding under pressure, thermal and chemical denaturation was also reported for staphylococcal nuclease (Royer, C.A., et al. 1993; Frye, K.J., et al. 1996; Vidugiris, G.J., et al. 1996; Frye, K.J., and Royer, C.A. 1998; Panick, G., et al. 1999).

However, it should be mentioned that structural differences in the pressure- and heat-induced unfolded state of wild-type RNase A have been described (Zhang, J., et al. 1995). The latter observation was also confirmed in an FTIR study of RNase A variants

(Torrent, J., et al. 2001). While pressure as a denaturing agent appears to lead to a molten globule state, in which native-like secondary structure is retained but solvent is admitted to core regions (Yamaguchi, T., et al. 1995; Zhang, J., et al. 1995), the thermally unfolded state appears to be more extensively unfolded (Zhang, J., et al. 1995).

The ΔV values (Table 1) observed for all the variants are generally more negative than for the wild-type protein, as expected when creating cavities within the interior of the protein. However, no trend is observed for the change in residue volume in the protein interior $-\Delta V_{\text{res}}$ (from Harpaz et al., 1994 (Harpaz, Y., et al. 1994)) which might be symptomatic of rearrangement of the surrounding groups in response to a particular deletion, particularly when there is a high degree of packing.

Pressure-induced unfolding at different temperatures

According to the results observed, ΔG_P is 1.57-fold higher than ΔG_T for the wild-type protein, which suggests that the unfolded states under pressure and temperature are slightly energetically different as observed when the $\Delta G_P(40^\circ\text{C})/\Delta G_T(40^\circ\text{C})$ ratio from all the variants was determined (see previous section). The true meaning of this ratio is not clear. It has previously been suggested (Chatani, E., et al. 2002) that the differences among the observed $\Delta G_P/\Delta G_T$ values obtained at different temperatures might indicate that pressure or temperature have a different effect on the mechanism of unfolding for each particular mutation. This could be argued with the observation that pressure and temperature lead to different structures of the unfolded state (Yamaguchi, T., et al. 1995; Zhang, J., et al. 1995) which does not necessarily imply that the unfolding mechanisms are different. The fact is that a decrease in the stability, as observed for all the variants assayed in this section, makes ΔG_P and ΔG_T more equivalent. This compensates for the differential effect of both denaturing agents, but does not necessarily have an effect on the unfolding mechanism.

The results show that for all the mutants, as well as for the wild-type enzyme, $P_{1/2}$ decreases as the experimental temperature is increased. Under all assay temperatures, the volume change upon unfolding is negative, and its absolute value decreases as the temperature increases. The decrease in the absolute value of ΔV with increasing temperature is equal to the overall change in the coefficient of thermal

expansion between the folded and unfolded states, $\Delta\alpha_U$ (ml/mol deg) (Zipp, A., and Kauzmann, W. 1973; Royer, C.A. 2002). For most of the proteins in this study the absolute value of equilibrium volume change of unfolding decreases linearly ($R = 0.93$ or higher) as the temperature increases. Thus, the thermal expansivity of the partial molar volume of the unfolded states is greater than that of the native states, resulting in positive $\Delta\alpha_U$ values. For V57G and V108G variants the linear relationship between ΔV and T , but also between ΔG_P and T are lost. This might be because at the temperatures used for these variants, the cold denaturation process is initiated.

Hydrophobic Interactions

One of the purposes of the present study was to map the stability contributions of the hydrophobic residues within the main core of RNase A. Using the same equilibrium unfolding conditions and given the similarities in activity and CD profiles allows us to compare the variants directly and interpret thermodynamic changes in terms of perturbations of the well-known wild-type structure.

To evaluate the contribution of the hydrophobic effect to globular protein stability, we applied the analysis developed by Pace (Pace, C.N. 1992) which is based on comparison of the changes in variant stability relative to wild-type protein ($\Delta\Delta G$) with the free energy change in transferring model amino-acid side-chain compounds from water to *n*-octanol (ΔG_{tr}) (Table 5). To correct for variable solvent accessibility, experimental $\Delta\Delta G$ have been scaled to 0% solvent accessibility ($\Delta\Delta G_{bur}$). There is a good correlation between ΔG_{tr} and $\Delta\Delta G_{bur}$ for each particular type of substitution, both for temperature ($R = 0.98$) and pressure ($R = 0.93$) measurements. These results for RNase A are in agreement with those reported in the combined analysis of barnase, staphylococcal nuclease, T4 lysozyme, and gene V protein variants probed using chemical denaturation (Pace, C.N., et al. 1996). The mean decrease in the free energy of unfolding associated to the removal of a methyl(ene) group ($\Delta\Delta G_{bur}/CH_2$) (excluding Xaa to Gly variants) upon pressure and temperature denaturation was 5.31 ± 1.12 and 5.46 ± 0.63 kJ mol⁻¹, respectively. The energetic cost of deleting methyl(ene) groups from the protein interior both pressure and temperature denaturation experiments shows good comparison and with values for equivalent substitutions in other proteins (Serrano, L., et al. 1992; Jackson, S.E., et al. 1993; Pace, C.N., et al. 1996). Taken together, these

data indicate that the contribution of the hydrophobic interactions in the main core of RNase A is at least as quantitatively important as has been described for other proteins.

Packing interactions

It is clear from our results (Table 1), that equivalent amino-acid substitutions at different positions in the protein have a different effect on the overall stability. This variation must arise from dissimilarities, from either the solvent or from the protein, in the environment surrounding the different positions. It is interesting that there are no hydrophobic core mutants that significantly increase thermodynamic stability, which is indicative of a very well-packed core.

In this study V54, V57, I106, I107 and V108 were used to assess the role of packing at the very core of RNase A by calculating the relative stabilities (Table 3) owing the presence of different side-chains (V, L or I) at these positions. The data in Table 3 show that the stability differences are large, in spite of the identity of the wild-type side chain at a particular position. This can be attributed to the high level of burial of these side chains, as observed with a large number of mutants in staphylococcal nuclease (Holder, J.B., et al. 2001). As pointed out by Stites and co-workers, this fact is consistent with the expected effects of packing since good packing optimizes van der Waals' interactions and minimizes cavities, factors that are critical in fully buried residues.

It is interesting to compare the variation in stability between Ile and Leu at various positions. Both residues should have very few differences in hydrophobicity and loss of degrees of freedom upon folding. Comparison of $\Delta\Delta G_{I\rightarrow L}$ values shows that, in all the positions except V54, an Ile is better tolerated than a Leu residue. Since V57 is found in the same α -helix, it is unlikely that the difference could be attributable to a local secondary structure feature. In our models, $S\delta$ and $C\epsilon$ atoms of Met 13 would be closer to the $C\beta$, $C\gamma_1$ and $C\gamma_2$ atoms of an Ile at position 54 than to the $C\beta$, $C\gamma$ or $C\delta_2$ of a Leu at the same position. This would be a feasible explanation for why a Leu side chain is accommodated with less strain in this position, even though both Ile and Leu promote unfavourable steric contacts with surrounding residues. Regardless of the sign, it is clear that the larger $\Delta\Delta G_{I\rightarrow L}$ values correspond to positions in which an Ile residue is found naturally. This is in agreement with a high packing density in the RNase A

interior, where both the van der Waals' interactions and the geometry of the groups that participate in these interactions are important. We have also observed a significant good correlation ($R = 0.91$ for pressure and $R = 0.76$ for temperature data) between $\Delta\Delta G$ and the packing density, represented by the number of methyl(ene) groups plus the $C\alpha$ atoms within a sphere of 6 Å radius of the hydrophobic group deleted. This also indicates that the packing density around a particular residue is important in determining the contribution the residue makes to protein stability. During molecular evolution, important residues in the protein sequence are highly conserved for functional and structural reasons, including structural stability reasons. In accordance with their role in protein stability, buried hydrophobic residues are commonly well conserved during evolution (Koshi, J.M., and Goldstein, R.A. 1997; Finucane, M.D., and Woolfson, D.N. 1999).

Protein sequence alignments have been proposed as a potentially rich source of information for investigating the packing interactions within hydrophobic cores (Di Nardo, A.A., et al. 2003). In the alignment of 41 amino-acid sequences of mammalian ribonucleases (Fitch, W.M., and Beintema, J.J. 1990), it can be observed that of the positions studied in this work, all are extremely well conserved (87 to 100%), except for A64 (44%), which is the most exposed residue with 33.6% solvent-accessible surface area. Furthermore, the few changes in the conserved positions, are always conservative. As observed in other proteins, such as staphylococcal nuclease (Chen, J., and Stites, W.E. 2001; Chen, J., et al. 2004) and the SH3 domain (Di Nardo, A.A., et al. 2003) our results with RNase A core mutants also stress the importance of the core packing interactions in the folded state as a key element in the evolution of protein hydrophobic cores.

Hydrophobic vs. packing interactions

It is now interesting to quantitatively compare the importance of hydrophobicity and packing in energetic terms. Therefore, the absolute value of each $\Delta\Delta G_{V\rightarrow I}$, $\Delta\Delta G_{V\rightarrow L}$ and $\Delta\Delta G_{I\rightarrow L}$ value has been averaged. Since all the positions in this analysis are highly buried, it can be assumed that the change in the amount of buried hydrophobic surface upon mutation does not differ significantly among them and thus it will not complicate interpretation. The average value of absolute $\Delta\Delta G_{I\rightarrow L}$ values at the five positions is

$5.75 \pm 1.75 \text{ kJ mol}^{-1}$. In other words, this is the mean energetic cost of moving a single methyl group in the RNase A hydrophobic core. The average absolute values of $\Delta\Delta G_{V \rightarrow I} = 5.86 \pm 1.09 \text{ kJ mol}^{-1}$ and $\Delta\Delta G_{V \rightarrow L} = 6.31 \pm 1.29 \text{ kJ mol}^{-1}$ give consistency to this result, despite the difference in hydrophobicity. It is clear that the average energetic cost of a V→I substitution is smaller than that associated to the V→L exchange. Since both Val and Ile are β -branched residues, there are fewer packing rearrangements required and this translates into the energetics of each type of substitution. These values are similar to those previously reported (Holder, J.B., et al. 2001) for the hydrophobic packing in staphylococcal nuclease using guanidine hydrochloride-induced unfolding.

When comparing the mean absolute values of the change in free energy associated with a methyl(ene) group burial ($\Delta\Delta G_{\text{bur}}/\text{CH}_2$, 5.46 ± 0.63 and $5.31 \pm 1.12 \text{ kJ mol}^{-1}$ for temperature and pressure, respectively) and with repacking a buried methyl group within the main core ($\Delta\Delta G_{I \rightarrow L}$, $5.75 \pm 1.75 \text{ kJ mol}^{-1}$, only measured for temperature) it is clear that the contribution of packing in the native state of RNase A is of at least equal energetic importance to hydrophobicity in maintaining the native state.

Double variants: Interaction Energies Analysis

To obtain further insight into interactions existing within the main hydrophobic-core residues of RNase A, eight double mutants were made constructed involve four selected positions.

The interaction energy for each variant shown in Table 4 is equal to the difference between the stability changes of the double mutants relative to the wild-type and the sum of the stability changes of corresponding single variants. If $\Delta^2 G_{\text{int}}$ is negative, this indicates that strains are introduced between the substituted side chains, while a positive value of $\Delta^2 G_{\text{int}}$ implies that there are favourable interactions among the modified side chains. All of the double mutants studied have positive $\Delta^2 G_{\text{int}}$ values indicative of non-additive stability effects. This effect is greater the fewer is the number of methyl/methylene groups deleted. Variant V57I/I106A shows greatest non-additive stability effect ($\Delta^2 G_{\text{int}}$), which is approximately 16 kJ mol^{-1} more stable than expected from the component single variants. It is noteworthy that double variants V54A/I106A and V54A/V108A with a change in the number of methylene groups of -5 and -4 respectively, still have non-additive positive $\Delta^2 G_{\text{int}}$ values, which is consistent with an

exquisite taut core packing. The results suggest that V108 plays a key role in the hydrophobic core of the RNase A, since variants in which this position is mutated show a lower Δ^2G_{int} value than the corresponding I106 variant with the same substitution. Comparison of residues V54 and V57, located in α -helix III shows that V57 interactions, either with V108 or I106, are more crucial for the hydrophobic core interactions and for RNase A stability than those established by V54.

Importance of hydrophobic core residues on RNase A stability related to the stability imposed by the disulfide bridges

The relative contribution of each disulfide bond to the conformational stability of RNase A depends on its location within the polypeptide chain relative to other disulfide bonds. The values of $T_{1/2}$ for the C65A-C72A and C40A-C75A RNase A variants are decreased by approximately 19 and 22°C, respectively, while for C26A-C84A and C58A-C110A they are decreased by approximately 34 and 38°C, respectively (Klink, T.A., et al. 2000). Because of the different experimental conditions, these values of $T_{1/2}$ cannot be directly compared to the $T_{1/2}$ values obtained for the variants characterized in this work. However, it is clear from Table 1 that some of the single point mutations of the hydrophobic core of RNase A decrease the $T_{1/2}$ value by an amount similar to that observed upon removal of the most critical disulfide bridges. In addition, the double variants V57A/I106A and V57A/V108A destabilize the protein to a degree that makes its recovery from inclusion bodies impossible. Therefore, RNase A stability depends on the four disulfide bridges, but the hydrophobic core interactions and the high packing of the residues from this core cannot be considered to be less important.

CONCLUSIONS: proposal of a model

Taken together, all the results suggest that V54, V57, I106 and V108 constitute the most critical positions for the stability of the main hydrophobic core of RNase A. In our structure model (Figure 2) these residues adopt a cage-like disposition in which the lid is featured by Phe 8 and Phe 120. Phe 8 has been shown to be an important residue for the stability of RNase S (Richards, F.M., and Wyckoff, H.W. 1971; Goldberg, J.M., and Baldwin, R.L. 1999) and variants at this position have been used as proof of the contribution of van der Waals' interactions to the stability of proteins (Ratnaparkhi,

G.S., and Varadarajan, R. 2000). It is worth to mentioning that V47 and I81 contribute significantly to the stabilization of the folded state and lie in the two-lobe junction of RNase A. We propose that these two residues could act as a link between the hydrophobic cores located within each lobe. The thermodynamics observed for the remaining variants suggests that these positions that surround the main hydrophobic core play a secondary and more localized role in the stability of RNase A. For instance, large-to-small substitutions affecting V63 side chain have not been shown to be critical for the stability of RNase A. However, the side chain of this residue is packed against the I107 side chain with a C β -C β distance of 5.19 Å and both contribute to burying the C65-C72 disulfide bond, perhaps protecting it from reduction. Similarly, A109 packs against Q69 on the opposite side of the same disulfide bond, and both residues could play an equivalent role to that proposed for V63 and I107.

Finally, from the thermodynamic data presented in this work and in the absence of detailed structural analysis, it should be mentioned that some of the mutations constructed can likely promote a conformational change that minimizes the potential cavities formed by the deletions introduced.

MATERIALS AND METHODS

Materials.

Escherichia coli strain BL21(DE3) used for the expression of the recombinant wild-type ribonuclease and the corresponding variants was from Novagen (Madison, WI, USA). Oligonucleotides used for site-directed mutagenesis and molecular biology enzymes were from Roche (Base, Switzerland). Other chemicals were from Sigma (ST. Louis, MO).

Mutagenesis.

Mutant plasmids used to express the different variants were constructed on the pBXR vector (Torrent, J., et al. 1999) by site-directed mutagenesis using the Quick-Change kit from Stratagene (La Jolla, CA, USA). The introduction of mutations was confirmed by sequence determination at the Serveis Tècnics de Recerca of the Universitat of Girona, Spain.

Protein Expression and Purification.

Mutant and wild-type genes were expressed in BL21(DE3) cells using the T7 expression system, and the recombinant proteins were purified essentially as described by torrent et al. (Torrent, J., et al. 1999). Protein purity and homogeneity were confirmed by SDS-PAGE and by cation-exchange using a Mono S HR 5/5 column. Thus single (V47A, V47G, V54A, V54G, V57A, V57G, V63A, V63G, A64G, I81V, I81A, I81G, V54I, V54L, V57I, V57L, V108I, V108L) and double (V54A/I106A, V54A/V108A, V57A/I106A, V57A/V108A, V54I/I106A, V54I/V108A, V57I/I106A, V57I/V108A) RNase A variants were prepared. Their molecular mass was confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry using a Bruker-Biflex equipment at the Servei de Biocomputació i Seqüenciació de Proteïnes of the Institut de Biotecnologia i Biomedicina at the Universitat Autònoma of Barcelona (Spain). Protein concentration was determined by UV spectroscopy using a molar extinction coefficient of $\epsilon_{278} = 9800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Thermodynamic stability determined by temperature and pressure denaturation.

The proteins were dissolved to a concentration of 0.8 mg/mL in 50 mM sodium acetate buffer at pH 5.0, for thermal experiments and in 50 mM MES buffer, pH 5.0, for pressure experiments. These buffers were selected for their relatively small pressure and thermal pH dependencies (Kitamura, Y., and Itoh, T. 1987).

In the temperature-unfolding experiments, the decrease in absorbance at 287 nm (1 nm bandpath) was recorded as a function of temperature at room pressure using a Lambda Bio20 (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA) absorption spectrometer. In the pressure-unfolding experiments a modified Cary3 (Varian, Palo Alto, CA, USA) absorption spectrometer, described elsewhere, was used (Lange, R., Frank, J., Saldana, J.L., Balny, C. 1996). All pressure experiments were initially carried out at 40°C, which allowed most of the transition curve for each protein to be determined within the pressure limitation of the apparatus. The thermodynamic parameters obtained by monitoring the decrease of absorbance at 287 nm single wavelength have been compared to those obtained using the 4th derivative method reported previously (Torrent, J., et al. 1999). $T_{1/2}$ and ΔG_T (40°C) values calculated using both approaches presented differences that were within the standard errors.

To correlate the difference in free energy of pressure- and temperature-induced unfolding, pressure experiments were also performed (see results section) at different temperatures. The ΔG_T values were calculated at each temperature as previously described (Torrent, J., et al. 1999). Following each pressure or temperature increment, typically in steps of 20-50 MPa or 2-5°C respectively, the decrease in absorbance at 287 nm was observed to equilibrate well within a 5-min pause before each measurement.

The equilibrium absorbance intensity was corrected for the pressure-dependent change in volume as previously described (Lange, R., Frank, J., Saldana, J.L., Balny, C. 1996). The equilibrium intensity profile versus pressure was fitted to the following equation:

$$X = \frac{X_n - X_d}{1 + e^{-[(\Delta G + p\Delta V)/RT]}} + X_d \quad (1)$$

Where X_n is the absorbance of the native state, X_d is the absorbance of the denatured state, X is the measured absorbance intensity at 287 nm value for each pressure, ΔG and ΔV are the free energy and volume change of unfolding, respectively.

The free energy of unfolding for pressure (ΔG_p) was measured in relation to the folded state at 40°C and 0.1 MPa. For comparison, the free energy for thermal unfolding (ΔG_T), under the same conditions was calculated as previously described (Torrent, J., et al. 1999). The ΔC_p value was fixed at 5.3±0.1 kJ K⁻¹ mol⁻¹ (Pace, C.N., et al. 1999).

Calculation of Interaction Energies

The difference between the free energy change in the double mutant and the summed stability effects of the component single mutant is the so-called energy of interaction between the two mutated residues. Horovitz and Fersht (Horovitz, A., and Fersht, A.R. 1990) laid out the general theory for evaluating the energetics of side chain interactions between multiple residues. The interactions energy ($\Delta^2 G_{\text{int}}$), where n indicates the number of side chains being modified is defined by these authors as:

$$\Delta^2 G_{\text{int}} = \Delta \Delta G_{\text{double}} - (\Delta \Delta G_{\text{single1}} + \Delta \Delta G_{\text{single2}}) \quad (2)$$

To estimate the error in $\Delta^2 G_{\text{int}}$ calculation, the procedure followed by Stites and co-workers (Chen, J., and Stites, W.E. 2001) was used. The experimental error for determining ΔG based on the reproducibility of wild-type denaturation is ±0.21 kJ mol⁻¹

Therefore, the error in Δ^2G_{int} is $\sigma(\Delta^2G_{\text{int}}) = \pm 0.42 \text{ kJ mol}^{-1}$. If Δ^2G_{int} falls in the range of $0 \pm 0.42 \text{ kJ mol}^{-1}$, the stability of the double variant is considered experimentally indistinguishable from that predicted by the effects of single variants. In other words, the effects are said to be additive.

Determination of Steady-State Kinetic Parameters.

Spectrophotometric assays were used to determine the kinetic parameters for the cleavage of poly(cytidylic) acid (poly(C)) and the hydrolysis of cytidine 2',3'-cyclic monophosphate (C>p) by wild-type and variant RNase A, as previously described (Boix, E., et al. 1994; Torrent, J., et al. 1999). Steady-state kinetic parameters were obtained by non-linear regression analysis using the program ENZFITTER (Leatherbarrow, R.J. 1987).

Circular Dichroism Spectroscopy.

Circular dichroism spectra were recorded using a Jasco-J715 spectropolarimeter equipped with a thermostated cell holder. All proteins were dissolved in 10 mM sodium cacodylate buffer, pH 5.0, and were performed as previously described (Torrent, J., et al. 1999). Spectra were signal-averaged over four scans. The dichroic absorbance for the solvent was subtracted using the Jasco software. The far-UV CD spectra were deconvoluted using the DICHPROT suite of programs (Deleage, G., and Geourjon, C. 1993). The α -helix content was estimated from the molar ellipticity value at 222 nm from the far-UV spectra using the method reported by (Chen, Y.H., et al. 1972).

Molecular Modelling.

To gain structural insight into the effect of amino acid substitutions and to correlate changes in interactions and stability, the different RNase A variants were modeled and superimposed on the wild-type structure. The variant models were generated with the TURBO-FRODO program (Roussel, A., and Cambillau, C. 1989) based on the RNase A protein crystal structure (PDB code: 7rsa) (Wlodawer, A., et al. 1988). Energy minimization of the wild-type structure and the variant models without water molecules was performed with the program GROMOS (van Gunsteren, W.F., and Berendsen, H.J.C. 1991) for 10 runs of 1000 steps each. Optimized models were superimposed and solvent-accessible surfaces were calculated using the XAM program (Xia, T.H. 1992). Packing densities were estimated by counting the number of carbon atoms at a distance of less than 6 Å of the methyl carbon affected by the substitution.

The number of contacts of the deleted side chain was calculated using the program CONTACT from the CCP4 package (Potterton, E., et al. 2003). Secondary structures were assigned with the DSSP program (Kabsch, W., and Sander, C. 1983).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants BMC2003-08458-CO2-02 from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain) and SGR01-00196 from DGR, Generalitat de Catalunya. JF acknowledges a fellowship from the University of Girona. Support was also received from the “Fundació M. F. de Roviralta” of Barcelona for equipment purchase. This work was undertaken within the frame of the European COST-D30 action.

REFERENCES

- Axe, D. D., Foster, N. W., and Fersht, A. R. (1996). Active barnase variants with completely random hydrophobic cores. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 5590-5594.
- Baldwin, E., Xu, J., Hajiseyedjavadi, O., Baase, W. A., and Matthews, B. W. (1996). Thermodynamic and structural compensation in "size-switch" core repacking variants of bacteriophage T4 lysozyme. *J Mol Biol* *259*, 542-559.
- Baldwin, E. P., Hajiseyedjavadi, O., Baase, W. A., and Matthews, B. W. (1993). The role of backbone flexibility in the accommodation of variants that repack the core of T4 lysozyme. *Science* *262*, 1715-1718.
- Boix, E., Nogues, M. V., Schein, C. H., Benner, S. A., and Cuchillo, C. M. (1994). Reverse transphosphorylation by ribonuclease A needs an intact p2-binding site. Point mutations at Lys-7 and Arg-10 alter the catalytic properties of the enzyme. *J Biol Chem* *269*, 2529-2534.
- Coll, M. G., Protasevich, II, Torrent, J., Ribo, M., Lobachov, V. M., Makarov, A. A., and Vilanova, M. (1999). Valine 108, a chain-folding initiation site-belonging residue, crucial for the ribonuclease A stability. *Biochem Biophys Res Commun* *265*, 356-360.
- Connolly, M. L. (1986). Atomic size packing defects in proteins. *Int J Pept Protein Res* *28*, 360-363.
- Chatani, E., Nonomura, K., Hayashi, R., Balny, C., and Lange, R. (2002). Comparison of heat- and pressure-induced unfolding of ribonuclease a: the critical role of Phe46 which appears to belong to a new hydrophobic chain-folding initiation site. *Biochemistry* *41*, 4567-4574.
- Chen, J., Lu, Z., Sakon, J., and Stites, W. E. (2004). Proteins with simplified hydrophobic cores compared to other packing mutants. *Biophys Chem* *110*, 239-248.
- Chen, J., and Stites, W. E. (2001). Packing is a key selection factor in the evolution of protein hydrophobic cores. *Biochemistry* *40*, 15280-15289.
- Chen, Y. H., Yang, J. T., and Martinez, H. M. (1972). Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion. *Biochemistry* *11*, 4120-4131.
- DeLano, W. L. (2002). The Pymol Molecular Graphics System. ed., pp. The Pymol Molecular Graphics System. DeLano scientific LLC, San Carlos, CA, USA
- Deleage, G., and Geourjon, C. (1993). An interactive graphic program for calculating the secondary structure content of proteins from circular dichroism spectrum. *Comput Appl Biosci* *9*, 197-199.
- Di Nardo, A. A., Larson, S. M., and Davidson, A. R. (2003). The relationship between conservation, thermodynamic stability, and function in the SH3 domain hydrophobic core. *J Mol Biol* *333*, 641-655.
- Fauchère, J. L., and Pliska, V. (1983). Hydrophobic parameters π of amino acid side chains from the partitioning of N-acetyl-amino acid amides. *Eur. J. Med. Chem.* *18*, 369.
- Finucane, M. D., and Woolfson, D. N. (1999). Core-directed protein design. II. Rescue of a multiply mutated and destabilized variant of ubiquitin. *Biochemistry* *38*, 11613-11623.
- Fitch, W. M., and Beintema, J. J. (1990). Correcting parsimonious trees for unseen nucleotide substitutions: the effect of dense branching as exemplified by ribonuclease. *Mol Biol Evol* *7*, 438-443.
- Frye, K. J., Perman, C. S., and Royer, C. A. (1996). Testing the correlation between ΔA and ΔV of protein unfolding using m value mutants of staphylococcal nuclease. *Biochemistry* *35*, 10234-10239.
- Frye, K. J., and Royer, C. A. (1998). Probing the contribution of internal cavities to the volume change of protein unfolding under pressure. *Protein Sci* *7*, 2217-2222.
- Goldberg, J. M., and Baldwin, R. L. (1999). A specific transition state for S-peptide combining with folded S-protein and then refolding. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 2019-2024.
- Harpaz, Y., Gerstein, M., and Chothia, C. (1994). Volume changes on protein folding. *Structure* *2*, 641-649.
- Holder, J. B., Bennett, A. F., Chen, J., Spencer, D. S., Byrne, M. P., and Stites, W. E. (2001). Energetics of side chain packing in staphylococcal nuclease assessed by exchange of valines, isoleucines, and leucines. *Biochemistry* *40*, 13998-14003.

- Horovitz, A., and Fersht, A. R. (1990). Strategy for analysing the co-operativity of intramolecular interactions in peptides and proteins. *J Mol Biol* 214, 613-617.
- Jackson, S. E., Moracci, M., elMasry, N., Johnson, C. M., and Fersht, A. R. (1993). Effect of cavity-creating mutations in the hydrophobic core of chymotrypsin inhibitor 2. *Biochemistry* 32, 11259-11269.
- Kabsch, W., and Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22, 2577-2637.
- Kim, D. E., Gu, H., and Baker, D. (1998). The sequences of small proteins are not extensively optimized for rapid folding by natural selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4982-4986.
- Kitamura, Y., and Itoh, T. (1987). Reaction volume of protonic ionization for buffering agents - Prediction of pressure-dependence of pH and pOH. *J.Sol. Chem.* 16, 715-725.
- Klink, T. A., Woycechowsky, K. J., Taylor, K. M., and Raines, R. T. (2000). Contribution of disulfide bonds to the conformational stability and catalytic activity of ribonuclease A. *Eur J Biochem* 267, 566-572.
- Kolbanovskaya, E. Y., Terwisscha van Scheltinga, A. C., Mukhortov, V. G., Ardelt, W., Beintema, J. J., and Karpeisky, M. Y. (2000). Localization and analysis of nonpolar regions in onconase. *Cell Mol Life Sci* 57, 1306-1316.
- Koshi, J. M., and Goldstein, R. A. (1997). Mutation matrices and physical-chemical properties: correlations and implications. *Proteins* 27, 336-344.
- Lange, R., Frank, J., Saldana, J.L., Balny, C. (1996). Fourth derivative UV-spectroscopy of proteins under high pressure. *Eur Biophys J* 24, 277-283.
- Leatherbarrow, R. J. (1987). ENZFITTER: A Non-Linear Regression Data Analysis Program for the IBM-PC. ed., pp. ENZFITTER: A Non-Linear Regression Data Analysis Program for the IBM-PC. Elsevier Biosoft, Cambridge
- Lim, W. A., and Sauer, R. T. (1989). Alternative packing arrangements in the hydrophobic core of lambda repressor. *Nature* 339, 31-36.
- Neira, J. L., Sevilla, P., Menendez, M., Bruix, M., and Rico, M. (1999). Hydrogen exchange in ribonuclease A and ribonuclease S: evidence for residual structure in the unfolded state under native conditions. *J Mol Biol* 285, 627-643.
- Pace, C. N. (1992). Contribution of the hydrophobic effect to globular protein stability. *J Mol Biol* 226, 29-35.
- Pace, C. N., Grimsley, G. R., Thomas, S. T., and Makhatadze, G. I. (1999). Heat capacity change for ribonuclease A folding. *Protein Sci* 8, 1500-1504.
- Pace, C. N., Shirley, B. A., McNutt, M., and Gajiwala, K. (1996). Forces contributing to the conformational stability of proteins. *Faseb J* 10, 75-83.
- Panick, G., Malessa, R., and Winter, R. (1999). Differences between the pressure- and temperature-induced denaturation and aggregation of beta-lactoglobulin A, B, and AB monitored by FT-IR spectroscopy and small-angle X-ray scattering. *Biochemistry* 38, 6512-6519.
- Potterton, E., Briggs, P., Turkenburg, M., and Dodson, E. (2003). A graphical user interface to the CCP4 program suite. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59, 1131-1137.
- Rashin, A. A., Iofin, M., and Honig, B. (1986). Internal cavities and buried waters in globular proteins. *Biochemistry* 25, 3619-3625.
- Ratnaparkhi, G. S., and Varadarajan, R. (2000). Thermodynamic and structural studies of cavity formation in proteins suggest that loss of packing interactions rather than the hydrophobic effect dominates the observed energetics. *Biochemistry* 39, 12365-12374.
- Rico, M., Santoro, J., Gonzalez, C., Bruix, M., Neira, J. L., Nieto, J. L., and Herranz, J. (1991). 3D structure of bovine pancreatic ribonuclease A in aqueous solution: an approach to tertiary structure determination from a small basis of ¹H NMR NOE correlations. *J Biomol NMR* 1, 283-298.
- Richards, F. M. (1977). Areas, volumes, packing and protein structure. *Annu Rev Biophys Bioeng* 6, 151-176.

- Richards, F. M., and Wyckoff, H. W. (1971). Bovine pancreatic ribonuclease A. In: *The Enzymes*, ed. eds. P. D. Boyer (Academic Press, New York), pp. 647-806.
- Roussel, A., and Cambillau, C. (1989). TURBO-FRODO. ed., pp. 77-79. Silicon Graphics, Mountain View, CA
- Royer, C. A. (2002). Revisiting volume changes in pressure-induced protein unfolding. *Biochim Biophys Acta 1595*, 201-209.
- Royer, C. A., Hinck, A. P., Loh, S. N., Prehoda, K. E., Peng, X., Jonas, J., and Markley, J. L. (1993). Effects of amino acid substitutions on the pressure denaturation of staphylococcal nuclease as monitored by fluorescence and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry 32*, 5222-5232.
- Santoro, J., Gonzalez, C., Bruix, M., Neira, J. L., Nieto, J. L., Herranz, J., and Rico, M. (1993). High-resolution three-dimensional structure of ribonuclease A in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Mol Biol 229*, 722-734.
- Serrano, L., Kellis, J. T., Jr., Cann, P., Matouschek, A., and Fersht, A. R. (1992). The folding of an enzyme. II. Substructure of barnase and the contribution of different interactions to protein stability. *J Mol Biol 224*, 783-804.
- Sharp, K. A., Nicholls, A., Friedman, R., and Honig, B. (1991). Extracting hydrophobic free energies from experimental data: relationship to protein folding and theoretical models. *Biochemistry 30*, 9686-9697.
- Taulier, N., and Chalikian, T. V. (2002). Compressibility of protein transitions. *Biochim Biophys Acta 1595*, 48-70.
- Torrent, J., Connelly, J. P., Coll, M. G., Ribo, M., Lange, R., and Vilanova, M. (1999). Pressure versus heat-induced unfolding of ribonuclease A: the case of hydrophobic interactions within a chain-folding initiation site. *Biochemistry 38*, 15952-15961.
- Torrent, J., Rubens, P., Ribo, M., Heremans, K., and Vilanova, M. (2001). Pressure versus temperature unfolding of ribonuclease A: an FTIR spectroscopic characterization of 10 variants at the carboxy-terminal site. *Protein Sci 10*, 725-734.
- van Gunsteren, W. F., and Berendsen, H. J. C. (1991). *Groningen Molecular Simulations (GROMOS)*. ed., pp. Groningen Molecular Simulations (GROMOS). Biomos, Groningen, The Netherlands
- Vidugiris, G. J., Truckses, D. M., Markley, J. L., and Royer, C. A. (1996). High-pressure denaturation of staphylococcal nuclease proline-to-glycine substitution mutants. *Biochemistry 35*, 3857-3864.
- Wlodawer, A., and Sjolín, L. (1983). Structure of ribonuclease A: results of joint neutron and X-ray refinement at 2.0-Å resolution. *Biochemistry 22*, 2720-2728.
- Wlodawer, A., Svensson, L. A., Sjolín, L., and Gilliland, G. L. (1988). Structure of phosphate-free ribonuclease A refined at 1.26 Å. *Biochemistry 27*, 2705-2717.
- Xia, T. H. (1992). Software for determination and visual display of NMR structures of proteins: the distance geometry program DGPLAY and the computer graphics programs CONFOR and XAM. ed., pp. Ph. D. Dissertation, ETH Zurich
- Yamaguchi, T., Yamada, H., and Akasaka, K. (1995). Thermodynamics of unfolding of ribonuclease A under high pressure. A study by proton NMR. *J Mol Biol 250*, 689-694.
- Zhang, H., Skinner, M. M., Sandberg, W. S., Wang, A. H., and Terwilliger, T. C. (1996). Context dependence of mutational effects in a protein: the crystal structures of the V35I, I47V and V35I/I47V gene V protein core mutants. *J Mol Biol 259*, 148-159.
- Zhang, J., Peng, X., Jonas, A., and Jonas, J. (1995). NMR study of the cold, heat, and pressure unfolding of ribonuclease A. *Biochemistry 34*, 8631-8641.
- Zipp, A., and Kauzmann, W. (1973). Pressure denaturation of metmyoglobin. *Biochemistry 12*, 4217-4228.

Table1.- Thermodynamic parameters calculated from temperature and pressure denaturation curves of wild-type and its variants forms at 40°C and 0.1 MPa. ^a

Variant	Temperature-unfolding			Pressure-unfolding		
	$\Delta H_{T_{1/2}}$ (kJ mol ⁻¹)	$T_{1/2}$ (°C)	ΔG_T^c (kJ mol ⁻¹)	ΔV (cm ³ mol ⁻¹)	$P_{1/2}$ (MPa)	ΔG_p (kJ mol ⁻¹)
Wild type	437(12)	58.0 (0.1)	21.16 (0.67)	-46.5 (3.3)	529 (22.5)	24.61 (0.70)
large-to-small substitutions						
V47A	346 (7)	45.0 (0.1)	5.26 (0.94)	-73.4 (2.1)	87 (2.4)	6.39 (0.81)
V47G ^b	309 (9)	31.2 (0.1)	-9.55 (0.32)	-	-	-
V54A	365 (14)	49.8 (0.1)	10.37 (0.60)	-71.3 (0.9)	189 (0.4)	13.55 (0.22)
V54G ^b	323 (4)	40.8 (0.0)	0.80 (0.19)	-	-	-
V57A	363 (8)	48.7 (0.1)	9.23 (0.54)	-63.9 (1.0)	160 (0.6)	10.23 (0.23)
V57G ^b	308 (6)	38.1 (0.1)	-1.93 (0.82)	-	-	-
V63A	398 (5)	58.1 (0.0)	12.69 (0.57)	-57.6 (2.0)	235 (2.2)	13.59 (0.63)
V63G	356 (6)	46.1 (0.1)	6.53 (0.36)	-59.7 (2.6)	173 (4.2)	10.35 (0.76)
A64G	440 (7)	55.8 (0.1)	19.34 (0.58)	-51.7 (2.7)	502 (8.8)	25.90 (5.90)
I81V	412 (5)	57.3 (0.2)	19.37 (1.22)	-57.8 (3.8)	405 (1.5)	23.46 (1.82)
I81A	377 (4)	47.7 (0.1)	8.66 (0.57)	-60.6 (2.2)	164 (0.5)	9.96 (0.71)
I81G ^b	337 (11)	41.0 (0.1)	1.07 (0.15)	-	-	-
I106V	431 (21)	55.0 (0.1)	17.81 (0.94)	-52.8 (2.7)	330 (0.4)	17.42 (0.91)
I106A	301 (14)	43.1 (0.2)	2.87 (0.21)	-63.4 (3.8)	39 (5.5)	2.50 (0.50)
I107V	422 (17)	58.6 (0.1)	20.83 (0.96)	-52.2 (6.9)	455 (16.1)	23.75 (2.30)
I107A	405 (13)	47.7 (0.1)	9.26 (0.32)	-47.4 (2.3)	209 (2.7)	9.89 (0.35)
V108A	350 (10)	43.3 (0.1)	3.59 (0.14)	-55.9 (2.7)	56 (2.7)	3.13 (0.30)
V108G ^b	237 (9)	29.4 (0.2)	-9.31 (0.37)	-	-	-
A109G	455 (21)	55.4 (0.1)	19.36 (0.98)	-53.2 (3.4)	446 (5.4)	23.72 (1.23)
V116A	447 (27)	54.8 (0.2)	18.38 (1.22)	-53.6 (1.5)	374 (0.8)	20.04 (0.52)
V116G	468 (52)	53.6 (0.1)	16.21 (0.57)	-57.9 (3.8)	318 (1.6)	18.41 (1.30)
V118A	454 (89)	52.5 (0.1)	13.12 (0.60)	-51.2 (3.9)	317 (1.4)	16.25 (1.31)
V118G	451 (58)	47.9 (0.1)	9.56 (0.36)	-55.1 (4.8)	216 (8.1)	11.90 (1.48)
isosteric and small-to-large substitutions						
I106L	410 (15)	51.7 (0.1)	13.68 (0.54)	-47.7 (1.7)	267 (2.7)	12.72 (0.58)
I107L	435 (19)	49.4 (0.1)	11.98 (0.58)	-47.5 (1.0)	244 (2.4)	11.60 (0.36)
V54L	405 (92)	54.7 (0.1)	16.62 (0.12)	ND	ND	ND
V54I	316 (14)	55.4 (0.2)	13.02 (0.17)	ND	ND	ND
V57L	367 (14)	50.7 (0.1)	11.25 (0.13)	ND	ND	ND
V57I	336 (26)	57.8 (0.4)	15.73 (0.25)	ND	ND	ND
V108L	422 (10)	55.6 (0.1)	18.23 (0.14)	ND	ND	ND
V108I	399 (11)	58.1 (0.1)	19.34 (0.16)	ND	ND	ND

^a Numbers in parentheses are the standard errors of the data.

^b Unfolding transition curves of these variants were incomplete at 40°C.

^c ΔG_T was calculated at 40°C as previously described (Torrent, J., et al. 1999) to be comparable to ΔG_P

ND, not determined

Table 2.- Thermodynamic parameters calculated from pressure transition curves at different temperatures. ^c

protein	T (°C)	P _{1/2} (MPa)	ΔV (ml mol ⁻¹)	ΔG _p (kJ mol ⁻¹)	ΔG _p [40°C] (kJmol ⁻¹) ^b	ΔG _p [40°C] (kJmol ⁻¹) ^c
wild-type	50.0	371 (9.6)	-43.96 (2.1)	14.46 (0.41)	32.76	24.92
	52.0	319 (4.8)	-39.85 (1.6)	12.74 (0.34)		
	55.0	249 (1.2)	-38.55 (4.5)	10.86(1.06)		
V54A	30.0	284 (0.6)	-85.19 (3.2)	24.27 (0.87)	12.66	11.97
	35.0	237 (0.2)	-73.07 (3.3)	16.51 (0.77)		
	37.0	221 (0.1)	-69.58 (2.6)	16.20 (0.60)		
	40.0	189 (0.1)	-71.33 (1.0)	13.55 (0.20)		
	42.0	165 (1.0)	-63.49 (1.6)	10.49 (0.33)		
V57A	25.0	290 (0.6)	-86.31 (2.4)	25.07 (0.64)	10.14	10.60
	30.0	254 (0.1)	-76.23 (1.9)	19.41 (0.49)		
	35.0	213 (0.1)	-73.48 (1.8)	15.66 (0.38)		
	40.0	160 (0.3)	-63.95 (1.0)	10.23 (0.17)		
V108A	20.0	240 (0.4)	-95.30 (5.3)	22.93 (1.25)	4.34	3.84
	25.0	211 (0.1)	-93.87 (2.6)	19.88 (0.55)		
	30.0	169 (0.2)	-87.90 (2.0)	14.92 (0.36)		
	35.0	129 (2.0)	-80.19 (4.5)	10.37 (0.74)		
V54G	10.0	260 (0.3)	-102.74 (7.2)	26.79 (0.10)	1.17	0.49
	20.0	257 (0.1)	-94.31 (3.6)	19.98 (0.09)		
	30.0	254 (0.6)	-76.23 (4.7)	19.41 (0.09)		
V57G	10.0	231 (0.7)	-81.70 (3.1)	18.88 (0.07)	-1.90	-2.79
	15.0	208 (0.1)	-93.74 (5.2)	19.57 (0.09)		
	20.0	171 (0.1)	-73.71 (4.5)	12.64 (0.07)		
V108G	5.0	129 (1.0)	-107.46 (9.0)	13.97 (0.11)	-9.74	-11.64
	10.0	117 (0.1)	-139.50 (13)	16.44 (0.14)		
	20.0	67 (0.9)	-120.98 (7.8)	8.18 (0.12)		
I106A	20.0	254 (0.7)	-97.36 (4.7)	22.81 (1.13)	4.47	2.97
	25.0	218 (0.1)	-89.54 (2.5)	21.28 (0.55)		
	30.0	177 (0.1)	-84.89 (3.3)	15.04 (0.59)		
	35.0	138 (0.2)	-80.27 (1.1)	11.13 (0.16)		
I106V	32.0	415 (0.1)	-63.95 (0.1)	26.55 (0.1)	17.81	20.90
	37.0	364 (0.2)	-55.62 (4.0)	20.30 (1.4)		
	40.0	329 (0.4)	-52.89 (2.7)	17.42 (0.9)		
	50.0	173 (2.1)	-39.34 (2.9)	6.84 (0.4)		
A64G	48.0	318 (4.2)	-53.64 (2.7)	17.09 (0.63)	29.20	22.74
	50.0	287 (0.5)	-49.18 (2.0)	14.13 (0.55)		
	52.0	224 (10)	-45.20 (12)	10.16 (3.15)		

^a Estimated ΔG_p (40°C) values using the linear equation derived from fitting ΔG_p determined at different temperatures (listed in this Table 2) represented as a function of ΔG_T calculated at the temperatures used for each variant.

^b Estimated ΔG_P (40°C) values using the linear equation derived from the fitting of ΔG_T (40°C) vs. ΔG_P (40°C) experimentally obtained for the wild-type and the variants (values of these thermodynamic parameters are presented in Table 1).

^c Numbers in parentheses are the standard errors of the data.

Table 3.- Relative stability of proteins with different side chains at a given position. ^f

position	$\Delta\Delta G_{V \rightarrow I}$ ^a	$\Delta\Delta G_{V \rightarrow L}$ ^b	$\Delta\Delta G_{I \rightarrow L}$ ^c	$\Delta\Delta G_{wt \rightarrow A}$ ^d	side-chain SASA (%) ^e
V54	-9.58 (0.04)	-5.98 (0.09)	3.6 (0.05)	-12.23 (0.04)	3.1
V57	-6.87 (0.04)	-11.35 (0.08)	-4.48 (0.12)	-13.37 (0.08)	0.9
I106	4.79 (0.73)	-4.13 (0.40)	-8.92 (0.33)	-19.73 (0.00)	1.1
I107	1.77 (0.75)	-8.85 (0.38)	-10.62 (0.37)	-13.34 (0.11)	7.6
V108	-3.26 (0.05)	-4.37 (0.07)	-1.11 (0.02)	-19.01 (0.07)	1.1

^a $\Delta\Delta G_{V \rightarrow I} = \Delta G_{Ile} - \Delta G_{Val}$

^b $\Delta\Delta G_{V \rightarrow L} = \Delta G_{Leu} - \Delta G_{Val}$

^c $\Delta\Delta G_{I \rightarrow L} = \Delta G_{Leu} - \Delta G_{Ile}$

^d $\Delta\Delta G_{wt \rightarrow A} = \Delta G_{Ala} - \Delta G_{wt}$

^e Solvent accessible surface area of the side chain in the wild type structure calculated using the program XAM (Xia, T.H. 1992).

^f Numbers in parentheses are the standard errors of the data.

Table 4-. Thermodynamic parameters from temperature denaturation curves of the double variants. ^e

	ΔG_T^a (kJ/mol)	$\Delta\Delta G_{T\text{double}}$	$\Sigma\Delta\Delta G_{T\text{single}}^d$	$\Delta^2 G_{\text{int}}$	ΔCH_2^b
V54I/I106A	5.13 (0.13)	-17.47	-29.31	11.84	-2
V54I/V108A	2.67 (0.32)	-19.93	-28.60	8.66	-1
V57I/I106A	12.42 (0.37)	-10.18	-26.60	16.42	-2
V57I/V108A	4.75 (0.10)	-17.85	-25.88	8.03	-1
V54A/I106A	-4.36 (0.31)	-26.96	-34.96	8.00	-5
V54A/V108A	-5.45 (0.23)	-28.05	-31.24	3.19	-4
V57A/I106A ^c	-	-	-	-	-5
V57A/V108A ^c	-	-	-	-	-4

^a Calculated at 40°C in order to be comparable to single-mutant data as previously reported (Torrent, J., et al. 1999).

^b Change in the number of methyl(ene) groups upon mutation.

^c The two double variants V57A/I106A and V57A/V108A were expressed but could be not recovered from the insoluble fraction.

^d Calculated from values presented in Table 1.

^e Numbers in parentheses are the standard errors of the data.

Table 5.- Average values of stability losses for equivalent amino acid substitutions made at different positions and relationship with changes in solvent transfer values and residue volume corresponding to the amino acid replacements.

Type of substitution	n ^o . of variants	Temperature denaturation		Pressure denaturation		ΔG_{tr} (kJmol ⁻¹) ^d	$-\Delta V_{res}$ (Å ³) ^e
		$\Delta\Delta G_{bur}$ (kJmol ⁻¹) ^b	$\Delta\Delta G_{bur}/CH_2$ (kJmol ⁻¹) ^c	$\Delta\Delta G_{bur}$ (kJmol ⁻¹) ^b	$\Delta\Delta G_{bur}/CH_2$ (kJmol ⁻¹) ^c		
Ile-Ala	3	16.23	5.41	17.77	5.92	16.07	74.80
Ile-Val	3	4.39	4.39	3.13	3.13	5.69	25.80
Ile-Gly	0 ^a /1	22.98	5.74	-	-	20.29	101.10
Ile-Leu	2	6.94	-	13.25	-	-0.08	0.30
Val-Ala	7	13.19	6.59	13.74	6.87	10.38	49.00
Val-Gly	3 ^a /7	23.01	7.67	13.18	4.39	14.60	75.30
Ala-Gly	2	4.01	4.01	-2.69	-2.69	4.27	26.30

^a For pressure denaturation experiments. When not distinction is made, variants where studied under pressure and temperature.

^b Average $\Delta\Delta G$ values expected for each equivalent amino acid substitution made if the side chain was 100% buried. This value was calculated as previously described (Pace, C.N. 1992; Pace, C.N., et al. 1996)

^c The average $\Delta\Delta G_{bur}$ values for aliphatic side chains have been divided by the number of CH, CH₂ or CH₃ groups.

^d The ΔG_{tr} values corresponding to these amino acid substitutions are based on measurements for water to octanol (Fauchère, J.L., and Pliska, V. 1983) and have been corrected for the difference in volume between the solutes and solvents (Sharp, K.A., et al. 1991).

^e The $-\Delta V_{res}$ values are based on the volumes occupied by buried residues (Harpaz, Y., et al. 1994).

FIGURE LEGENDS

Figure 1.- Ribbon diagram of RNase A structure (A) Schematic representation of the three-dimensional structure of RNase A showing the elements of secondary structure involved in the putative nucleation site proposed by Rico and co-workers (Neira, J.L., et al. 1999). (B) Detail of the hydrophobic core with the side chains of the residues that have been substituted by site-directed mutagenesis (see Table 1) in order to study their contribution to the stability. The figure has been drawn using the program PyMol (DeLano, W.L. 2002).

Figure 2.- Representation of the anticipated model. Residues of the main hydrophobic core of RNase A are shown as spheres of van der Waals radius and coloured according to their contribution to the native state stability: V54, V57, I106 and V108 that constitute the most critical positions are in red, V47 and I81 which are positioned in the two-lobe junction are coloured in white, while the rest of the residues, V63, A64, I107, A109, V116 and V118 are coloured in yellow. The figure has been drawn using the program PyMol (DeLano, W.L. 2002).

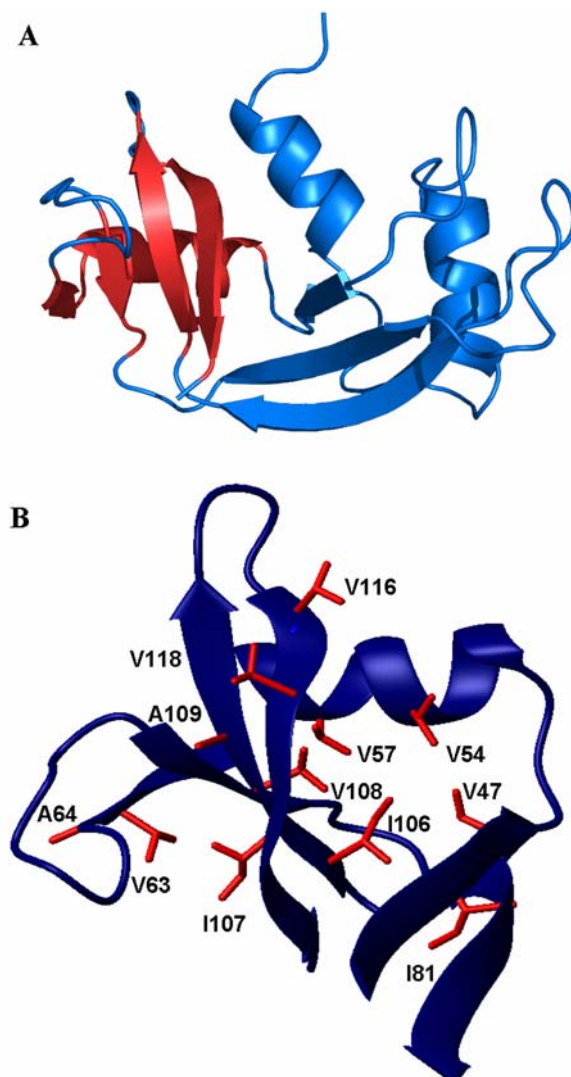
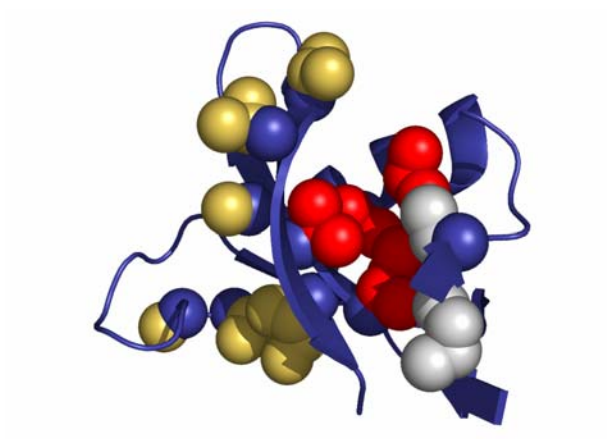
Figure 1

Figure 2



«If we knew what it was we were doing,
it would not be called research,
would it?»
Albert Einstein

Capítol II

**The Contribution of the Residues from
The Main Hydrophobic Core of
Ribonuclease A to Its Pressure-Folding
Transition State**

The Contribution of the Residues from the Main Hydrophobic Core of Ribonuclease A to Its Pressure-Folding Transition State

Josep Font¹, Antoni Benito¹, Reinhard Lange², Marc Ribó¹ and Maria Vilanova^{1*}

¹ Laboratori d'Enginyeria de Proteïnes, Departament de Biologia, Facultat de Ciències, Universitat de Girona, Campus de Montilivi s/n 17071 Girona (Spain).

² INSERM U710, EA3763, Université Montpellier 2, Place Eugène Bataillon, Bat. 24, CC 105, 34095 Montpellier Cédex 5, France.

Running title: Pressure-folding transition state of RNase A.

*To whom correspondence should be addressed: Laboratori d'Enginyeria de Proteïnes, Departament de Biologia, Facultat de Ciències, Universitat de Girona, Campus de Montilivi s/n 17071 Girona (Spain). Fax: +34-972-418-150. E-mail: maria.vilanova@udg.es

ABSTRACT

The role of hydrophobic interactions established by the residues that belong to the main hydrophobic core of ribonuclease A in its pressure-folding transition state was investigated using the Φ -value method. The folding kinetics was studied using pressure-jump techniques both in the pressurization and depressurization directions. The ratio between the folding activation volume and the reaction volume (β_p -value), which is an index of the compactness or degree of solvation of the transition state, was calculated. All the positions analyzed presented fractional Φ_f -values and the lowest were those corresponding to the most critical positions for the ribonuclease A stability. The structure of the transition state of the hydrophobic core of ribonuclease A, from the point of view of formed interactions, is a relatively, uniformly expanded form of the folded structure with a mean Φ_f -value of 0.43. This places it half way between the folded and unfolded states. On the other hand, for the variants, the average of β_p -values is 0.4, suggesting a transition state that is 40% native-like. Altogether the results suggest that the pressure-folding transition state of ribonuclease A looks like a collapsed globule with some secondary structure and a weakened hydrophobic core. A good correlation was found between the Φ_f -values and the $\Delta\beta_p$ -values. Although the nature of the transition state inferred from pressure-induced folding studies and the results of the protein engineering method have been reported to be consistent for other proteins, to the best of our knowledge this is the first direct comparison using a set of mutants.

Keywords: protein folding, high pressure, pressure-jumps, ribonuclease A, pressure-folding transition state.

INTRODUCTION

To understand the folding of a protein, it is important to characterize all the states involved in this process, i.e. the native or folded state, the unfolded state, the intermediate states (if present) and the transition states, structurally and thermodynamically, as well as the kinetic relationship between them. X-ray crystallography and NMR spectroscopy have been used extensively in determining the three-dimensional structure of native proteins. Heteronuclear multidimensional NMR techniques, among other biophysical techniques, have been used to characterize the unfolded states of the proteins (Logan et al. 1993; Wang and Shortle 1995; Freund et al. 1996; Smith et al. 1996; Wong et al. 1996; Zhang and Forman-Kay 1997). From these studies it has become clear that unfolded proteins usually contain regions of residual structure (Shortle 1993). In the case of proteins with folding intermediates different techniques have been used to characterize them (Baldwin 1993). Intermediates were thought to be essential to the folding process in order to help restrict the conformational space and direct the protein to its folded conformation. However, well-populated intermediates do not always seem to be required for the fast efficient folding of a protein (Jackson and Fersht 1991). In addition, many small proteins have now been shown to fold with simple two-state kinetics (Jackson 1998). The transition states, due to their fleeting nature, are the least well-populated productive “intermediates” on the folding pathway, which precludes their direct experimental investigation. Instead, experimental studies have been limited to indirect approaches in which the properties of the transition state were inferred at first from the kinetic consequences of changes in environmental conditions (Tanford 1968) and later from studies of the kinetic consequences of mutations, i.e. by applying the protein engineering method or Φ -value analysis initially developed by Fersht and co-workers. Since this pioneering work (Matouschek et al. 1989; Fersht et al. 1992) to the present day, the Φ -value analysis has been applied with varying levels of completeness to more than two-dozen proteins (Raleigh and Plaxco 2005) and has become one of the experimental methods with most potential for characterizing folding transition states (Fersht 2004).

In most of these studies the kinetics of folding-unfolding processes has been monitored by stopped-flow techniques using chemical denaturants to induce the transition. In comparison, there are few works describing the transition state of the folding/unfolding processes of a protein induced by a physical agent, such as pressure.

However, with the development of the pressure-jump techniques, an increased number of folding kinetic studies have been performed with different proteins. Some of them have used pressure alone (Vidugiris et al. 1995; Desai et al. 1999; Mohana-Borges et al. 1999; Panick et al. 1999; Panick and Winter 2000; Woenckhaus et al. 2001; Tan et al. 2005) or pressure in combination with other denaturing agents (Pappenberger et al. 2000) to study the folding kinetics of a wild-type protein. Very few works deal with using mutants to study the pressure-folding transition state of a protein (Jacob et al. 1999; Perl et al. 2001).

In the present work, we have performed an approach to this research subject that uses pancreatic ribonuclease A (RNase A) as a model protein. The folding kinetics of RNase A variants from the most critical positions for enzyme stability i.e. Val 47, Val 54, Val57, Ile81, Ile106, Ile107 and Val108 which have been described previously (Coll et al. 1999; Torrent et al. 1999; Torrent et al. 2001; Font et al. 2005), have been studied using pressure-jump techniques.

The pressure-jump technique has several advantages over other trigger mechanisms: it does not significantly change the solvent properties, pressure propagates rapidly so that sample homogeneity is not a problem and, pressure-jumps can be performed bidirectionally, i.e. in both the positive and negative pressure directions. In addition, using pressure as a denaturant agent allows the reaction volume to be calculated (equilibrium measurements) as well as the activation volumes for folding and unfolding reactions, which can give information on the solvation of the transition state. These parameters are not available using other denaturing agents.

The results obtained indicate a pressure-folding transition state for the main hydrophobic core of RNase A that is approximately half way between the native and unfolded states. The Φ -value analysis shows that it is a relatively uniformly expanded form of the folded structure presenting a weakened hydrophobic core.

RESULTS

Non-disruptive mutants (Fersht et al. 1992; Fersht and Sato 2004) constructed in positions that belong to the main hydrophobic core of RNase A, whose contribution to protein stability has been previously characterized by pressure and temperature-equilibrium unfolding studies (Coll et al. 1999; Torrent et al. 1999; Torrent et al. 2001;

Font et al. 2005), were selected to test their contribution to the transition state of the pressure-induced unfolding/refolding processes of RNase A. Xaa to Ala substitutions were chosen to apply the Φ -value analysis. This change is described as the most convenient since it is unlikely that Ala will form new non-native interactions when substituted into a protein (Zarrine-Afsar and Davidson 2004). According to the RNase A structure solved by x-ray crystallography (Wlodawer et al. 1988) and NMR (Rico et al. 1991) the elements of secondary structure where the mutations were introduced are the β -strands 1, 4 and 5 and the α -helix III (Figure 1). Table 1 shows the mutations produced in RNase A, their location, and accessibility as well as the contacts of the deleted groups. All the performed mutations form hydrophobic contacts. They affect local interactions and, at the same time, involve long-range interactions. Therefore, they report on both the integrity of a particular region of the protein and on the tertiary structure of the protein. Val54Ala and Val57Ala substitutions may report on α -helix III, Ile106Ala, Ile107Ala and Val108Ala substitutions may report on strand β 5 and Ile81Ala change may report on strand β 4. Val47 located near to the C-terminal edge of strand β 1 reports mainly on tertiary contacts.

Pressure-induced equilibrium unfolding studies

Table 2 summarizes the free energy of unfolding (ΔG) as well as the changes in reaction volume upon unfolding (ΔV) for the wild-type enzyme and the variants that have been kinetically characterized in this work and previously published in (Coll et al. 1999; Torrent et al. 1999; Torrent et al. 2001; Font et al. 2005). As expected for core hydrophobic residues, the mutant's stability decreases significantly with respect to the wild-type enzyme, and the positions that are most affected are 47, 106 and 108.

The observed changes in reaction volumes (ΔV) for all the variants, with the exception of the Ile107Ala variant, are more negative than the value found for wild-type protein. The volume of the native RNase A at 40°C is increased 46.51 ± 3.3 cm³/mol compared with the denatured form. This value and the values found for the variants are similar to the reaction volumes for folding of many other small single domain proteins (Heremans 1982; Royer 2002)

Analysis of two-state behaviour

One of the advantages of the pressure-jump techniques is that it is possible to follow the process being studied in the two directions: pressurization and depressurization. Therefore, this allows comparing the changes in the observed rate constants (k_{obs}) vs. pressure for the positive (unfolding process) and negative (refolding process) jumps. In a simple two-state process, the observed rate constants should be the same for forward and backward pressure-jumps. If this is not the case, the process under consideration is path-dependent. Figure 2 shows the plot of $\ln k_{obs}$ vs. pressure for the wild-type protein. Our data show that the observed rate constants do not depend on the direction of the jump, which indicates that the process is consistent with a two-state model. The same was found for each variant analyzed (data not shown).

Kinetic analysis

For wild-type RNase A and the variants, linear plots of natural logarithms of k_f and k_u versus pressure allowed both constants to be calculated at 0.1 MPa. Table 3 summarizes the unfolding and refolding kinetic parameters obtained for RNase A and the variants for positive jumps. Similar results were obtained for negative jumps (data not shown). The values of the mutant unfolding rate constants relative to the parent molecule $k_u \text{ rel } (k_u^m / k_u^{wt})$ as well as the values of the mutant folding rate constants relative to parent enzyme $k_f \text{ rel } (k_f^m / k_f^{wt})$ are detailed in Table 3. All the variants appear to fold slower than wild-type enzyme by about one order of magnitude while much more diversity is observed in the unfolding rates. The variant Val54Ala has an unfolding rate constant that is only one order of magnitude greater than that of wild-type enzyme. Variants Val57Ala, Ile81Ala and Ile107Ala have an unfolding rate constant about 1.5 orders of magnitude greater than that of RNase A, and finally, Val47Ala, Ile106Ala and Val108Ala, present an unfolding rate constant between two to three orders of magnitude greater than the one of wild-type enzyme. Overall the unfolding process is more significantly affected than the folding process for Val47A, Ile106A and V108A whereas for the other variants the destabilization can be considered to be a consequence of affecting both processes by a much more similar magnitude.

The activation volumes for folding (ΔV_f^\ddagger) and unfolding (ΔV_u^\ddagger) reflect the slopes of the plots of $\ln k_f$ or $\ln k_u$ vs. pressure. Figure 3 presents the plots of $\ln k_f$ and $\ln k_u$ vs. pressure for positive jumps. The slopes differ for the different mutants.

In chemical denaturant-induced folding studies, the denaturant dependence of the kinetic rate constants can provide information about the solvent accessibility of the transition state. This can be expressed in terms of the Tanford β -value (β_T) (Tanford 1970; Fersht 1999) which is a useful index of the compactness of the transition state and provides an approximate measure of the position of the transition state on the reaction coordinate. An analogous parameter, which it is called β_p (for pressure), can be derived from the volume changes associated with pressure-induced unfolding:

$$\beta_p = (\delta\Delta G^\ddagger / \delta\text{pressure}) / (\delta\Delta G / \delta\text{pressure}) = \Delta V^\ddagger / \Delta V$$

where ΔV^\ddagger is the activation volume and ΔV is the volume change measured upon unfolding at equilibrium (Perrett and Zhou 2002). Comparing activation and equilibrium volume changes has likewise been used to measure the extent to which the transition state resembles the native state or to estimate the position of the transition state along the reaction coordinate (Vidugiris et al. 1995; Desai et al. 1999; Pappenberger et al. 2000; Woenckhaus et al. 2001). When β_T and β_p were compared for the same protein, the values were found to be similar (Desai et al. 1999; Pappenberger et al. 2000).

The equivalence between β_T and β_p is particularly true if volume changes during the folding of a protein arise mainly from changes in solvent interactions of the polypeptide chain and packing deficiencies in the hydrophobic core (Pappenberger et al. 2000). This is the case for RNase A and the variants studied here (see discussion). The β_p values are listed in Table 3 for positive jumps. The more destabilized variants present β_p values closer to the value found for the wild-type enzyme (0.62, 0.56, 0.47 and 0.42 for wild-type, V108A, I106A and V47A respectively) than the other more stable variants, which present lower values ranging from 0.26 to 0.34.

Protein engineering analysis

The Φ_f values for the single destabilizing mutations of the hydrophobic core of RNase A are presented in Table 3 for positive jumps. A good agreement is found between the Φ_f values obtained from positive and negative jumps. No mutation of the hydrophobic core of RNase A results in a Φ_f -value of 1 or 0, rather all the Φ_f -values are fractional, ranging from 0.35 to 0.55. Therefore, none of the RNase A core residues analysed in the present work present their interactions completely formed or lost in the transition state. By comparing the location and contacts of the different variants (Table 1) it is shown that each altered side-chain establishes contacts both with residues belonging to the secondary structure element at which it belongs and with residues from other elements of secondary structure as well. Thus, it is not possible to discern between the contribution of side chains in the formation of a particular element of secondary structure and their implication in long-range interactions. Therefore, the results have to be interpreted globally, considering the participation of the side chains in both types of interactions in the hydrophobic core of RNase A.

The most critical positions for RNase A stability, 108, 106 and 47, are those for which the change for Ala gives the lowest Φ_f -values, 0.35, 0.36 and 0.37, respectively. The rest of the variants present Φ_f -values between 0.46 and 0.55. These results indicate that the interactions of the side chains of Val108, Ile106 and Val47 are less formed in the transition state than the interactions of the rest of the variants. On average, the Φ_f -value for all the core side chains studied here is 0.43. This value is consistent with a transition state in which all the interactions established by the side chains of these core residues in the native state are 43% formed.

Brønsted behaviour: single vs. parallel pathways

Intermediate Φ values are difficult to interpret since they could correspond to partial formation of interactions or to a mixture of fully folded and unfolded states arising from parallel pathways. Fersht et al. (Fersht et al. 1994) used simple physico-chemical reasoning, to show that it is possible to distinguish between these two possibilities by performing a Brønsted plot analysis. If there are simple relationships between the rate constants and the changes in interaction energies, and assuming that all mutations are testing the same degree of structure formation, the natural logarithm of

the unfolding/folding rate constants should exhibit Brønsted behaviour, in which plots of $\ln k_u$ and $\ln k_f$ versus $\Delta\Delta G / RT$ for a set of mutants are approximately linear.

The variation in $\ln k_f$ and $\ln k_u$ versus the difference in energy between the wild-type and the different mutants is plotted in Figure 4. There is a very good linear correlation between these two variables for the unfolding reaction ($r = 0.99$) and for the folding reaction ($r = 0.94$), which indicates that there are no discrete populations with different degrees of structure in the transition state.

DISCUSSION

Although intermediates for the folding and unfolding process of RNase A have been detected and described (Neira and Rico 1997; Nogués 1997; Kimura et al. 2005) in the present study no stable intermediates have been detected and thus the only structure to be analysed was the transition state. The structure of the transition state of the main hydrophobic core of RNase A has been mapped by comparing the kinetics and equilibrium of folding of seven mutants belonging to this core. According to the protein engineering method the Φ_f -values obtained from pressurization experiments and Φ_u -values obtained from depressurization experiments accomplishes the relationship $\Phi_f = 1 - \Phi_u$. The same complementary is observed for the activation volumes for folding and unfolding, obtained from the positive and negative-jumps kinetics. Both analysis shows that the structure of the transition state obtained is kinetically indistinguishable when measured in the direction of unfolding and refolding. Therefore, the results of the Φ -value analysis and those of the β_p -value analysis satisfactorily prove the energetic changes as well as the degree of compactness of the transition state and, by inference, the structural properties of this transition state induced by a pressure increase or release. Recently, there has been some discussion in the literature about which is the lowest $\Delta\Delta G$ value acceptable for calculating valid Φ -values (Sanchez and Kiefhaber 2003; Fersht and Sato 2004). Sánchez and Kiefhaber propose that Φ -values for $\Delta\Delta G < 1.7$ kcal/mol are artefactual, while Fersht and Sato suggest that for deletion mutations in suitable proteins the threshold could be as low as 0.6 kcal/mol. All the variants studied in this work present a $\Delta\Delta G$ value greater than 1.7 kcal/mol, that reinforces the confidence in the calculated Φ -values.

Our data for wild-type RNase A and mutants fit well to a single-exponential relaxation process both for unfolding and refolding. A kinetic study of RNase A using pressure-jump techniques monitored by FTIR (Panick and Winter 2000) showed that the relaxation profiles for the pressurization and depressurization fit well with a model that assumes two-exponential relaxation processes. The discrepancy might be due to the different experimental conditions used. In our work the pressure-jumps are done at 40°C while in the work of Panick and Winter the pressure-jumps are done at 20°C. Moreover, a different pH for the protein solution is used, 2.5 in the FTIR work while we have used a pH of 5.5.

Characteristics of the transition state of RNase A inferred from β_p values.

It has been described that contributions to the reaction volume, ΔV , obtained from equilibrium experiments, may arise from packing deficiencies in the native state (Frye et al. 1996; Frye and Royer 1998; Hummer et al. 1998) and differences in solvent interactions between native and unfolded protein (Heremans 1982; Dill 1990; Hummer et al. 1998). The structure of the native RNase A shows no indication for cavities (Wlodawer et al. 1988) however the observed volume change corresponds to only about 0.33% of the total protein volume. Thus, even minor packing deficiencies in the native protein might contribute to the reaction volume. Other contributions to ΔV are known to arise from changes in interactions between the solvent and the protein chain. This effect is especially pronounced around charged groups (electrostriction). From our data we cannot discard this contribution to ΔV however RNase A is a basic protein with a pronounced number of basic groups compared to acidic ones. Since no basic groups are buried in the native state, contributions from electrostriction around positive charges are not expected (Wlodawer et al. 1988) and although a small contribution from acidic groups, at the experimental pH, can account for the changes in ΔV , this contribution is assumed to be minor. Therefore, in our case, and in accordance with what has been described for other proteins the decrease in the volume of the pressure-unfolded state is mainly a consequence of packing deficiencies in the hydrophobic core of the protein as well as changes in solvent interaction of the polypeptide chain (Royer et al. 1993; Frye et al. 1996; Frye and Royer 1998; Pappenberger et al. 2000). For the variants, the greater values of the reaction volumes compared to the wild-type may be directly

related to packing deficiencies as a consequence of methyl/ene deletions as well as to differences in solvent interactions of the polypeptide chain between the native and denatured state. Since there are no changes in charged groups between the wild-type and the variants electrostriction contribution from these types of residues to reaction volumes of the variants should be the same as in the wild-type enzyme.

Since volume changes that occur during RNase A and variants folding arise mainly from changes in solvent interactions of the polypeptide chain and packing deficiencies in the hydrophobic core, measuring the activation volumes for the refolding reaction relative to the reaction volume gives structural information on the transition state (Pappenberger et al. 2000; Perrett and Zhou 2002).

For wild-type RNase A the activation volumes for the refolding and unfolding reaction of 28.90 and -18.21 cm³/mol show that the volume of the transition state is about 60% native-like, suggesting that it is still partially solvated. For the variants, the results obtained for the β_p values indicate that those that are more destabilized present a transition state, at least from the point of view of solvation, which is closer to the native state of each variant. That is, for V108A, I106A and V47A the transition states are about 56%, 47% and 42% native-like respectively, while for the other variants the transition state is around 26% to 34% native-like. In other words, the Ala changes introduced at positions 108, 106 and 47 bring the transition state closer to the native state than the changes introduced at the rest of the positions studied in this work. This means that the transition state is found to move progressively closer to the folded state on destabilization of the protein by mutation according to the Hammond postulate (Hammond 1955), which states that the structure of the transition state of a chemical reaction becomes more product-like when the product is destabilized. For protein folding reactions a pressure-induced structural movement of the transition state might be explained mainly by the weakening of hydrophobic interactions, accompanied by an increase in solvation of the polypeptide chain increasing pressure (Heremans 1982; Mozhaev et al. 1994; Hummer et al. 1998). As a result, a larger number of interactions are required, and consequently a dehydration of the polypeptide chain to compensate for the loss in conformational entropy during the folding process. This effect leads to a more native-like transition state. The Hammond postulate has also been proposed to explain the movements of the transition state for folding of other proteins like barnase,

chymotrypsin inhibitor 2 (CI2) and tendamistat, studied using other denaturing agents (Matouschek et al. 1995; Pappenberger et al. 2000).

Characteristics of the transition state of RNase A inferred from Φ -values.

All the mutations in this work are changes of larger hydrophobic side-chains to smaller ones and as a consequence, according to the protein engineering method, their fractional Φ_f values are indicative of the extent of structure formation mapped out at the level of individual residues. In fact, the nice linear fitting of the Brønsted plot corroborates this hypothesis (Matouschek et al. 1989; Matouschek et al. 1990; Fersht et al. 1992).

The residues of the major hydrophobic core of RNase A studied in this work can be split into two categories: those mutations that result in a Φ_f -value around 0.35 (Val108, Ile106 and Val47) and the rest of the mutants which present Φ_f -values around 0.5 (between 0.46 and 0.55). A priori, the opposite would be expected and higher Φ_f -values would also be expected for all the positions analysed, since refolding quench flow experiments combined with 2D NMR allowed to identify the protons which are protected early during the refolding reaction of RNase A among which were Val47, Val54, Ile81, Ile106 and Val 108 (Udgaonkar and Baldwin 1990). In addition, most of the amide protons protected early in the folding reaction are among the ones which exchange by global unfolding events or those for which this process is a major pathway for exchange when the H/D exchange behaviour of amide protons has been studied by 2D NMR (Neira et al. 1999). Nevertheless, our results suggest that part of the interactions of the residues 47, 106 and 108 are formed later than the interactions of the rest of the positions analysed which in turn do not present Φ_f -values greater than 0.55. Probably, the interactions of the residues analysed and in particular those of the three residues which have the lowest Φ_f -values, are more important for stabilizing the folded structure of the RNase A than for directing its folding. This is in accordance with the hypothesis that hydrophobic clusters are more important for stability (Kim et al. 1998). The discrepancy between the results of the protein engineering method applied in this work and those found in the 2D NMR studies might be due to the fact that NMR monitors the behaviour of the main chain while the protein engineering method monitors the side-chain interactions. It is possible that in the transition state the main

hydrophobic core of RNase A presents a structured backbone while the side-chains are not in their native conformation.

For other proteins, that are not all α or all β , like CI2 (Itzhaki et al. 1995), the activation domain of human procarboxypeptidase A2 (ADA2h) (Villegas et al. 1998), immunophilin FKBP12 (Fulton et al. 1999) and the CheY chemotactic protein (Lopez-Hernandez and Serrano 1996), low Φ_F -values have been obtained for the amino acids that belong to the hydrophobic core. It has been proposed that the transition state for these proteins looks like a collapsed globule with some secondary structure and a weakened hydrophobic core.

Consistency of the results obtained from Φ_F -values and β_p values.

The conclusions about the transition state drawn from the protein engineering method are consistent with the ones obtained from β_p values, which can be specifically obtained from pressure studies. A good correlation (Figure 5) exists between the Φ_F - values and the differences between the β_p value of wild-type enzyme and the β_p values of the different variants, $\Delta\beta_p$, in Table 3. The side chains for which a minor number of the interactions are present in the transition state relative to the interactions that are present in the native state, also give rise to minor differences between the degree of solvation/compactness of the transition state relative to the native state compared to this parameter (β_p) for the wild-type enzyme.

Although it has been stated that the nature of the transition state inferred from pressure-induced studies is consistent with the results of the protein engineering method (Perrett and Zhou 2002), to the best of our knowledge, this is the first direct comparison using a set of mutants.

CONCLUSION: The transition state of RNase A for the pressure-folding process

The structure of the transition state of the hydrophobic core of RNase A from the point of view of formed interactions is a relatively uniformly expanded form of the folded structure with a mean Φ_F -value of 0.43, which places it half way between the folded and unfolded states. This means that, on average, 43% of the free energy of interaction is lost on reaching the transition state for unfolding from the folded state.

Both the wild-type enzyme and the variants present a negative unfolding activation volume which places the transition state between the native and unfolded states. On average the β_p -value for the variants is around 0.4, suggesting a transition state that is 40% native-like from the point of view of compactness. Taking into account that it has been described that the pressure-denatured state of RNase A contains some partial secondary structure (Torrent et al. 2001) and that the unfolded-state appears to display some characteristics of a molten globule with native-like secondary structure and a liquid interior (Zhang et al. 1995) it seems reasonable to propose a transition state that has a significant degree of secondary structure formed and a weakened hydrophobic core. This, in turn may suggest a pressure-folding pathway according to a nucleation-condensation mechanism for the main hydrophobic core of non-reduced RNase A.

MATERIALS AND METHODS

Mutagenesis, Protein Expression and Purification.

RNase A variants were constructed by site-directed mutagenesis using the Quick-Change kit (Stratagene) essentially as recommended by the manufacturer. Protein expression and purification was performed according to the procedures previously described (Torrent et al. 1999; Font et al. 2005).

Pressure-induced equilibrium unfolding

The stabilities of each of the variants in this study were previously characterized by pressure-unfolding at 40°C and monitoring the change in absorbance at 287 nm according to (Font et al. 2005).

Kinetic experiments: pressure-jumps

The lyophilized proteins were dissolved to a concentration of 0.5 mg/mL in the same buffer used for the equilibrium experiments (50 mM MES, pH 5.0).

The protein intrinsic fluorescence was measured by exciting the sample at 280 nm (4 nm slit) and recording the emission at 305 nm (16 nm slit) to minimize photobleaching. The dead time of the equipment was shorter than 5 ms.

Fluorescence measurements were carried out using an Aminco Bowman Series 2 fluorescence-spectrophotometer (SLM Aminco, FosterCity, CA). The sample compartment was modified to accommodate a thermostated high pressure optical cell, allowing measurements up to 700 MPa. The protein solution was placed in a 5 mm diameter quartz cuvette, closed at the top with a flexible membrane and held with a rubber O-ring. Pressure-jumps consisted of sudden changes of pressure (up to 40 MPa) within a pressure range of 0.1-600 MPa, and were made by using a home made pressure-jump device connected to the high pressure optical cell placed in the above mentioned fluorescence-spectrophotometer. Pressure-jumps were carried out by opening an electrically driven pneumatic valve localized between the high pressure optical cell and a ballast tank.

The pressure-jumps were small enough so that the adiabatic heating or cooling of the sample amounted to no more than 0.35°C, which at the sample temperature of 40°C would not perturb the folding equilibrium of the proteins significantly. Therefore, the adiabatic heating did not contribute significantly to the exponential decay induced by the pressure-jump.

Data analysis

Determining kinetic parameters from relaxation profiles

The relaxation profiles of the unfolding/refolding, after each pressure-jump, were fitted to a single exponential decay, according to equation (1).

$$I(t) = I_0 + A (1 - e^{-k_{obs} t}) \quad (1)$$

where $I(t)$ and I_0 are the fluorescence intensities at time t and at time zero, A is the phase amplitude and k_{obs} is the measured rate constant at the final pressure p .

In agreement with a two-state folding/unfolding reaction, the measured apparent rate constant at a given pressure k_{obs} is equal to the sum of the microscopic rate constant for folding $k_f(p)$ and unfolding $k_u(p)$

$$k_{obs}(p) = k_u(p) + k_f(p) \quad (2)$$

Equation (2) was used to calculate the microscopic rate constants introducing a constrained analysis which takes into account the relationship between the rate constants and the equilibrium constant for each jump (Herberhold et al. 2003) The equilibrium constant at pressure p was calculated using Equation (3)

$$\ln K(p) = -(\Delta G + p\Delta V) / RT \quad (3)$$

where ΔG and ΔV are the free energy and volume change of unfolding obtained from equilibrium experiments and p is the final pressure of each jump.

Linear plots of $\ln k_f(p) / \ln k_u(p)$ versus the final pressure of each jump allowed us to calculate ΔV_f^\ddagger and ΔV_u^\ddagger , the activation volumes for folding and unfolding respectively, according to equations:

$$\ln k_u = -p (\Delta V_u^\ddagger / RT) + \ln k_u (0.1\text{MPa}) \quad (4)$$

$$\ln k_f = -p (\Delta V_f^\ddagger / RT) + \ln k_f (0.1\text{MPa}) \quad (5)$$

Protein engineering method: calculation of the Φ -values

The free energy changes of the transition state upon mutation ($\Delta\Delta G_f$ and $\Delta\Delta G_u$) were calculated using the following equations:

$$\Delta\Delta G_f = -RT \ln(k_f^m / k_f^{wt}) \quad (6)$$

$$\Delta\Delta G_u = -RT \ln(k_u^m / k_u^{wt}) \quad (7)$$

where k_f^m and k_f^{wt} are the rate constant for folding for the mutant and wild-type, respectively. The same applies for the unfolding ones. The Φ_f -values which report on the degree of formation of the interactions broken upon mutation in the transition state were calculated using the equation:

$$\Phi_f = \Delta\Delta G_f / \Delta\Delta G \quad (8)$$

The protein engineering method has been extensively reviewed, mainly by Fersht and co-workers (Matouschek et al. 1989; Fersht et al. 1992; Serrano et al. 1992; Fersht 1995; 1997; 2004).

ACKNOWLEDGEMENTS

Work supported by grants BMC2003-08458-CO2-02 from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain) and SGR01-00196 from DGR, Generalitat de Catalunya. JF acknowledges a fellowship from the University of Girona. Support was also received

from the “Fundació M. F. de Roviralta” of Barcelona for equipment purchasing grants. This work was also undertaken in the frame of the European COST-D30 action. The authors thank Claude Balny for helpful discussions and advice on the pressure-jump experiments and Christian Valentin for excellent technical help.

REFERENCES

- Baldwin. 1993. Pulsed H/D-exchange studies of folding intermediates. *Curr. Opin. Struct. Biol* **3**: 84-91.
- Coll, M.G., Protasevich, II, Torrent, J., Ribo, M., Lobachov, V.M., Makarov, A.A., and Vilanova, M. 1999. Valine 108, a chain-folding initiation site-belonging residue, crucial for the ribonuclease A stability. *Biochem Biophys Res Commun* **265**: 356-360.
- Desai, G., Panick, G., Zein, M., Winter, R., and Royer, C.A. 1999. Pressure-jump studies of the folding/unfolding of trp repressor. *J Mol Biol* **288**: 461-475.
- Dill, K.A. 1990. Dominant forces in protein folding. *Biochemistry* **29**: 7133-7155.
- Fersht, A.R. 1995. Characterizing transition states in protein folding: an essential step in the puzzle. *Curr Opin Struct Biol* **5**: 79-84.
- Fersht, A.R. 1997. Nucleation mechanisms in protein folding. *Curr Opin Struct Biol* **7**: 3-9.
- Fersht, A.R. 1999. Kinetics of protein folding. In *Structure and Mechanism in protein Science*. (ed. W.H. Freemann), pp. 540-572, New York.
- Fersht, A.R. 2004. Relationship of Leffler (Bronsted) alpha values and protein folding Phi values to position of transition-state structures on reaction coordinates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 14338-14342.
- Fersht, A.R., Itzhaki, L.S., elMasry, N.F., Matthews, J.M., and Otzen, D.E. 1994. Single versus parallel pathways of protein folding and fractional formation of structure in the transition state. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 10426-10429.
- Fersht, A.R., Matouschek, A., and Serrano, L. 1992. The folding of an enzyme. I. Theory of protein engineering analysis of stability and pathway of protein folding. *J Mol Biol* **224**: 771-782.
- Fersht, A.R., and Sato, S. 2004. Phi-value analysis and the nature of protein-folding transition states. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 7976-7981.
- Font, J., Torrent, J., Benito, A., Lange, R., Ribó, M., and Vilanova, M. 2005. Pressure- and temperature-induced unfolding studies: thermodynamics of core hydrophobicity and packing of ribonuclease A. *Submitted*.
- Freund, S.M., Wong, K.B., and Fersht, A.R. 1996. Initiation sites of protein folding by NMR analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 10600-10603.
- Frye, K.J., Perman, C.S., and Royer, C.A. 1996. Testing the correlation between delta A and delta V of protein unfolding using m value mutants of staphylococcal nuclease. *Biochemistry* **35**: 10234-10239.
- Frye, K.J., and Royer, C.A. 1998. Probing the contribution of internal cavities to the volume change of protein unfolding under pressure. *Protein Sci* **7**: 2217-2222.
- Fulton, K.F., Main, E.R., Daggett, V., and Jackson, S.E. 1999. Mapping the interactions present in the transition state for unfolding/folding of FKBP12. *J Mol Biol* **291**: 445-461.
- Hammond, G.S. 1955. A correlation of reaction rates. *J. Am. Chem. Soc.* **77**: 334-338.
- Herberhold, H., Marchal, S., Lange, R., Scheyhing, C.H., Vogel, R.F., and Winter, R. 2003. Characterization of the pressure-induced intermediate and unfolded state of red-shifted green fluorescent protein--a static and kinetic FTIR, UV/VIS and fluorescence spectroscopy study. *J Mol Biol* **330**: 1153-1164.
- Heremans, K. 1982. High pressure effects on proteins and other biomolecules. *Annu Rev Biophys Bioeng* **11**: 1-21.
- Hummer, G., Garde, S., Garcia, A.E., Paulaitis, M.E., and Pratt, L.R. 1998. The pressure dependence of hydrophobic interactions is consistent with the observed pressure denaturation of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 1552-1555.
- Itzhaki, L.S., Otzen, D.E., and Fersht, A.R. 1995. The structure of the transition state for folding of chymotrypsin inhibitor 2 analysed by protein engineering methods: evidence for a nucleation-condensation mechanism for protein folding. *J Mol Biol* **254**: 260-288.

- Jackson, S.E. 1998. How do small single-domain proteins fold? *Fold Des* **3**: R81-91.
- Jackson, S.E., and Fersht, A.R. 1991. Folding of chymotrypsin inhibitor 2. 1. Evidence for a two-state transition. *Biochemistry* **30**: 10428-10435.
- Jacob, M., Holtermann, G., Perl, D., Reinstein, J., Schindler, T., Geeves, M.A., and Schmid, F.X. 1999. Microsecond folding of the cold shock protein measured by a pressure-jump technique. *Biochemistry* **38**: 2882-2891.
- Kim, D.E., Gu, H., and Baker, D. 1998. The sequences of small proteins are not extensively optimized for rapid folding by natural selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 4982-4986.
- Kimura, T., Akiyama, S., Uzawa, T., Ishimori, K., Morishima, I., Fujisawa, T., and Takahashi, S. 2005. Specifically collapsed intermediate in the early stage of the folding of ribonuclease a. *J Mol Biol* **350**: 349-362.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., and Thornton, J.M. 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **26**: 283-291.
- Logan, T.M., Olejniczak, E.T., Xu, R.X., and Fesik, S.W. 1993. A general method for assigning NMR spectra of denatured proteins using 3D HC(CO)NH-TOCSY triple resonance experiments. *J Biomol NMR* **3**: 225-231.
- Lopez-Hernandez, E., and Serrano, L. 1996. Structure of the transition state for folding of the 129 aa protein CheY resembles that of a smaller protein, CI-2. *Fold Des* **1**: 43-55.
- Matouschek, A., Kellis, J.T., Jr., Serrano, L., Bycroft, M., and Fersht, A.R. 1990. Transient folding intermediates characterized by protein engineering. *Nature* **346**: 440-445.
- Matouschek, A., Kellis, J.T., Jr., Serrano, L., and Fersht, A.R. 1989. Mapping the transition state and pathway of protein folding by protein engineering. *Nature* **340**: 122-126.
- Matouschek, A., Otzen, D.E., Itzhaki, L.S., Jackson, S.E., and Fersht, A.R. 1995. Movement of the position of the transition state in protein folding. *Biochemistry* **34**: 13656-13662.
- Mohana-Borges, R., Silva, J.L., Ruiz-Sanz, J., and de Prat-Gay, G. 1999. Folding of a pressure-denatured model protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 7888-7893.
- Mozhaev, V.V., Bec, N., and Balny, C. 1994. Pressure effects on enzyme reactions in mainly organic media: alpha-chymotrypsin in reversed micelles of Aerosol OT in octane. *Biochem Mol Biol Int* **34**: 191-199.
- Neira, J.L., and Rico, M. 1997. Folding studies on ribonuclease A, a model protein. *Fold Des* **2**: R1-11.
- Neira, J.L., Sevilla, P., Menendez, M., Bruix, M., and Rico, M. 1999. Hydrogen exchange in ribonuclease A and ribonuclease S: evidence for residual structure in the unfolded state under native conditions. *J Mol Biol* **285**: 627-643.
- Nogués. 1997. Pancreatic Ribonucleases. In *Ribonucleases: Structures and Function*. (eds. G. D'Alessio, and J.F. Riordan), pp. 271-304. Academic Press, New York.
- Panick, G., Vidugiris, G.J., Malessa, R., Rapp, G., Winter, R., and Royer, C.A. 1999. Exploring the temperature-pressure phase diagram of staphylococcal nuclease. *Biochemistry* **38**: 4157-4164.
- Panick, G., and Winter, R. 2000. Pressure-induced unfolding/refolding of ribonuclease A: static and kinetic Fourier transform infrared spectroscopy study. *Biochemistry* **39**: 1862-1869.
- Pappenberger, G., Saudan, C., Becker, M., Merbach, A.E., and Kiefhaber, T. 2000. Denaturant-induced movement of the transition state of protein folding revealed by high-pressure stopped-flow measurements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 17-22.
- Perl, D., Holtermann, G., and Schmid, F.X. 2001. Role of the chain termini for the folding transition state of the cold shock protein. *Biochemistry* **40**: 15501-15511.
- Perrett, S., and Zhou, J.M. 2002. Expanding the pressure technique: insights into protein folding from combined use of pressure and chemical denaturants. *Biochim Biophys Acta* **1595**: 210-223.
- Potterton, E., Briggs, P., Turkenburg, M., and Dodson, E. 2003. A graphical user interface to the CCP4 program suite. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**: 1131-1137.

- Raleigh, D.P., and Plaxco, K.W. 2005. The protein folding transition state: what are Phi-values really telling us? *Protein Pept Lett* **12**: 117-122.
- Rico, M., Santoro, J., Gonzalez, C., Bruix, M., Neira, J.L., Nieto, J.L., and Herranz, J. 1991. 3D structure of bovine pancreatic ribonuclease A in aqueous solution: an approach to tertiary structure determination from a small basis of ¹H NMR NOE correlations. *J Biomol NMR* **1**: 283-298.
- Royer, C.A. 2002. Revisiting volume changes in pressure-induced protein unfolding. *Biochim Biophys Acta* **1595**: 201-209.
- Royer, C.A., Hinck, A.P., Loh, S.N., Prehoda, K.E., Peng, X., Jonas, J., and Markley, J.L. 1993. Effects of amino acid substitutions on the pressure denaturation of staphylococcal nuclease as monitored by fluorescence and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **32**: 5222-5232.
- Sanchez, I.E., and Kiefhaber, T. 2003. Origin of unusual phi-values in protein folding: evidence against specific nucleation sites. *J Mol Biol* **334**: 1077-1085.
- Serrano, L., Kellis, J.T., Jr., Cann, P., Matouschek, A., and Fersht, A.R. 1992. The folding of an enzyme. II. Substructure of barnase and the contribution of different interactions to protein stability. *J Mol Biol* **224**: 783-804.
- Shortle. 1993. Denatured states of proteins and their roles in folding and stability. *Curr. Opin. Struc. Biol* **3**: 66-74.
- Smith, L.J., Fiebig, K.M., Schwalbe, H., and Dobson, C.M. 1996. The concept of a random coil. Residual structure in peptides and denatured proteins. *Fold Des* **1**: R95-106.
- Tan, C.Y., Xu, C.H., Wong, J., Shen, J.R., Sakuma, S., Yamamoto, Y., Lange, R., Balny, C., and Ruan, K.C. 2005. Pressure equilibrium and jump study on unfolding of 23-kDa protein from spinach photosystem II. *Biophys J* **88**: 1264-1275.
- Tanford, C. 1968. Protein denaturation. *Adv Protein Chem* **23**: 121-282.
- Tanford, C. 1970. Protein denaturation. C. Theoretical models for the mechanism of denaturation. *Adv Protein Chem* **24**: 1-95.
- Torrent, J., Connelly, J.P., Coll, M.G., Ribo, M., Lange, R., and Vilanova, M. 1999. Pressure versus heat-induced unfolding of ribonuclease A: the case of hydrophobic interactions within a chain-folding initiation site. *Biochemistry* **38**: 15952-15961.
- Torrent, J., Rubens, P., Ribo, M., Heremans, K., and Vilanova, M. 2001. Pressure versus temperature unfolding of ribonuclease A: an FTIR spectroscopic characterization of 10 variants at the carboxy-terminal site. *Protein Sci* **10**: 725-734.
- Udgaonkar, J.B., and Baldwin, R.L. 1990. Early folding intermediate of ribonuclease A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 8197-8201.
- Vidugiris, G.J., Markley, J.L., and Royer, C.A. 1995. Evidence for a molten globule-like transition state in protein folding from determination of activation volumes. *Biochemistry* **34**: 4909-4912.
- Villegas, V., Martinez, J.C., Aviles, F.X., and Serrano, L. 1998. Structure of the transition state in the folding process of human procarboxypeptidase A2 activation domain. *J Mol Biol* **283**: 1027-1036.
- Wang, Y., and Shortle, D. 1995. The equilibrium folding pathway of staphylococcal nuclease: identification of the most stable chain-chain interactions by NMR and CD spectroscopy. *Biochemistry* **34**: 15895-15905.
- Wlodawer, A., Svensson, L.A., Sjolín, L., and Gilliland, G.L. 1988. Structure of phosphate-free ribonuclease A refined at 1.26 Å. *Biochemistry* **27**: 2705-2717.
- Woenckhaus, J., Kohling, R., Thiyagarajan, P., Littrell, K.C., Seifert, S., Royer, C.A., and Winter, R. 2001. Pressure-jump small-angle x-ray scattering detected kinetics of staphylococcal nuclease folding. *Biophys J* **80**: 1518-1523.
- Wong, K.B., Freund, S.M., and Fersht, A.R. 1996. Cold denaturation of barstar: ¹H, ¹⁵N and ¹³C NMR assignment and characterisation of residual structure. *J Mol Biol* **259**: 805-818.
- Xia, T.H. 1992. Ph. D. Dissertation, ETH Zurich.

- Zarrine-Afsar, A., and Davidson, A.R. 2004. The analysis of protein folding kinetic data produced in protein engineering experiments. *Methods* **34**: 41-50.
- Zhang, J., Peng, X., Jonas, A., and Jonas, J. 1995. NMR study of the cold, heat, and pressure unfolding of ribonuclease A. *Biochemistry* **34**: 8631-8641.
- Zhang, O., and Forman-Kay, J.D. 1997. NMR studies of unfolded states of an SH3 domain in aqueous solution and denaturing conditions. *Biochemistry* **36**: 3959-3970.

Table 1. Location, accessibility and contacts of the modified chemical groups of the different RNase A variants.

Residues	Location	Backbone ^a	Side-chain ^a	Solvent accessible surface area ^b (%)
Val47Ala	β1	H12, M13, F46, H48, E49, M79, S80, I81	F8, H12, M13, H48, E49, V54, M79 I81, I106, F120,	0.6
Val54Ala	α3	E49, L51, A52, D53, Q55	F8, M13, V47, E49, L51, D53, Q55, V57, M79, I106, V108, P117	3.1
Val57Ala	α3	V54, Q55, A56, C58, Y73, Q74, S75, I106, V108 P117	V54, A56, C58, Q60, Y73, S75, M79, I106, V108, C110, P117	0.9
Ile81Ala	β4	F46, V47, M79, S80, T82, D83, A102, N103, K104, S123	T45, V47, H48, M79, S80, D83, A102, N103, K104, I106, F120, S123	2.0
Ile106Ala	β5	V54, S75, M79, I81, K104, H105, I107, S123	F8, V47, E49, V54, V57, S75, M79, I81, K104, V108, F120, S123,	1.1
Ile107Ala	β5	V63, C65, C72, Y73, Q74, I106, V108, D121, A122, S123, V124	V63, C72, Q74, H105, D121, A122, V124	7.6
Val108Ala	β5	I106, I107, A109, C110, P117, V118, H119, F120, A122	F8, V54, V57, I106, I107, A109, P117, H119, F120	1.1

^a Interactions in a sphere of 6Å have been determined using the program CONTACT from the CCP4 package (Potterton et al. 2003).

^b Calculated with the XAM program in the wild type structure (7rsa) (Xia 1992).

Table 2.- Thermodynamic parameters calculated from pressure-unfolding curves of RNase A and its variants at 40°C and 0.1 MPa (data taken from Font et al 2005) ^a.

Variant	ΔG (kJ/mol)	$\Delta\Delta G$ (kJ/mol)	$P_{1/2}$ (MPa)	ΔV (ml/mol)
rWT	24.61 (0.7)	-	529 (22)	-46.5 (3.3)
V47A	6.39 (0.7)	18.22	87.09 (2.41)	-73.37 (6)
V54A	13.55 (0.2)	11.06	189.94 (0.41)	-71.34 (0.9)
V57A	10.23 (0.2)	14.38	159.97 (0.63)	-63.95 (1)
I81A	9.96 (0.1)	14.65	164.38 (0.52)	-60.59 (0.8)
I106A	2.50 (0.5)	22.11	39.43 (5.52)	-63.4 (3.8)
I107A	9.89 (0.35)	14.72	208.65 (2.74)	-47.4 (2.3)
V108A	3.13 (0.3)	21.48	56 (2.66)	-55.9 (2.7)

^a Numbers in parenthesis are the standard errors of the data

Table 3.- Kinetic parameters for RNase A and its variants for positive jumps ^a

Variant	$k_f(0.1\text{MPa})(\text{s}^{-1})$	$k_u(0.1\text{MPa})(\text{s}^{-1})$	k_f^{rel} (k_f^m/k_f^{wt})	k_u^{rel} (k_u^m/k_u^{wt})	ΔV_f^\ddagger (ml/mol)	ΔV_u^\ddagger (ml/mol)	β_P $(\Delta V_f^\ddagger/\Delta V)$	$\Delta\beta_p$	Φ_f
WT	0.71 (0.31)	4.92e-5 (2.16e-5)	-	-	28.90 (2.99)	-18.21 (2.99)	0.62	-	-
V47A	0.05 (6.17 e-3)	4.30e-3 (5.17e-4)	0.073	88.15	30.83 (2.50)	-43.50 (2.50)	0.42	0.20	0.37
V54A	0.07 (0.02)	3.49e-4 (9.23e-5)	0.098	7.24	22.39 (4.29)	-49.89 (4.29)	0.31	0.31	0.55
V57A	0.06 (0.01)	1.05e-3 (2.12e-4)	0.079	21.48	21.87 (2.63)	-42.96 (2.63)	0.34	0.28	0.46
I81A	0.06 (6.19e-3)	1.17e-3 (1.29e-4)	0.080	23.89	19.79 (1.52)	-41.66 (1.52)	0.33	0.29	0.47
I106A	0.03 (5.42e-3)	0.01 (2.04e-3)	0.048	259.56	30.01 (1.81)	-34.23 (1.81)	0.47	0.15	0.36
I107A	0.05 (6.66e-3)	1.01e-3 (1.41e-4)	0.067	20.68	12.54 (2.41)	-35.48 (2.41)	0.26	0.36	0.48
V108A	0.04 (7.21e-3)	0.01 (2.15e-3)	0.054	230.21	31.08 (3.96)	-25.55 (3.96)	0.56	0.07	0.35

^aNumbers in parentheses are the standard errors of the data obtained from two independent experiments.

FIGURE LEGENDS

Figure 1.- Amino acid sequence of RNase A and secondary structure assignment. The secondary-structure elements are graphically represented and were calculated with the program PROCHECK (Laskowski et al. 1993), helix α I (residues 4-12), helix α II (residues 25-32), strand β I (residues 43-47), helix α III (residues 51-59), and strands β II (residues 61-63), β III (residues 72-74), β IV (residues 79-86), β V (residues 97-111) and β VI (residues 116-124). The mutated residues are underlined in the sequence.

Figure 2.- Observed rate constants of RNase A after pressure-jumps of 20-50 MPa amplitude in the pressurization (filled circles) and depressurization (open circles) direction at pH 5.0 and 40°C. The solid line (pressurization) and the dashed line (depressurization) are the fit of the data to the following equation:

$$\ln k_{\text{obs}} = \ln \left(k_{\text{f}(0.1\text{Mpa})} e^{\frac{-\Delta V_{\text{f}}^{\ddagger} p}{RT}} + k_{\text{u}(0.1\text{Mpa})} e^{\frac{-\Delta V_{\text{u}}^{\ddagger} p}{RT}} \right)$$

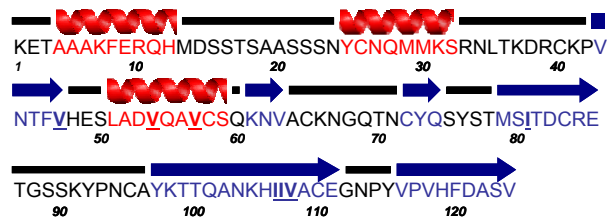
where k_{obs} is the observed rate constant, k_{f} (0.1 MPa) and k_{u} (0.1 MPa) are the microscopic rate folding and unfolding constants, $\Delta V_{\text{f}}^{\ddagger}$ and $\Delta V_{\text{u}}^{\ddagger}$ are the activation volumes for folding and unfolding and p is the final pressure of each jump.

Figure 3.- Pressure dependence of the microscopic folding (k_{f}) and unfolding (k_{u}) rate constants for the wild-type enzyme and variants. Microscopic rate constants were determined as indicated in Material and Methods according to Equations (4) and (5). (●) wild-type enzyme, (×) Val47Ala, (▲) Val54Ala, (△) Val57Ala, (◆) Ile81Ala, (□) Ile106Ala, (○) Ile107Ala and (◇) Val108Ala.

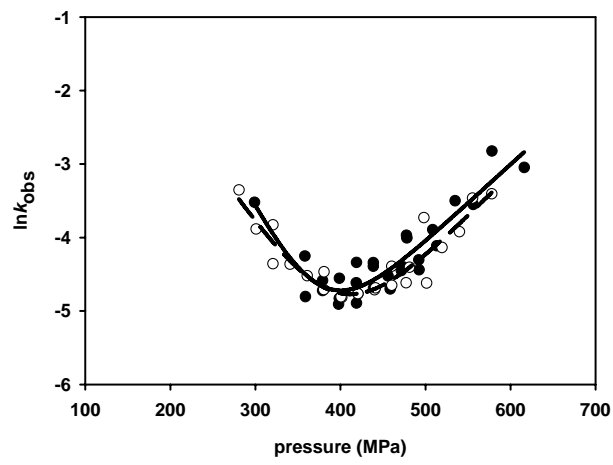
Figure 4.- Brønsted plots for the unfolding (open circles) and refolding rate constants (filled circles) of the variants listed in Table 1. The solid lines are linear regression fits.

Figure 5- Correlation between the Φ_{f} -values and the $\Delta\beta_{\text{p}}$ values ($\beta_{\text{p}} = \Delta V_{\text{f}}^{\ddagger} / \Delta V$) of each variant. The solid line shows the best fit to a linear equation ($r = 0.85$).

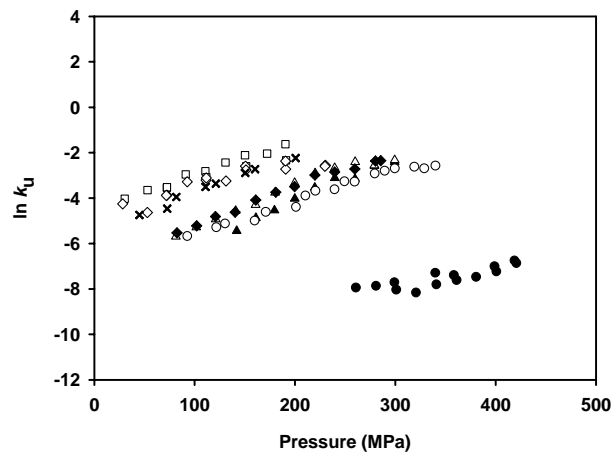
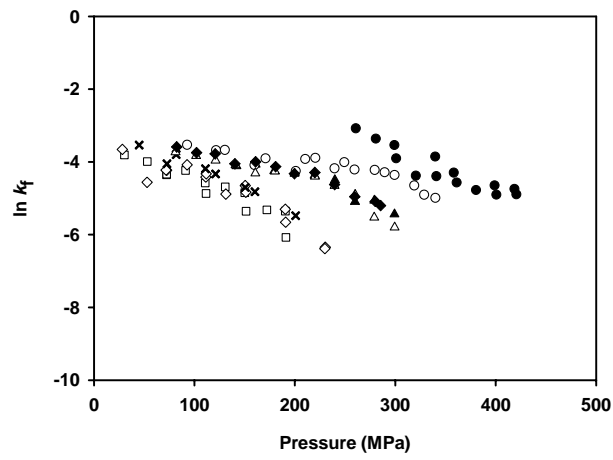
Font_figure1



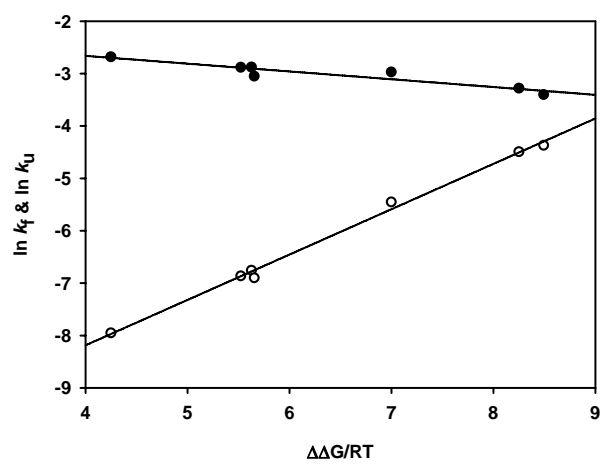
Font_figure2



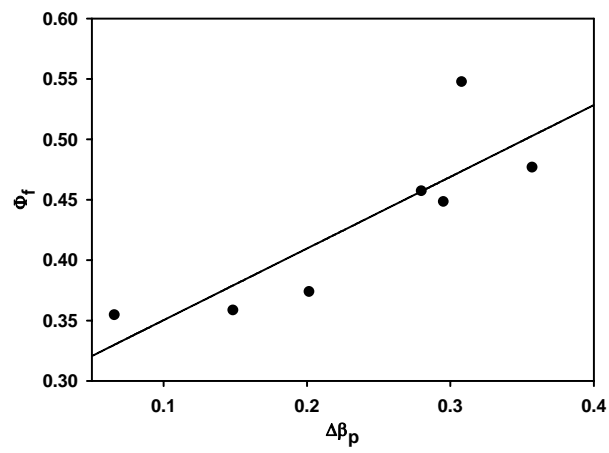
Font_figure3



Font_figure4



Font_figure5



«The important thing in science is not so much to obtain new facts
as to discover new ways of thinking about them»
Sir William Bragg

Capítol III

**Pressure-Jump Induced Kinetics
Reveals a Hydration Dependent
Folding/Unfolding Mechanism
of Ribonuclease A**

Pressure-jump induced kinetics reveals a hydration dependent folding/unfolding mechanism of ribonuclease A

J Font¹, J Torrent^{1,2}, M Ribó¹, D V Laurents³, C Balny², M Vilanova^{1*}, R Lange^{2*}

¹ Laboratori d'Enginyeria de Proteïnes, Departament de Biologia, Facultat de Ciències, Universitat de Girona, Campus de Montilivi s/n 17071 Girona (Spain).

² INSERM U710, Université Montpellier 2, Place Eugène Bataillon, Bat. 24, CC 105, 34095 Montpellier Cédex 5, France.

³ Instituto de Química-Física "Rocasolano" CSIC, Serrano 119
E-28006 Madrid, Spain

Running title: *p*-jump relaxation kinetics of RNase A.

Keywords: protein dynamics, protein folding, energy landscape, transition state, activation volume, reaction path

*To whom correspondence should be addressed:

1 Laboratori d'Enginyeria de Proteïnes, Departament de Biologia, Facultat de Ciències, Universitat de Girona, Campus de Montilivi s/n 17071 Girona (Spain). Fax: +34-972-418-150. E-mail: maria.vilanova@udg.es

2 INSERM U710, EA3763, Université Montpellier 2, Place Eugène Bataillon, Bat. 24, CC 105, 34095 Montpellier Cédex 5, France. Fax : E-mail : lange@montp.inserm.fr

ABSTRACT

Pressure-jump (*p*-jump) induced relaxation kinetics was used to explore the energy landscape of protein folding/unfolding of Y115W, a fluorescent variant of ribonuclease A. Pressure-jumps of 40 MPa amplitude (5 ms dead-time) were conducted both to higher (unfolding) and to lower (folding) pressure, in the range from 100 to 500 MPa, between 30 and 50 °C. Significant deviations from the expected symmetrical protein relaxation kinetics were observed. Whereas downward *p*-jumps resulted always in single exponential kinetics, the kinetics induced by upward *p*-jumps were biphasic in the low pressure range and monophasic at higher pressures. The relative amplitude of the slow phase decreased as a function of both pressure and temperature. At 50 °C, only the fast phase remained. These results can be interpreted within the framework of a two-dimensional energy surface containing a pressure and temperature dependent barrier between two unfolded states differing in the isomeric state of the Asn113-Pro114 bond. Analysis of the activation volume of the fast kinetic phase revealed a temperature dependent shift of the unfolding transition state to a larger volume. The observed compensation of this effect by glycerol offers an explanation for its protein stabilizing effect.

INTRODUCTION

The so-called conformational diseases, arising from the accumulation of misfolded proteins in or around cells, have challenged the main paradigms of structural biology. The most striking example is the prion phenomenon (1; 2), where the observation of self-perpetuating protein conformational changes calls for a renewal of our understanding of molecular biology. Due to the recognition of the relationship between protein misfolding and human diseases, in particular of age-related neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Parkinson's disease (3; 4), the field of protein folding has gained much interest in the past years. Substantial progress toward an understanding of these complex processes has been made through a combination of novel experimental developments and theoretical advances (5). To characterize a protein folding reaction, several phenomenological models have been proposed (6), such as lattice simulations and statistical mechanical models. By comparison of such theoretical predictions with experiment, the so-called "new view" of protein folding has emerged in the last decade, which is based on energy "landscapes" (7; 8). It postulates that a range of folding scenarios exists, containing many different paths that an unfolded polypeptide chain may explore before reaching its folded native state.

Generally, the kinetics of protein folding and unfolding are studied by a rapid change of denaturant concentration, or by temperature-jump. Recently, pressure-induced protein unfolding/folding kinetics has received attention as an elegant alternative tool. This method consists of monitoring protein relaxations induced by sudden changes of pressure (9-16). Previously, this approach has been used extensively to study protein folding and unfolding under equilibrium conditions (17-19). Pressure-jumps provide unique information concerning packing and hydration properties of the transition state, inaccessible by other experimental techniques. Indeed, pressure induces conformational changes that reduce the overall volume of the system. In protein unfolding processes, formation of the ensemble of unfolded species, including also the protein hydration shell, is usually accompanied by a decrease in volume. This is believed to be caused by the combined effects of electrostriction of water molecules around newly exposed charged and polar groups, the decrease in partial volume of hydrophobic residues upon transfer from a non-polar protein interior to water, and the elimination of packing defects (20). A jump in pressure, which can be performed in

both directions (pressurization or depressurization), propagates rapidly without the difficulties inherent to the mixing of solutions, and can be used without significantly changing the solvent properties.

The model protein chosen in this work was bovine pancreatic ribonuclease A (RNase A; EC 3.1.27.5). This enzyme presents a well known structure studied by x-ray crystallography (21) and NMR (22). In addition, the unfolding and refolding processes of the enzyme induced by chemical denaturant agents have been extensively studied by means of stopped-flow single- and double-jump and pulsed-labelled kinetic experiments by the groups of Baldwin (23; 24) and Scheraga (25; 26). Monitoring the unfolding of RNase A by a change of intrinsic fluorescence is possible although the protein does not possess any Trp residues in its sequence. However, to increase the signal, the previously constructed and characterized Y115W variant has been used (17). Its Trp residue is located on the solvent-exposed exterior of a β -turn, integrated in a hairpin subdomain, which is the most important chain folding initiation site (CFIS) of RNase A (27). Thus, Trp115 may report as an intrinsic fluorescence probe on the CFIS as well as on the isomeric state of the neighbouring Asn-Pro peptide bond. Characterization of the Y115W RNase A variant showed that the Y115W substitution does not significantly alter the activity and the stability of the enzyme at extreme conditions of temperature and pressure.

Here we use a *p*-jump technique to examine the dynamics of volume changes in the course of ribonuclease A folding and unfolding. We address the important question of whether folding and unfolding reaction paths are identical, a hypothesis which underlies many experimental and theoretical studies. Depending on experimental conditions, scenarios are found where the kinetics after upward and downward jumps is significantly different. The results can be interpreted by considering the dynamical aspect of two-dimensional energy surfaces. Furthermore, the *p*-jump approach proved to be useful to analyze the stabilizing effect of glycerol as a result of its interaction with the unfolding kinetic transition state. This approach appears to be promising to study the dynamics underlying protein structural changes.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Protein expression and purification

Y115W RNase A variant was previously constructed by site-directed mutagenesis as described by Torrent et al. (17). Protein expression and purification was performed accordingly.

NMR Spectroscopy

One- and two-dimensional NOESY (mixing time: 180 ms) and TOCSY ^1H NMR spectra of Y115W RNase A were recorded at 35°C on a Bruker 600 MHz AMX spectrometer equipped with a cryoprobe for increased sensitivity. The protein concentration was 0.90 mM, and the sample contained 50 μM sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulphonate (DSS) as internal chemical shift standard, 0.20 M sodium phosphate buffer and 100% D_2O . The pH* of the solution was 6.7, where pH* is the pH meter reading without taking into account the deuterium isotope effect. The Trp proton resonances were assigned by comparing the relative intensities of their NOE signals (28).

Fluorescence measurements under high pressure

Fluorescence measurements were carried out using an Aminco Bowman Series 2 fluorescence-spectrophotometer (SLM Aminco, Foster City, CA), modified to accommodate a thermostated high pressure optical cell, allowing measurements up to 700 MPa. The lyophilized protein was dissolved to a concentration of 0.25 mg/mL in 50 mM MES buffer at pH 5.0, and filtered using a 0.22 μm filter. This buffer was selected for its relatively small pressure pH dependency (29). The protein solution was placed in a 5 mm diameter quartz cuvette, closed at the top with a flexible polyethylene film which was attached by a rubber O-ring.

For equilibrium studies tryptophan fluorescence was excited at 290 nm, using a bandwidth of 8 nm. Emission (accumulation of three scans) was collected between 310 and 440 nm with a bandwidth of 4 nm. Total fluorescence intensity between these two wavelengths was integrated to follow the unfolding/folding processes as a function of increasing/decreasing pressure, respectively. For kinetic studies, tryptophan fluorescence intensity was recorded at 350 nm (16 nm slit) and excited at 290 nm using a 4 nm slit. No photo-bleaching was observed under these conditions.

Pressure-induced equilibrium unfolding transitions

Following each pressure increment/decrement (steps of 20 MPa), the protein fluorescence was allowed to equilibrate before spectral recording. The equilibrium fluorescence intensity profiles versus pressure were fitted to Eq. 1

$$I = \frac{I_f - I_u}{1 + e^{-[(\Delta G + p\Delta V)/RT]}} + I_u \quad (1)$$

where I_f and I_u are the fluorescence intensities of the folded and unfolded states, respectively, and I the observed fluorescence intensity at pressure p ; ΔG and ΔV are the free-energy and volume change of unfolding at 0.1 MPa (1 atm), respectively.

Pressure-jump-induced kinetics

Pressure-jumps consisted of sudden changes of pressure of ± 40 MPa within a pressure range of 100-500 MPa. They were performed by using a home-made p -jump device connected to the high pressure optical cell placed in the above mentioned fluorescence-spectrophotometer (30). Pressure jumps (dead time < 5 ms) were carried out by opening an electrically driven pneumatic valve localized between the high pressure optical cell and a ballast tank. The adiabatic temperature change associated to pressure jumps did not exceed 0.4°C . After 20 s, the amplitude of the temperature change decreased to 0.2°C , and after 50 s, the initial temperature was recovered (30).

Determination of kinetic parameters from relaxation profiles

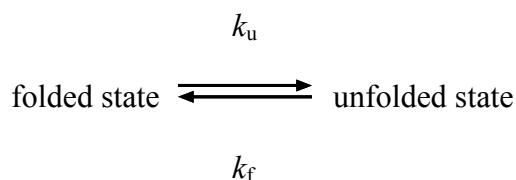
After each p -jump the relaxation profiles of the unfolding/folding reaction were fitted to single-exponential and when necessary to double (sequential) decays, according to Eq. 2 and Eq. 3,

$$I(t) = I_0 + A (1 - e^{-k_{\text{obs}} t}) \quad (2)$$

$$I(t) = I_0 + A (1 - e^{-k_{\text{obs}(1)} t}) + B (1 - e^{-k_{\text{obs}(2)} t}) \quad (3)$$

where $I(t)$ and I_0 are the fluorescence intensities at time t and at time zero, A and B are the phase amplitudes, and k_{obs} is the measured rate constant at the final pressure p .

The individual rate constants of the folding/unfolding reaction



were determined from single exponential kinetics and from the fast phase in cases of two-exponential decays, according to Eq. 4 and Eq. 5,

$$k_{\text{obs}} = k_u + k_f \quad (4)$$

$$K(p) = \exp(-(\Delta G + p\Delta V) / RT) = k_u / k_f \quad (5)$$

where $K(p)$ is the equilibrium constant at pressure p , ΔG and ΔV are the free energy and volume change of unfolding obtained from equilibrium experiments and p is the final pressure of each jump. Linear plots of $\ln k_f$ and $\ln k_u$ versus the final pressure of each jump allowed to determine ΔV_f^\ddagger and ΔV_u^\ddagger , the activation volumes for folding and unfolding respectively, according to Eq. 6 and Eq. 7.

$$\ln k_u = -p (\Delta V_u^\ddagger / RT) + \ln(k_u (0.1\text{MPa})) \quad (6)$$

$$\ln k_f = -p (\Delta V_f^\ddagger / RT) + \ln(k_f (0.1\text{MPa})) \quad (7)$$

The activation free energy ΔG^\ddagger for folding and unfolding was obtained from Eq. 8 and Eq. 9,

$$\Delta G_f^\ddagger = -RT \ln(k_u (0.1\text{MPa})) + RT \ln((k_B T) / h) \quad (8)$$

$$\Delta G_u^\ddagger = -RT \ln(k_f (0.1\text{MPa})) + RT \ln((k_B T) / h) \quad (9)$$

where k_B is the Boltzmann constant, R the gas constant and h the Planck constant.

RESULTS

Structural characterization by NMR spectroscopy

The 1D ^1H NMR spectrum of Y115W RNase A at 35°C is typical of folded RNase A (data not shown). The 2D TOCSY and NOESY spectra revealed one set of

peaks arising from W115; these peaks were assigned and their chemical shift values are (in ppm): H α 4.29, H β 3.15, H β' 3.01, H δ 1 6.83, H ϵ 3 8.20, H ζ 2 7.70, H ζ 3 7.27 and H η 2 7.32 (Figure 1a). The observation of only one set of resonances is taken as evidence that this residue adopts only one major conformation in the folded protein. The lack of NOE cross-peaks between Trp115 and other residues' protons is consistent with the indole side chain being placed at a solvent exposed position.

The Asn113–Pro114 peptide bond is *cis* in native, wild-type RNase A, but is *trans* in the three-dimensional dimer formed by swapping of the C-terminal beta strands (31). Under identical solution conditions, the RNase A dimer produces a strong pair of NOE signals arising from the N113 H α and Pro114 H δ protons which are indicative of a *trans* conformation, and which are not observed in the monomeric wild-type RNase A (32). These signals are not observed in the NOESY spectrum of the Y115W variant, which strongly suggests that the Asn113-Pro114 peptide bond is in the *cis* conformation in the folded state.

Pressure-induced equilibrium unfolding

In a previous study (17) we showed that the Y115W amino acid replacement in the RNase A structure does not substantially perturb its heat and pressure stability. Upon increasing pressure, a more than three-fold increase in fluorescence yield was obtained. This turned out to be a suitable intrinsic probe for fast kinetic measurements. The pressure-induced unfolding transition of Y115W RNase A was monitored between 30 and 50°C (Figure 2). The equilibrium unfolding process was found to be fully reversible, and the thermodynamic parameters (Table 1) were determined within the framework of a two-state model. Under all conditions the fluorescent yield increased, as pressure was raised, without any significant spectral shift, indicating that the native polar environment of the Trp residue is maintained upon protein unfolding. This is consistent with the exposed position of the Tyr115 residue in the wild-type enzyme, at the turn connecting β -strands 5 and 6 (21). From the thermodynamic data (shown partly in Table 1) it is apparent that both the stability of the Y115W variant (expressed by ΔG^0_u) and the absolute value of the reaction volume (ΔV) decrease linearly as a function of temperature. The expansibility ($\partial\Delta V/\partial T$) was determined as $\Delta\alpha = 1.4 \text{ ml}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, comparable to that of the wild type protein (33).

***P*-jump induced folding and unfolding kinetics**

As expected from equilibrium measurements, *p*-jumps of 40 MPa in magnitude in either direction (upward and downward), produced an increase or decrease in fluorescence intensity, respectively. The time scales of these relaxation kinetics were of the order of minutes. The monitored spectral changes were observed to be fully reversible, as in equilibrium experiments. The amplitude of the fluorescence change observed after each *p*-jump was in excellent agreement with the spectral change observed in equilibrium measurements. The kinetics induced by upward and downward *p*-jumps were compared under identical final conditions of temperature and pressure. Dissimilar kinetics were observed. Whereas downward *p*-jumps resulted always in monophasic kinetics, upward *p*-jumps led to biphasic kinetics at pressures lower than $P_{1/2}$. A typical example of these kinetics is shown in Figure 3. As shown in Figure 4, the relative amplitude of the slow phase decreased as a function of both pressure and temperature. Above $P_{1/2}$, the slow phase was no longer detectable. Similarly, at 50°C, only the fast phase subsisted. Figure 5 illustrates the pressure profile of k_{obs} at two selected temperatures. Obviously, at 50°C the monophasic upward and downward *p*-jump profiles were distinguished by only very small differences. These were constant throughout the pressure range and may be ascribed to small temperature differences due to adiabatic compression and decompression. In contrast, at 30°C, a second kinetic phase was observed in upward *p*-jumps in the lower pressure range (below $P_{1/2}$). We have carried out upward and downward *p*-jumps in the whole pressure range, every 5°C between 30 and 50 °C. Without exception, we always found the same pattern distinguishing upward and downward *p*-jumps at temperatures below 50°C.

At each temperature, the pressure profile of k_{obs} of the fast phase is characterized by a u-shape, i.e., it exhibits a Chevron plot-like behaviour, which becomes more and more pronounced when the temperature is decreased. The origin of the u-shape is explained by the pressure dependence of the individual rate constants k_f and k_u , as described below.

Pressure dependence of the individual folding and unfolding rate constants

As explained in Experimental Procedures, the individual rate constants of the fast phase, k_f and k_u were determined at each final pressure from k_{obs} and $K(p)$. In all

cases, k_f decreases and k_u increases linearly as a function of pressure (Figure 6). Obviously, k_f predominates at pressures below the equilibrium midpoint unfolding transition, while k_u predominates at higher pressure. This picture was not affected by the direction of the pressure jumps.

Solvent effects

In the presence of glycerol (30%), both ΔG and the absolute value of ΔV were strongly decreased (Table 1). As a consequence, the thermodynamic parameters determined at 50 °C resembled those determined at 30 °C in the absence of glycerol. In contrast, the presence of 10% dextran (MW: 40 000 Da) had no significant effect on the equilibrium parameters. Further information, not accessible under equilibrium conditions, was obtained by a kinetic analysis. As shown in Figure 5, in the presence of glycerol, upward and downward p -jumps experiments resulted in identical relaxation times. The k_{obs} pressure profile was however strongly shifted to higher pressures (see also Table 1). In contrast, dextran did not significantly affect the k_{obs} values.

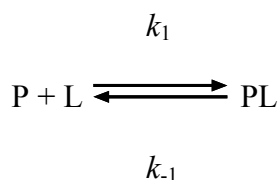
DISCUSSION

1. Dependence of relaxation rate constants on final and initial conditions

An intriguing result of this paper is the observation that the p -jump induced unfolding / refolding kinetics depended on the direction of the pressure jump; i.e., it depended on the initial physical chemical condition. This is against expectation, as in the majority of cases, protein kinetics depends only on final conditions. For a mechanistic understanding of our present results, an inspection of the kinetic laws related to different scenarios in relaxation reactions may be useful.

i) Bimolecular reactions

Typical examples of bimolecular reactions are those reflecting the binding / dissociation of a ligand (L) to or from a protein (P). k_1 and k_{-1} are the forward and backward reactions rates respectively. If the equilibrium reaction

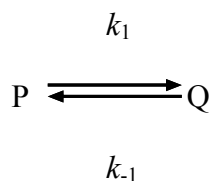


is displaced in the relaxation process, the observed rate constant k_{obs} does depend indeed on the initial conditions, since the respective initial concentrations of (P) and (L) depend on the initial equilibrium conditions. For example, under pseudo first order conditions

$$k_{\text{obs}} = k_1[\text{L}] + k_{-1} \quad (10)$$

ii) Monomolecular reactions

The situation is completely different in monomolecular reactions, such as transitions from a protein conformation (P) to (Q).



Here the observed rate constant is composed only by the two individual rate constants

$$k_{\text{obs}} = k_1 + k_{-1} \quad (11)$$

Since these are concentration independent, k_{obs} depends exclusively on the final conditions of the equilibrium at the end of the relaxation process (34), given by

$$K = k_1 / k_{-1} \quad (12)$$

iii) Sequential and branched reactions

Would a more complex reaction, as for example, a sequential reaction ($A \rightarrow B \rightarrow \dots \rightarrow X \rightarrow Y$) or a branched reaction ($A \rightarrow B$; $A \rightarrow C$) explain the dissimilar kinetics after upward and downward p -jumps? The answer is no. In all these cases, k_{obs} will depend in a complex way on the different rate constants. In turn, these can be expressed as a function of a more or less complex equilibrium constant, which again, is determined by the final physical chemical conditions, only.

2. Hypothetical reaction model

Clearly, the structural transition studied in this paper is a monomolecular reaction. Therefore, Eq. 11 and Eq. 12 should apply. However, in the low pressure domain we observe 2 kinetic phases for upward p -jumps, and only one phase for downward p -jumps. A possible solution for this apparent contradiction may be offered by the reaction scheme depicted in Figure 7. As we will discuss in the next section, this model is in-line with the actual kinetic and structural knowledge of ribonuclease A. In this section, we will limit ourselves to a formal kinetic analysis, however. We hypothesize the existence of one folded state, F , and two unfolded states, denoted U_1 and U_2 .

In upward p -jumps (Figure 7A), initially, at low pressure (panel A), all the protein is in state F , and the two unfolded states are separated by an energy barrier. The upward p -jump provokes a relative energetic change of the three states, and the protein relaxes in a fast phase (Φ_1) from F to U_1 (panel B). In the beginning, the reaction can not proceed further, since U_1 is separated from U_2 by a high energy barrier. However, this energy barrier decreases slowly, allowing the protein to occupy partly U_2 (panel C). This second reaction is slow (Φ_2), since the decrease of the energy barrier is slow. Continuing now our p -jumps to pressures higher than $P_{1/2}$ (panel D), only one kinetic phase is observed (Φ_1 and Φ_2 are indistinguishable, since the energetic barrier between the unfolded states has vanished).

In downward p -jumps (Figure 7B), most of the protein is initially, at high pressure, in state U_2 (panel D). The protein relaxes within a single phase (panel C) to occupy partly U_1 and F (Φ_1 and Φ_2 are indistinguishable, and the two unfolded states are not separated by a high energy barrier). This situation does not change when we

continue with our p -jumps to still lower pressures (panel E). The protein relaxes again within a single observable phase to state F . Then, the energy barrier between the unfolded states will slowly build up again (panel A). However, this is of no kinetic importance, since the protein occupies already the folded state F .

This reaction model, though hypothetical, is in accord with our kinetic observations. It explains why we observe two kinetic phases in upward p -jumps below $P_{1/2}$, but only one phase at higher pressures, and also in downward p -jumps. The analysis of the respective amplitudes of the two kinetic phases confirms this model. Regardless of the temperature, the relative amplitude of the slow phase (Φ_2 in our model) decreases as a function of pressure, until it vanishes when $P_{1/2}$ is reached. This results from the steady decrease at higher pressures of the energy barrier existing between the unfolded states. Furthermore, at a given pressure, its relative amplitude decreases as a function of temperature (to finally become unobservable at 50 °C). This can readily be explained by a temperature dependent decrease of the energy barrier between U_1 and U_2 .

Similar kinetic discrepancies at identical final pressures may be expected by performing p -jumps of different pressure-amplitudes. However, we preferred not to perform these, since different pressure-amplitudes result in different adiabatic heating/cooling effects, which might have biased the significance of the results. Such temperature artefacts are inevitable in p -jumps (30), and therefore we conducted our experiments by applying always constant pressure-amplitudes (40 MPa). However, relaxation kinetics using different perturbation amplitudes have been used by Leeson et al. (35) in temperature-jump experiments with CspA protein connected to a IR spectroscopy detection method. Although the experimental set-up of the temperature and p -jump experiments was quite different, it is interesting to note, that the temperature-jump approach resulted in similar conclusions, implying perturbation-induced changes of the protein energy landscape. Thus, temperature- and p -jump relaxation methods appear as highly complementary experimental approaches. Indeed, the temperature-jump study concluded by calling for performing jumps in opposite directions. This is not feasible with the temperature-jump, but easy to perform with the p -jump method.

3. Relevance of the reaction model with actual kinetic and structural knowledge of ribonuclease A.

Clearly, the above model fits the complex folding/unfolding kinetics presented here. In this section we will check its validity with respect to structural data of ribonuclease A. In a previous report, the two kinetic phases were explained by two unfolding pathways, originating from two distinct folded states (30). However, this hypothesis had to be dismissed in view of our present NMR data, indicating that the protein adopts only one major conformation in its folded state. This leaves us with a minimal reaction model containing only one folded (F) and two unfolded (U_1 and U_2) states.

The identity of U_1 and U_2 may become clear by a comparison with the work of Scheraga and co-workers (25), who used chemical denaturants to induce unfolding of RNase A. Their method, single- and double-jump stopped-flow, as well as pulsed-labelling kinetic experiments, monitored the progress of the reaction by detecting changes of fluorescence of the tyrosyl residues of the enzyme (25; 26). Similarly to our results, they identified two kinetic phases. They showed that the fast-phase monitors conformational unfolding whereas the slow-phase monitors the cis-trans isomerization arising mainly from two proline residues which are cis in the native structure. Specifically, Tyr115 was shown to report locally on the isomerization of the Asn113-Pro114 peptide bond. This suggests strongly, that the fluorescence of the tryptophan residue replacing Tyr115 in the present study, does also report on the isomeric state of the Asn113-Pro114 peptide bond. According to the NOESY spectrum, the Asn113-Pro114 peptide bond of the Y115W variant is - like wild-type RNase A - in the *cis* conformation in the folded state. Hence, the unfolded states U_1 and U_2 appear to reflect the cis and trans isomers of the Asn113-Pro114 peptide bond. Thus, the two kinetic phases observed in upward p -jumps can be understood as a rapid conformational change near to Trp115, followed by a slower decrease of the energy barrier between the cis (U_1) and trans (U_2) isomers.

In the present model, the non-observation of two kinetic phases in downward pressure-jumps is explained by an initially low energy barrier between U_1 and U_2 . This appears justified in the light of a recent report of Bhat et al. (36), showing that the isomeric state of Pro114 has little effect on the folding kinetics of RNase A. Although substitution of Pro114 by Ala or Gly was found to destabilize RNase A by 3 kcal/mol

(37), previous NMR (38), X-ray (39), folding (40-42), and computational modelling (43) data show that RNase A refolds equally from both isomers. Applied to the present model, this means that under unfolding conditions (high pressure/temperature) the remaining energy barrier between the cis and trans isomers of the Asn113-Pro114 peptide bond is low enough to allow their rapid interchange.

These results are interesting with respect to the role of the chain-folding initiation site (CFIS). When unfolding is promoted, the CFIS would be one of the last sub-domains to unfold and the cis-trans isomerization of the Asn113-Pro114 peptide bond takes place only after a first rapid conformational unfolding. In this view, after an increase of pressure, the two-dimensional energy surface must first equilibrate to the new physical chemical condition, before the isomerization of the proline peptide bond can take place. In the contrary, when folding is induced (downward pressure-jump), one of the first sub-domains to fold would be the CFIS, independently of the isomeric state of the Asn113-Pro114 peptide bond, since the energy barrier between both isomers is very low.

4. The stabilizing effect of glycerol via its action on the transition state

As shown in Table 1, glycerol slows down significantly the folding/unfolding reaction rates. As observed for many other proteins (44), it thus exerts a stabilizing effect against pressure-induced protein structural changes. The present study offers a possibility to better understand this effect via a closer analysis of the reaction transition state. Here we are applying this analysis to the fast kinetic phase observed in upward p -jumps, only. Very similar conclusions (not shown) can be drawn from the downward p -jumps. The slow phase, however, contained too few and too scattered data points to permit a thermodynamic analysis.

As shown in Figure 8, the unfolding transition state always occupies a volume in between those of the folded and the unfolded states. However, as shown in the inset, the contribution of the unfolding activation volume ΔV_u^\ddagger to the reaction volume ΔV decreases strongly as a function of temperature. Interestingly, the presence of 30% glycerol compensates this effect: at 50°C the ratio of $\Delta V_u^\ddagger / \Delta V$ is comparable to that at 30°C in the absence of glycerol.

From these data, together with the individual unfolding rate constants k_u , it was possible to construct the free energy (G) / volume (V) diagram of Figure 8. Since our experiments do not permit determination of absolute values of G and V , these were set arbitrarily to zero for the unfolded states. Under this constraint, the free energy of the transition state is about 80 kJ higher than that of the unfolded state, regardless of the temperature and solvent composition. However, as expected, the free energy of the folded state is significantly lower at 30 °C than at 50°C. In the presence of 30% glycerol at 50 °C, the stability lies in between those of 30 °C and 50 °C in aqueous solvent. In water, the volume of the transition state is close to that of the unfolded state at 30°C, and close to that of the folded state at 50°C. Most remarkably, in the presence of 30 % glycerol at 50°C, the volume of the transition state is close to that at 30°C in water.

This combined free energy / volume analysis of the unfolding transition state offers a new way to understand, at least partly, the stabilizing effect of glycerol. The transition state in the pressure-induced unfolding reaction is certainly a highly labile species presenting a strongly decreased volume with respect to the folded state. This volume decrease is probably due to a collapse of voids (existing in the folded structure) and to a higher packing density of water molecules around exposed charged and/or polar residues. This transient structural reorganisation has an energetic cost, which increases as a function of volume change. At high temperature, here at 50°C, the volume decrease from the folded to the transition state is less important, and the activation free energy – and thus the structural stability – is decreased accordingly. Glycerol, acting as an osmolyte, may be seen as compensating this temperature effect by decreasing the volume of the transition state via its reducing action on the hydration shell of the transition state. The result is a transition state, resembling in its volume and energy properties to that observed in its absence at lower temperature. However, the stabilizing effect of glycerol does not seem to be related to an increased solvent viscosity. In fact, as shown in Figure 1, no stabilizing effect was observed when glycerol was replaced by dextran, another viscogen compound. Moreover, as shown in the inset of Figure 8, the presence of dextran did not affect the volume of the transition state. This possible explanation of the structure stabilizing effect of glycerol via its action on the volume of the unfolding transition state is certainly attractive. Nevertheless, to assess its general validity, more experimental p -jump data from other proteins are now needed.

CONCLUSION

After several decades of abundant literature concerning the effects of chemical agents, temperature and pressure on protein structure and stability under equilibrium conditions, the dynamic aspect of protein folding and unfolding is increasingly gaining interest (45). This is certainly due to the recognition that protein folding/unfolding is a complex reaction which can be described properly only in terms of multi-dimensional energy surfaces(7; 46; 47). Apart of computational approaches, the *p*-jump method appears as an interesting tool, avoiding some of the constraints of the *T*-jump method (35). Taking RNase A as a model, the *p*-jump approach results are consistent with pressure and temperature dependent dynamic features of a 2-dimensional energy surface. Furthermore, the method permitted to investigate the importance of the kinetic transition state in its interaction with hydration water. It would be very interesting now, to apply the power of this method to other proteins which tend to unfold under certain pathological conditions. Especially the mechanism of the structural conversion of amyloidogenic proteins is far from being understood (48-52). As these proteins appear to be particularly sensitive toward pressure, it is foreseeable that the investigation of their pressure-induced dynamics will be fertile.

AKNOWLEDGMENTS

This work was undertaken in the framework of the European COST-D30 action. It was supported by the grants BMC2003-08458-CO2-02 and CTQ2004-08275-C02-02 from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain), and SGR01-00196 from DGR, Generalitat de Catalunya. We are also indebted to “Fundació M. F. de Roviralta” of Barcelona for equipment purchasing grants. JF acknowledges a fellowship from the University of Girona. The authors are grateful for the expert technical assistance of Mr. C. Valentin.

REFERENCES

1. Prusiner, S. B. 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216(4542):136-144.
2. Prusiner, S. B., M. R. Scott, S. J. DeArmond, and F. E. Cohen. 1998. Prion protein biology. *Cell* 93(3):337-348.
3. Carrell, R. W., and D. A. Lomas. 1997. Conformational disease. *Lancet* 350(9071):134-138.
4. Taylor, J. P., J. Hardy, and K. H. Fischbeck. 2002. Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* 296(5575):1991-1995.
5. Dobson, C. M., A. Sali, and M. Karplus. 1998. Protein folding: a prespective from theory and experiment. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37(7):868-893.
6. Karplus, M., and D. L. Weaver. 1994. Protein folding dynamics: the diffusion-collision model and experimental data. *Protein Sci* 3(4):650-668.
7. Dill, K. A., and H. S. Chan. 1997. From Levinthal to pathways to funnels. *Nat Struct Biol* 4(1):10-19.
8. Bryngelson, J. D., J. N. Onuchic, N. D. Socci, and P. G. Wolynes. 1995. Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: a synthesis. *Proteins* 21(3):167-195.
9. Vidugiris, G. J., J. L. Markley, and C. A. Royer. 1995. Evidence for a molten globule-like transition state in protein folding from determination of activation volumes. *Biochemistry* 34(15):4909-4912.
10. Jacob, M., G. Holtermann, D. Perl, J. Reinstein, T. Schindler, M. A. Geeves, and F. X. Schmid. 1999. Microsecond folding of the cold shock protein measured by a pressure-jump technique. *Biochemistry* 38(10):2882-2891.
11. Herberhold, H., and R. Winter. 2002. Temperature- and pressure-induced unfolding and refolding of ubiquitin: a static and kinetic Fourier transform infrared spectroscopy study. *Biochemistry* 41(7):2396-2401.
12. Woenckhaus, J., R. Kohling, P. Thiyagarajan, K. C. Littrell, S. Seifert, C. A. Royer, and R. Winter. 2001. Pressure-jump small-angle x-ray scattering detected kinetics of staphylococcal nuclease folding. *Biophys J* 80(3):1518-1523.
13. Panick, G., and R. Winter. 2000. Pressure-induced unfolding/refolding of ribonuclease A: static and kinetic Fourier transform infrared spectroscopy study. *Biochemistry* 39(7):1862-1869.
14. Desai, G., G. Panick, M. Zein, R. Winter, and C. A. Royer. 1999. Pressure-jump studies of the folding/unfolding of trp repressor. *J Mol Biol* 288(3):461-475.
15. Herberhold, H., S. Marchal, R. Lange, C. H. Scheyhing, R. F. Vogel, and R. Winter. 2003. Characterization of the pressure-induced intermediate and unfolded state of red-shifted green fluorescent protein--a static and kinetic FTIR, UV/VIS and fluorescence spectroscopy study. *J Mol Biol* 330(5):1153-1164.
16. Tan, C. Y., C. H. Xu, J. Wong, J. R. Shen, S. Sakuma, Y. Yamamoto, R. Lange, C. Balny, and K. C. Ruan. 2005. Pressure equilibrium and jump study on unfolding of 23-kDa protein from spinach photosystem II. *Biophys J* 88(2):1264-1275.
17. Torrent, J., J. P. Connelly, M. G. Coll, M. Ribo, R. Lange, and M. Vilanova. 1999. Pressure versus heat-induced unfolding of ribonuclease A: the case of hydrophobic interactions within a chain-folding initiation site. *Biochemistry* 38(48):15952-15961.
18. Font, J., J. Torrent, A. Benito, R. Lange, M. Ribó, and M. Vilanova. 2006. Pressure- and temperature-induced unfolding studies: thermodynamics of core hydrophobicity and packing of ribonuclease A. *Biol. Chem.* In press.
19. Torrent, J., P. Rubens, M. Ribo, K. Heremans, and M. Vilanova. 2001. Pressure versus temperature unfolding of ribonuclease A: an FTIR spectroscopic characterization of 10 variants at the carboxy-terminal site. *Protein Sci* 10(4):725-734.
20. Silva, J. L., D. Foguel, and C. A. Royer. 2001. Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure. *Trends Biochem Sci* 26(10):612-618.

21. Wlodawer, A., L. A. Svensson, L. Sjölin, and G. L. Gilliland. 1988. Structure of phosphate-free ribonuclease A refined at 1.26 Å. *Biochemistry* 27(8):2705-2717.
22. Santoro, J., C. Gonzalez, M. Bruix, J. L. Neira, J. L. Nieto, J. Herranz, and M. Rico. 1993. High-resolution three-dimensional structure of ribonuclease A in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Mol Biol* 229(3):722-734.
23. Udgaonkar, J. B., and R. L. Baldwin. 1988. NMR evidence for an early framework intermediate on the folding pathway of ribonuclease A. *Nature* 335(6192):694-699.
24. Schultz, D. A., F. X. Schmid, and R. L. Baldwin. 1992. Cis proline mutants of ribonuclease A. II. Elimination of the slow-folding forms by mutation. *Protein Sci* 1(7):917-924.
25. Juminaga, D., W. J. Wedemeyer, and H. A. Scheraga. 1998. Proline isomerization in bovine pancreatic ribonuclease A. 1. Unfolding conditions. *Biochemistry* 37(33):11614-11620.
26. Wedemeyer, W. J., E. Welker, and H. A. Scheraga. 2002. Proline cis-trans isomerization and protein folding. *Biochemistry* 41(50):14637-14644.
27. Matheson, R. R., and H. A. Scheraga. 1978. A Method for Predicting Nucleation Sites for Protein Folding Based on Hydrophobic Contacts. *Macromolecules* 11:819.
28. Wüthrich, K. 1986. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. Wiley, New York.
29. Kitamura, Y., and T. Itoh. 1987. Reaction volume of protonic ionization for buffering agents - Prediction of pressure-dependence of pH and pOH. *J.Sol. Chem.* 16:715-725.
30. Torrent, J., J. Font, H. Herberhold, S. Marchal, M. Ribó, K. Ruan, R. Winter, M. Vilanova, and R. Lange. 2005. The use of pressure-jump relaxation kinetics to study protein folding landscapes. *Biochim Biophys Acta*. In press.
31. Liu, Y., G. Gotte, M. Libonati, and D. Eisenberg. 2001. A domain-swapped RNase A dimer with implications for amyloid formation. *Nat Struct Biol* 8(3):211-214.
32. López-Alonso, J. P., M. Bruix, J. Font, M. Ribó, M. Vilanova, M. Rico, G. Gotte, M. Libonati, C. Gonzalez, and D. V. Laurents. 2006. Formation, structure and dissociation of the ribonuclease s domain-swapped dimer. *J Biol Chem* In press.
33. Chatani, E., K. Nonomura, R. Hayashi, C. Balny, and R. Lange. 2002. Comparison of heat- and pressure-induced unfolding of ribonuclease a: the critical role of Phe46 which appears to belong to a new hydrophobic chain-folding initiation site. *Biochemistry* 41(14):4567-4574.
34. Gutfreund, H. 1971. Transients and relaxation kinetics of enzyme reactions. *Annu Rev Biochem* 40:315-344.
35. Leeson, D. T., F. Gai, H. M. Rodriguez, L. M. Gregoret, and R. B. Dyer. 2000. Protein folding and unfolding on a complex energy landscape. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(6):2527-2532.
36. Bhat, R., W. J. Wedemeyer, and H. A. Scheraga. 2003. Proline isomerization in bovine pancreatic ribonuclease A. 2. Folding conditions. *Biochemistry* 42(19):5722-5728.
37. Schultz, D. A., and R. L. Baldwin. 1992. Cis proline mutants of ribonuclease A. I. Thermal stability. *Protein Sci* 1(7):910-916.
38. Xiong, Y., D. Juminaga, G. V. Swapna, W. J. Wedemeyer, H. A. Scheraga, and G. T. Montelione. 2000. Solution NMR evidence for a cis Tyr-Ala peptide group in the structure of [Pro93Ala] bovine pancreatic ribonuclease A. *Protein Sci* 9(2):421-426.
39. Pearson, M. A., P. A. Karplus, R. W. Dodge, J. H. Laity, and H. A. Scheraga. 1998. Crystal structures of two mutants that have implications for the folding of bovine pancreatic ribonuclease A. *Protein Sci* 7(5):1255-1258.
40. Juminaga, D., W. J. Wedemeyer, R. Garduno-Juarez, M. A. McDonald, and H. A. Scheraga. 1997. Tyrosyl interactions in the folding and unfolding of bovine pancreatic ribonuclease A: a study of tyrosine-to-phenylalanine mutants. *Biochemistry* 36(33):10131-10145.
41. Dodge, R. W., and H. A. Scheraga. 1996. Folding and unfolding kinetics of the proline-to-alanine mutants of bovine pancreatic ribonuclease A. *Biochemistry* 35(5):1548-1559.

42. Houry, W. A., and H. A. Scheraga. 1996. Nature of the unfolded state of ribonuclease A: effect of cis-trans X-Pro peptide bond isomerization. *Biochemistry* 35(36):11719-11733.
43. Pincus, M. R., F. Geewitz, H. Wako, and H. A. Scheraga. 1983. Cis trans isomerization of proline in the peptide (His 105 Val 124) of ribonuclease A containing the primary nucleation site. *J Protein Chem* 2:131-146.
44. Jacob, M., and F. X. Schmid. 1999. Protein folding as a diffusional process. *Biochemistry* 38(42):13773-13779.
45. Kitahara, R., S. Yokoyama, and K. Akasaka. 2005. NMR snapshots of a fluctuating protein structure: ubiquitin at 30 bar-3 kbar. *J Mol Biol* 347(2):277-285.
46. Smeller, L., F. Meersman, and K. Heremans. 2006. Refolding studies using pressure. The energy landscape of lysozyme in the pressure-temperature plane. *Biochim Biophys Acta* in press.
47. Winter, R., and W. Dzwolak. 2004. Temperature-pressure configurational landscape of lipid bilayers and proteins. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 50(4):397-417.
48. Torrent, J., M. T. Alvarez-Martinez, J. P. Liautard, and R. Lange. 2005. Modulation of prion protein structure by pressure and temperature. *Biochim Biophys Acta*.
49. Torrent, J., M. T. Alvarez-Martinez, J. P. Liautard, C. Balny, and R. Lange. 2005. The role of the 132-160 region in prion protein conformational transitions. *Protein Sci* 14(4):956-967.
50. Torrent, J., M. T. Alvarez-Martinez, M. C. Harricane, F. Heitz, J. P. Liautard, C. Balny, and R. Lange. 2004. High pressure induces scrapie-like prion protein misfolding and amyloid fibril formation. *Biochemistry* 43(22):7162-7170.
51. Torrent, J., M. T. Alvarez-Martinez, F. Heitz, J. P. Liautard, C. Balny, and R. Lange. 2003. Alternative prion structural changes revealed by high pressure. *Biochemistry* 42(5):1318-1325.
52. Marchal, S., E. Shehi, M. C. Harricane, P. Fusi, F. Heitz, P. Tortora, and R. Lange. 2003. Structural instability and fibrillar aggregation of non-expanded human ataxin-3 revealed under high pressure and temperature. *J Biol Chem* 278(34):31554-31563.

Table 1. Thermodynamic parameters of Y115W RNase A variant calculated from pressure-induced unfolding curves at pH 5.0. Numbers in parentheses are the standard errors of the data. The activation volumes were determined from the rapid phase of upward *p*-jumps

Experimental conditions	ΔG kJ mol ⁻¹	ΔV ml mol ⁻¹	$P_{1/2}$ MPa	k_{obs} at $P_{1/2}$ s ⁻¹	ΔV_u^\ddagger ml mol ⁻¹	ΔV_f^\ddagger ml mol ⁻¹
30°C	34.55 (1.43)	-73.81 (3.28)	468 (1.39)	$4.20 \cdot 10^{-3}$ ($1.0 \cdot 10^{-4}$)	-58.17 (2.98)	15.17 (2.98)
50°C	10.25 (0.29)	-45.51 (1.15)	225 (0.85)	$9.49 \cdot 10^{-2}$ ($2.10 \cdot 10^{-3}$)	-17.50 (0.53)	27.84 (0.53)
50°C, 10% dextran	13.56 (2.59)	-55.38 (10.34)	245 (1.10)	$9.29 \cdot 10^{-2}$ ($1.7 \cdot 10^{-3}$)	-20.42 (1.06)	25.46 (1.06)
50°C, 30% glycerol	25.82 (0.96)	-62.01 (2.54)	416 (1.55)	$3.19 \cdot 10^{-2}$ ($2.0 \cdot 10^{-4}$)	-44.28 (2.12)	17.50 (2.12)

FIGURE LEGENDS

Figure 1: 2D NOESY NMR spectrum of RNase A Y115W in D₂O, 0.20 M sodium phosphate, pH* 6.7, 35 °C.

A. Downfield region: the dotted line traces the assignment of the Trp 115 peaks.

B. The dotted boxes mark the position expected for peaks arising from a *trans* Asn113-Pro114 peptide bond; these peaks are not seen strongly suggesting that this peptide bond is >90% in the *cis* conformation.

Figure 2: Normalized transition curves for the pressure-induced unfolding of the Y115W variant of RNase A at different temperatures. Experimental data for depressurisation are coincident with those of pressurisation. The solid lines are nonlinear regression fits of the experimental data, expressed as fraction of unfolded protein, F_u , based on a two-state model, for (○) 30°C, (■) 35°C, (▲) 40°C, (●) 45°C and (△) 50°C.

Figure 3: *P*-jump induced Y115W RNase A folding and unfolding relaxation kinetics at 30°C. Comparison of upward and downward *p*-jumps leading to identical final pressures. The kinetics after a downward *p*-jump is fitted by a single exponential (A), that after an upward *p*-jump by a double (B) and a single exponential (C, dashed line). The corresponding residuals are shown on the right side.

Figure 4: Normalized amplitude of the slow kinetic phase after upward *p*-jumps, as a function of pressure, at 35°C (○), 40°C (▲) and 45°C (●).

Figure 5: Pressure dependence of k_{obs} , determined from upward (filled symbols) and downward (open symbols) *p*-jumps at 35°C (triangles), 50°C (circles) and 50°C in presence of 30% glycerol (squares). The slow phase observed after positive pressure jumps at 35 ° is shown by inverted triangles. At each condition, the data from two independent experimental series were superimposed, in a way to obtain data points every 20 MPa.

Figure 6: Effect of pressure at 30°C (A), 50°C (B), and 50°C in presence of 30% glycerol (C), on the individual folding, k_f , (filled symbols) and unfolding, k_u , (open symbols) rate constants. The dependence of the individual rate constants on initial conditions is shown for positive (◆◇ (A), ●○ (B), ■□ (C)), and negative pressure

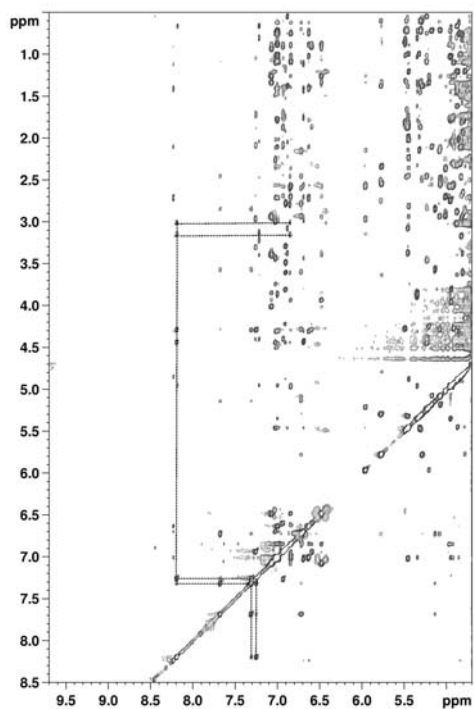
jump ($\blacklozenge \circ$ (A), $\blacktriangle \triangle$ (B)), $\blacktriangledown \triangledown$ (C). Each plot results from the superimposition of two independent experimental series.

Figure 7: Schematic free energy landscape of the Y115W variant of RNase as a function of pressure, including one folded state (F) and two unfolded states (U_1 and U_2). p -jumps are indicated by vertical arrows. A slow relaxation of the energy surface to a new physical chemical condition is indicated by horizontal arrows. (A): upward p -jumps resulting in biphasic kinetics below $P_{1/2}$. (B): downward p -jumps resulting in monophasic kinetics.

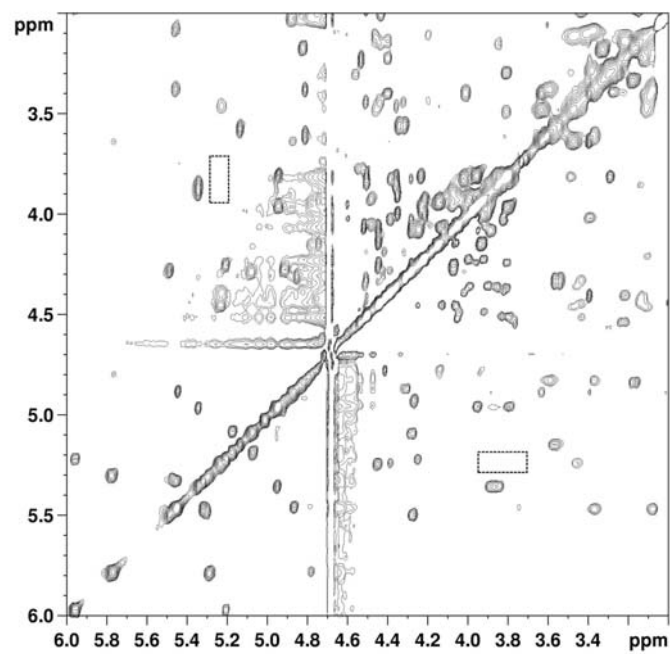
Figure 8: Free energy (G) - volume (V) diagram of the p -jump induced unfolding reaction (fast kinetic phase) at 30°C (\bullet), 50°C (\triangle), 50°C in the presence of 30% glycerol (\circ) and 50°C in the presence of 10% dextran (\blacktriangle). The reaction goes from the folded state (F) to the unfolded state (U) via the transition state ($\#$). The free energy and the volume of the unfolded state were set to zero. The inset shows the ratio between the activation volume, ΔV^\ddagger , and the reaction volume, ΔV , as a function of temperature in water (\bullet), in the presence of 10% dextran (\circ) and in the presence of 30% glycerol (\blacktriangledown). The error bars are contained within the size of the symbols.

Font_figure1

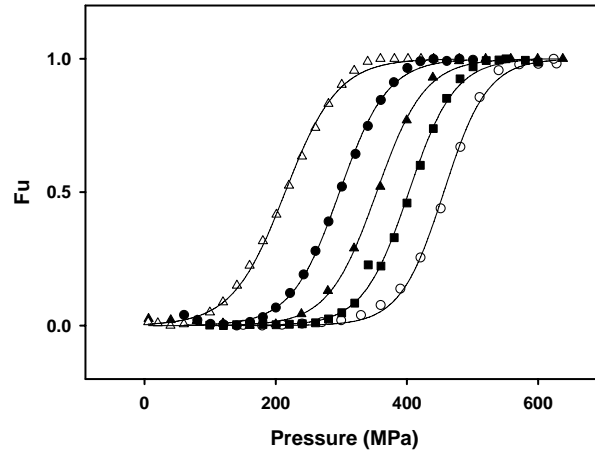
A.



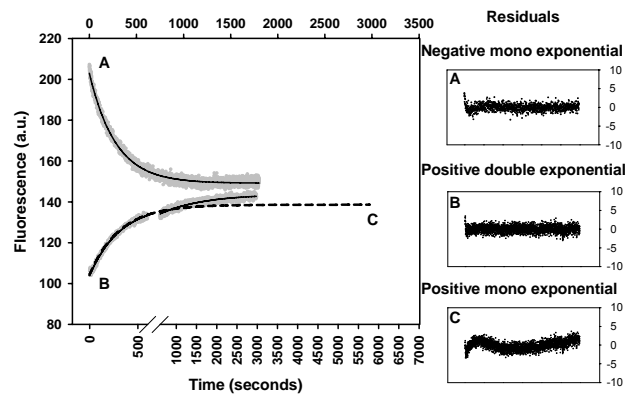
B.



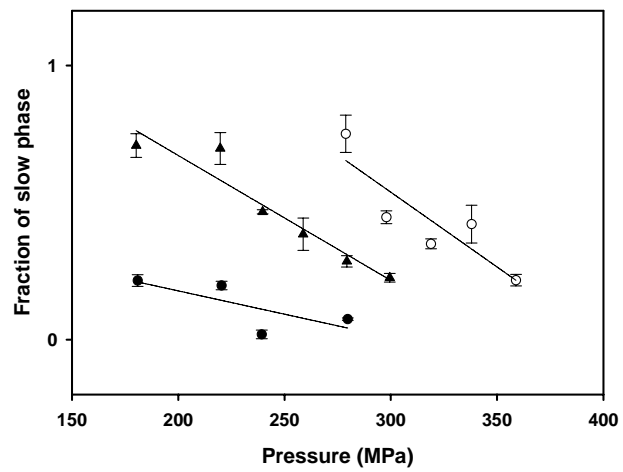
Font_figure2



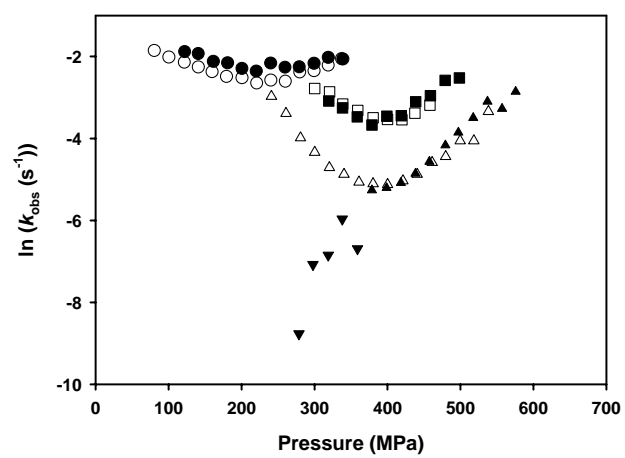
Font_figure3



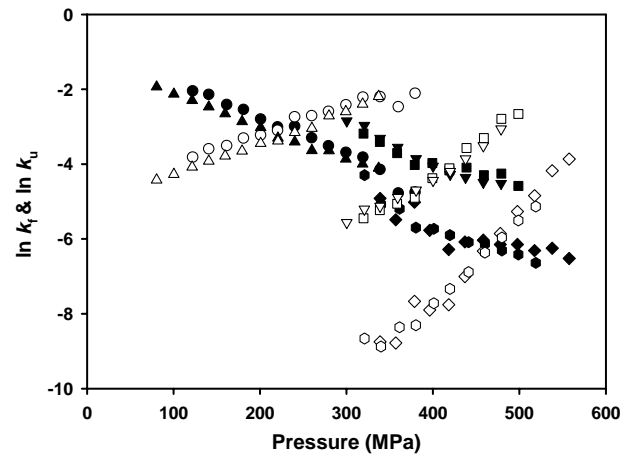
Font_figure4



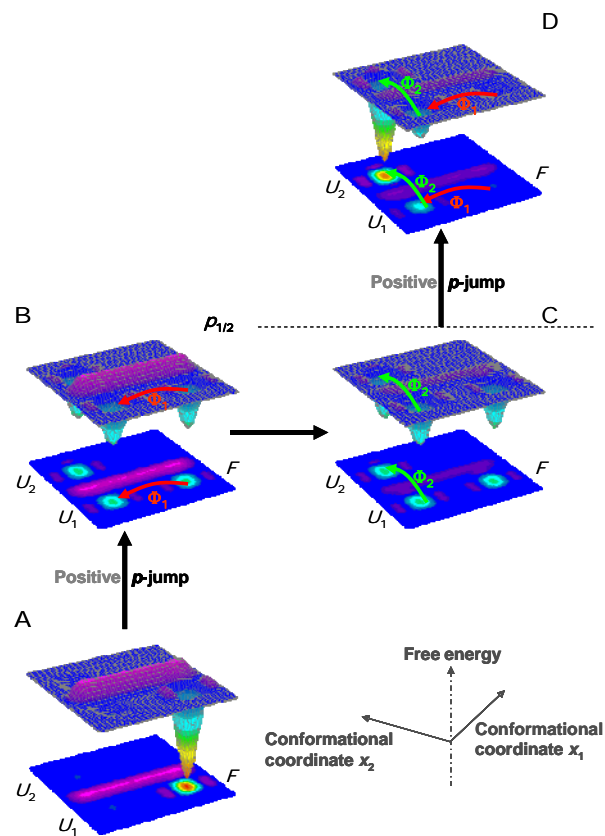
Font_figure5



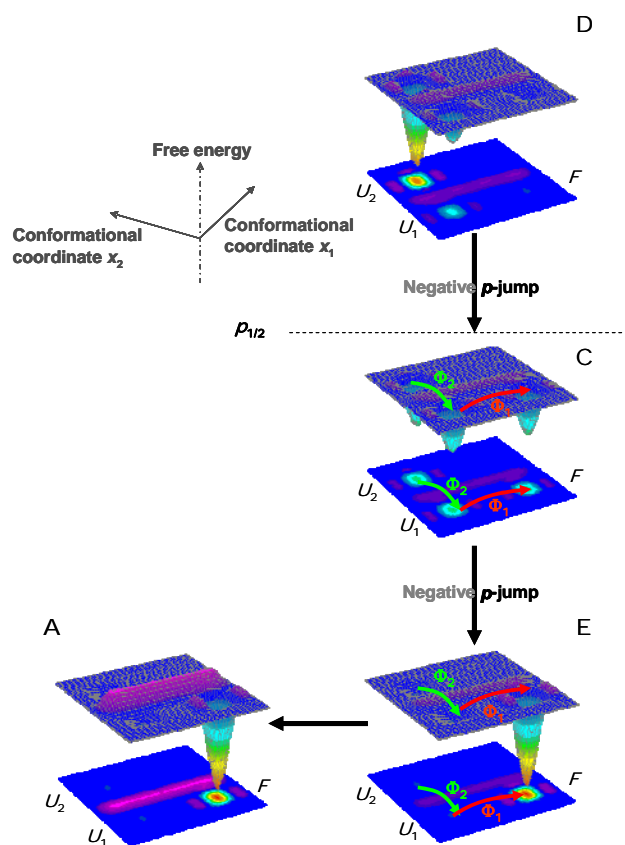
Font_figure6



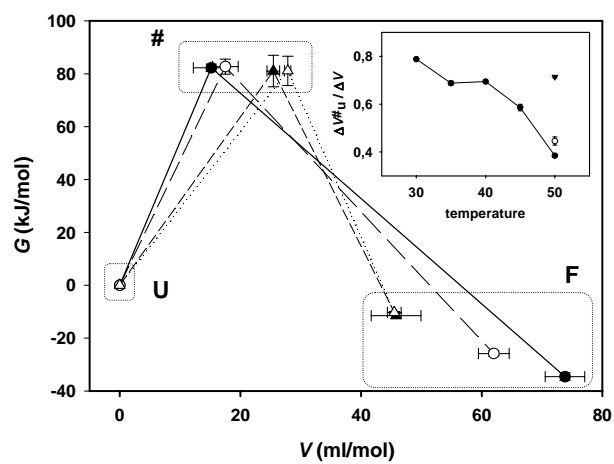
Font_figure7A



Font_figure7B



Font_figure8



DISCUSSIÓ GENERAL

En treballs previs del grup de recerca del Laboratori d'Enginyeria de Proteïnes en el qual s'ha realitzat la present tesi doctoral, es va caracteritzar la contribució dels residus hidrofòbics pertanyents a la regió C-terminal (residus 116-118) de la RNasa A, els quals havien estat proposats com a un centre d'inici del plegament. Aquest centre fou posteriorment redefinit per Neira i i col·laboradors [132, 156], com a part integrant d'un nucli hidrofòbic més ampli que inclouria les regions β Lys62-Ala64, Cys72-Ser75, Ile106-Cys110 i Val116-His119, juntament amb l'hèlix α III. En el treball que constitueix el primer capítol d'aquesta tesi es presenten els resultats obtinguts utilitzant espectroscòpia d'absorció en l'ultraviolat, per a la caracterització termodinàmica del procés de desplegament induït per pressió i temperatura, de variants que afecten residus hidrofòbics d'aquest possible centre de nucleació principal de la RNasa A. Els resultats obtinguts amb les variants en les quals s'ha efectuat una substitució que implica un escurçament de la cadena lateral, permeten una comparació directe de l'energia lliure del procés de desplegament induït per pressió (ΔG_P) i temperatura (ΔG_T), és a dir de l'estabilitat. Aquest procés s'ha comparat emprant un elevat número de variants senzilles en les mateixes condicions experimentals. El conjunt de dades ha permès il·lustrar un mapa força complet de la contribució de cada una de les posicions i dels diferents residus del nucli hidrofòbic a l'estabilitat de l'enzim, resultant els residus Val54, Val57, Ile106 i Val108 els més crítics per al manteniment de l'estabilitat conformacional de l'estat natiu.

La pressió ha estat utilitzada molt menys freqüentment com a agent desnaturalitzant en comparació a la temperatura o reactius químics com ara la urea o el clorur de guanidina. Tanmateix però, la pressió proporciona informació sobre paràmetres termodinàmics de l'equilibri químic, com ara el volum del sistema. Per tal d'obtenir informació de com les dades de pressió poden relacionar-se amb les dades provinents de la utilització d'altres agents desnaturalitzants, en aquest treball també s'ha estudiat la correlació entre ΔG_P i ΔG_T associades al procés de desplegament. S'ha observat que existeix una molt bona correlació entre ambdós paràmetres la qual cosa suggereix que, pel conjunt de variants assajades, el procés de desplegament requereix una energia equivalent, tan si és provocat per la pressió com per la temperatura. Cal precisar que la correlació observada entre ambdues variacions d'energia lliure no implica, necessàriament, ni que els mecanismes de plegament/desplegament siguin

comuns, ni tampoc que els estats desplegats que s'assoleixen, segons si s'utilitza un o altre agent, siguin estructuralment idèntics.

En aquelles variants en les quals el residu natiu ha estat substituït per una Gly, les corbes de les transicions de desplegament induït per pressió que s'han obtingut, han estat incompletes. Això és degut al fet que els valors de $T_{1/2}$ d'aquestes variants es troben al voltant dels 40°C, que és la temperatura utilitzada en els experiments de pressió i per tant no és possible determinar la regió de post-transició de les corbes de desnaturalització. Per tal de superar aquest inconvenient tècnic, el desplegament induït per pressió de la RNasa A i de 9 variants es va determinar a diferents temperatures per sota del corresponent valor de $T_{1/2}$. S'ha pogut comprovar que els valors de ΔG_P determinats experimentalment a diferents temperatures per a cada variant i els valors de ΔG_T calculats a les diferents temperatures utilitzades, presenten per a cada variant, una correlació lineal molt bona. Això ha permès realitzar una estimació dels valors de ΔG_P a 40°C per a totes les variants. És important comentar que per a algunes d'aquestes variants els valors de variació d'energia lliure ja es coneixien experimentalment i, en aquests casos, s'ha pogut comprovar que hi ha una molt bona coincidència entre els valors de ΔG_P estimats a partir de l'aproximació desenvolupada en aquest treball i els resultats experimentals.

Alternativament, per a estimar el valor de ΔG_P a 40°C d'aquelles variants per a les quals no era possible determinar-ho experimentalment, també s'ha utilitzat la relació lineal existent entre els valors de ΔG_P i ΔG_T a 40°C de totes les variants per a les quals ha estat possible la determinació experimental d'ambdues variables termodinàmiques. Els valors de ΔG_P que s'han estimat per les variants per a les quals no s'ha pogut determinar la transició del desplegament completa, coincideixen amb els valors estimats amb l'anterior aproximació. Així doncs, el fet d'analitzar les dades corresponents a un elevat número de variants senzilles (fins a 31), ens ha permès desenvolupar dues aproximacions complementàries per a l'estimació dels valors de ΔG_P associades al procés de desplegament induït per pressió, en aquells casos en els quals no era possible fer-ho experimentalment.

Un dels objectius d'aquest treball ha estat caracteritzar les contribucions a l'estabilitat dels residus hidrofòbics del nucli principal de la RNasa A. El fet d'utilitzar les mateixes condicions experimentals per a l'estudi del desplegament en l'equilibri i el

fet que les diferents variants presenten en l'estat natiu semblances en els paràmetres cinètics per a substrats d'alta i baixa massa molecular i en els perfils de dicroisme circular, ha permès de comparar les variants directament i interpretar els canvis termodinàmics en termes de pertorbacions de l'estructura tridimensional de la proteïna salvatge. El conjunt de resultats obtinguts ha permès determinar la disminució mitjana en la variació d'energia del desplegament associada a l'eliminació d'un grup metil(è) després de la desnaturalització per pressió ($5.31 \pm 1.12 \text{ kJ mol}^{-1}$) o per temperatura ($5.46 \pm 0.63 \text{ kJ mol}^{-1}$). Es pot comprovar que el cost energètic quan s'elimina un grup metil(è) de l'interior de la proteïna, tant pels experiments de desnaturalització per pressió com per temperatura és molt semblant. A més a més, aquests valors són comparables amb els que s'obtenen per substitucions equivalents en altres proteïnes utilitzant agents químics com a desnaturalitzants [157-159]. Per tant, de l'anàlisi d'aquestes dades se'n desprèn d'una banda que la contribució de les interaccions hidrofòbiques en el nucli principal de la RNasa A és com a mínim tan important, des d'un punt de vista quantitatiu, com ha estat descrit en altres proteïnes, i de l'altra, que la pressió resulta un agent desnaturalitzant vàlid per tal de realitzar estudis sobre la relació entre la hidrofobicitat i l'estabilitat conformacional de les proteïnes.

Un altre aspecte que ha constituït un objectiu en el treball presentat en el primer capítol ha estat avaluar la importància de les interaccions degudes a l'empaquetament de les cadenes laterals en el nucli hidrofòbic de la RNasa A. Les anàlisis realitzades han permès constatar que existeix una densitat d'empaquetament molt elevada en aquells residus més enterrats del nucli hidrofòbic de la RNasa A i que no només les interaccions de van der Waals sinó també la geometria dels grups que participen en aquestes interaccions seria important per al manteniment de l'estabilitat. Així també, els resultats indiquen que la densitat d'empaquetament al voltant d'un residu particular, és important a l'hora de determinar la contribució que aquell residu exerceix en l'estabilitat de la proteïna. Els resultats obtinguts estan d'acord amb l'observació que durant l'evolució molecular els residus conservats en la seqüència de la cadena polipeptídica ho són per raons funcionals i o estructurals, incloent-hi l'estabilitat estructural. Així s'ha constatat que, d'acord amb el seu paper en l'estabilitat proteica, els residus enterrats es troben normalment ben conservats al llarg de l'evolució [160, 161]. Això també és aplicable a la RNasa A. Quan es comparen les 41 seqüències de les ribonucleases pancreàtiques de mamífers [162] es pot comprovar que d'entre les posicions estudiades en aquest treball,

totes es troben molt conservades (entre un 87 i un 100%) a excepció de la Ala64, la qual resulta ser la posició menys enterrada amb una àrea accessible al solvent del 33.6 %. Com ha estat observat en altres proteïnes com ara la nucleasa estafilococal [163, 164] o el domini SH3 [165], els resultats obtinguts amb les variants del nucli hidrofòbic de la RNasa A reforcen la importància de les interaccions degudes a l'empaquetament en l'estat natiu com a element clau en l'evolució dels nuclis hidrofòbics de les proteïnes.

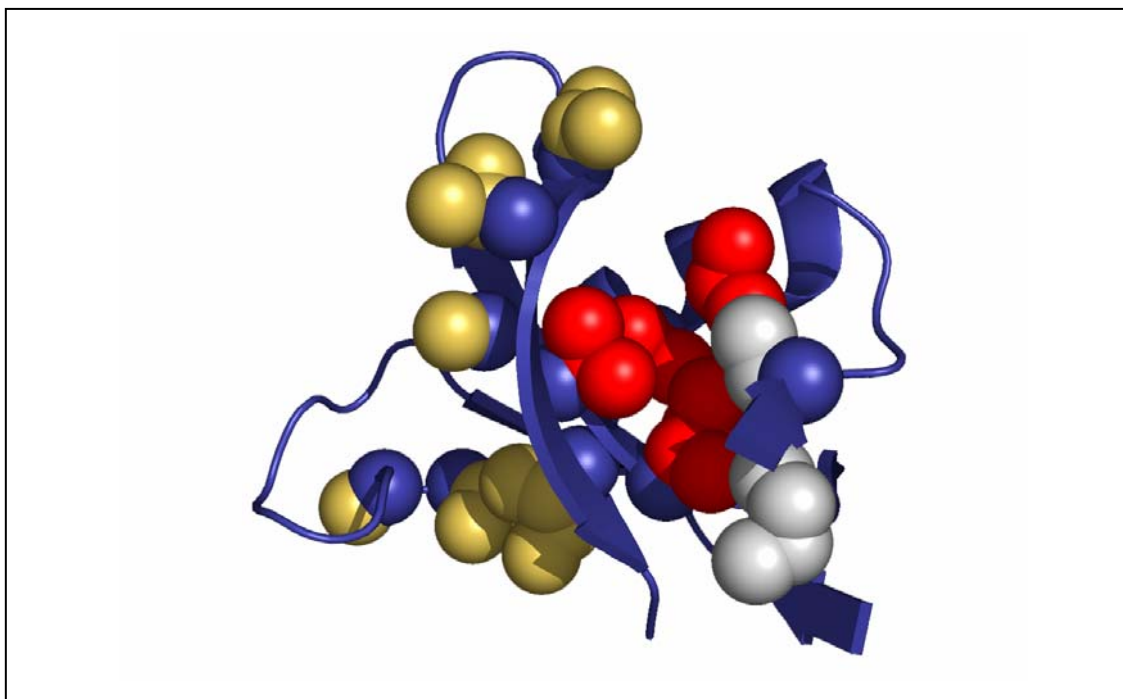
L'anàlisi de la contribució a l'estabilitat de les interaccions hidrofòbiques i de l'empaquetament ha permès comparar quantitativament la importància d'aquests factors en termes energètics. Quan es comparen les mitjanes, en valor absolut, dels canvis d'energia lliure associats a l'enterrament o eliminació d'un grup metil(è) (5.31 ± 1.12 kJ mol⁻¹, per la pressió i 5.46 ± 0.63 kJ mol⁻¹, per la temperatura) amb la variació d'energia associada al moviment o re-empaquetament d'aquests grups en el nucli principal (5.75 ± 1.75 kJ mol⁻¹), es pot comprovar que la contribució de l'empaquetament a l'estabilitat de l'estat natiu de la RNasa A és, com a mínim, energèticament equivalent a la contribució de la hidrofobicitat.

Els resultats obtinguts a partir de l'anàlisi de les energies d'interacció mitjançant els cicles de dobles mutants utilitzant 8 variants dobles, no fa sinó confirmar el que s'ha vist amb l'anàlisi de l'empaquetament: s'observen energies d'interacció positives característiques d'un efecte estabilitzador no additiu fins i tot en variants en les quals s'han eliminat 4 i 5 grups metil(è), suggerint l'existència d'un nucli hidrofòbic altament i estretament empaquetat. En aquest punt, es pot avançar que estudis de cristal·lització que s'estan duent a terme en col·laboració amb el Dr. K. Lewinski del grup de Cristal·lografia de Proteïnes, de la Jagiellonian University of Cracow (Polònia) de les variants més crítiques per a l'estabilitat de l'estat natiu de la RNasa A, confirmen aquests resultats a nivell estructural. Els resultats indiquen que les cavitats són nul·les en la proteïna salvatge mentre que en les variants les cavitats que s'observen són de mida menor a l'esperada (d'acord amb el volum del grup eliminat) la qual cosa fa pensar en l'existència d'una reordenació dels grups del nucli hidrofòbic per tal de compensar i ocupar l'espai deixat pels grups eliminats. Aquests canvis conformacionals implicarien una minimització de les cavitats creades per les substitucions.

El conjunt dels resultats presentats en aquest treball, que constitueix el primer capítol, ens permeten proposar un model de la contribució a l'estabilitat del principal nucli hidrofòbic de la RNasa A. Segons aquest model, els residus Val54, Val57, Ile106 i

Val108 ocupen les posicions més crítiques per a l'estabilitat del nucli. Aquests residus, en el model estructural que es presenta en la Figura 4.1 adoptarien una disposició semblant a la d'una gàbia la tapa de la qual estaria formada per la Phe8 i la Phe120. Els residus Val47 i Ile81 contribueixen significativament a l'estabilització de l'estat natiu tot i que, estructuralment se situen en la regió d'unió entre els dos lòbuls que es poden distingir en l'estructura de la RNasa A. En el model que es proposa, aquests dos residus actuarien com un nexse d'unió entre el nucli hidrofòbic principal objecte d'estudi d'aquesta tesi i un nucli hidrofòbic menor situat en el lòbul oposat de la molècula. Els paràmetres termodinàmics de la resta de variants suggereixen que aquestes altres posicions, que envolten el nucli essencial, jugarien un paper secundari i més local en l'estabilització de la RNasa A. Així per exemple, les substitucions que afecten la Val63 no han resultat crítiques per a l'estabilitat. Tanmateix, la cadena lateral d'aquest residu està encarada a la Ile107 i ambdues contribueixen a enterrar el pont disulfur C65-C72 i, potser el protegeixen de la reducció. De manera semblant la Ala109 s'empaqueta contra la Gln69 en la cara oposada del mateix pont disulfur i per tant, aquests residus, podrien jugar un paper equivalent al proposat per la Val63 i la Ile107.

Figura 4.1



Representació del model anticipat. Es mostren els residus del principal nucli hidrofòbic de la RNasa A com esferes de radi de van der Waals, colorejades segons la seva contribució a l'estabilitat de l'estat natiu: V54, V57, I106 i V108 que constitueixen les posicions més crítiques en vermell, V47 i I81 les quals es troben posicionades en el nexse d'unió entre els dos lòbuls, en blanc, mentre que la resta de posicions, V63, A64, I107, A109, V116 i V118 en groc. La figura ha estat realitzada amb el programa PyMol [166].

Després de caracteritzar termodinàmicament el paper dels residus del nucli hidrofòbic a l'estabilitat de l'estat natiu, el següent pas per aprofundir en el coneixement del plegament proteic de la RNasa A ha estat la caracterització de l'estat de transició del procés induït per pressió. Així, en el treball que constitueix el segon capítol d'aquesta tesi, s'ha estudiat el paper de les interaccions hidrofòbiques que estableixen els residus, que conformen el nucli hidrofòbic principal de la RNasa A, en l'estat de transició del plegament/desplegament induït per pressió.

En la majoria dels estudis en els quals s'ha utilitzat el mètode dels valors Φ , les cinètiques dels processos de plegament/desplegament han estat seguides per tècniques de "stopped flow", utilitzant agents desnaturalitzants químics per tal d'induir la transició. Comparativament, hi ha molts pocs treballs en els quals s'hagi utilitzat la pressió per tal de descriure l'estat de transició del procés de plegament/desplegament proteic. Amb el desenvolupament de les tècniques de salts de pressió, s'han dut a terme uns quants treballs d'estudi de cinètiques de plegament, ja sigui utilitzant només pressió o combinant-la amb altres agents desnaturalitzants però, la majoria d'ells sobre la proteïna salvatge. Hi ha molts pocs exemples en els quals s'hagin utilitzat mutants per a estudiar l'estat de transició del plegament/desplegament induït per pressió d'una proteïna. La pressió presenta diversos avantatges respecte altres agents: no altera significativament les propietats del solvent, la pressió es propaga ràpidament de manera que l'homogeneïtat de la mostra no representa un problema i, els salts de pressió es poden efectuar bidireccionalment, és a dir, en el sentit positiu i en el negatiu. A més a més, la utilització de la pressió com a agent desnaturalitzant permet calcular el volum de la reacció a través de mesures en l'equilibri així com el volum d'activació per a les reaccions de plegament i desplegament. Aquests valors, que no es poden calcular utilitzant altres agents desnaturalitzants, permeten obtenir informació sobre la solvatació de l'estat de transició.

En el treball que es presenta com a segon capítol, s'ha utilitzat la determinació dels valors β_p , juntament amb el mètode d'enginyeria de proteïnes o mètode dels valors Φ , per tal d'estudiar el grau de compactació de l'estat de transició i les interaccions existents en aquest estat del procés de plegament/desplegament induït per pressió de la RNasa A. Així, en aquest treball les cinètiques de plegament/desplegament de la RNasa A i de les variants per Ala de les posicions Val47, Val54, Val57, Ile81, Ile106, Ile107 i Val108 han estat estudiades utilitzant tècniques de salts de pressió.

Els valors β_P s'han determinat a partir dels volums d'activació de les reaccions de plegament i desplegament. És important remarcar, que els canvis de volum que tenen lloc durant el plegament i el desplegament de la RNasa A i les variants estudiades, provenen principalment de canvis en les interaccions de la cadena polipeptídica amb el solvent i de deficiències en l'empaquetament en el nucli hidrofòbic, i que per tant, la mesura del volums d'activació per les reaccions de plegament i desplegament en relació al volum de la reacció, permet obtenir informació estructural sobre l'estat de transició [82, 167]. Els resultats d'aquestes determinacions indiquen que el volum de l'estat de transició en el cas de la RNasa A és en un 60% semblant a l'estat natiu, suggerint que es troba parcialment solvatat. Per a les variants, els resultats de valors β_P obtinguts indiquen que aquelles més desestabilitzades presenten un estat de transició, si més no des del punt de vista de la solvatació, més semblant a l'estat natiu. Aquests resultats s'han interpretat d'acord amb el postulat de Hammond [168] segons el qual, l'estructura de l'estat de transició d'una reacció química esdevé més semblant al producte quan el producte és desestabilitzat. Per a les reaccions de plegament induïdes per pressió, un moviment estructural de l'estat de transició es pot explicar en base a l'afebliment de les interaccions hidrofòbiques juntament a un increment en la solvatació de la cadena polipeptídica quan la pressió augmenta [100, 149, 169]. Com a conseqüència, són necessàries un major número d'interaccions i això comporta una deshidratació de la cadena polipeptídica per tal de compensar la pèrdua d'entropia conformacional durant el procés de plegament. Aquest conjunt de fenòmens porten a que l'estat de transició s'assembli més a l'estat natiu.

Paral·lelament, s'ha utilitzat el mètode de l'enginyeria de proteïnes o mètode dels valors Φ desenvolupat inicialment per Fersht i col·laboradors [74, 76]. Totes les posicions analitzades presenten valors de Φ de plegament (Φ_f) fraccionaris. Els valors de Φ_f menors corresponen a les variants que s'han descrit com a més crítiques per a l'estabilitat (Val47, Ile106 i Val108). Per tant, les interaccions de tots els residus analitzats són probablement més importants per la estabilització de l'estat plegat de la RNasa A que per al direccionament del seu plegament, atès que tots els valors de Φ_f obtinguts oscil·len entre 0.35-0.55. Tanmateix, basant-se en els resultats d'Udgaonkar i Baldwin [170], segons els quals els protons amida de les posicions estudiades es trobarien entre aquells més protegits durant el plegament de la RNasa A, hom esperaria uns valors de Φ_f més elevats. Aquesta discrepància podria provenir del fet que en NMR

es registra el comportament de la cadena principal mentre que en el mètode de l'enginyeria de proteïnes s'estan seguint les interaccions de les cadenes laterals. Podria succeir doncs, que l'estat de transició el nucli hidrofòbic principal de la RNasa A presentés un esquelet polipeptídic altament estructurat però que les cadenes laterals estiguessin allunyades de la seva conformació nativa.

La utilització d'una estratègia combinada ha permès comprovar que les conclusions sobre l'estat de transició extretes a partir del mètode d'enginyeria de proteïnes són consistents amb les extretes a partir dels valors β_p , els quals es poden obtenir específicament a partir d'estudis en els quals s'utilitza pressió com a agent desnaturalitzant. Així s'ha trobat una bona correlació lineal entre els valors de Φ_f i les variacions de β_p ($\Delta\beta_p$) entre la proteïna salvatge i les variants d'aquesta. Aquesta relació indica que les cadenes laterals que presenten un número menor d'interaccions natives en l'estat de transició, són també aquelles que presenten menys diferències de solvatació o compactació de l'estat de transició en relació a l'estat natiu, quan es compara aquesta diferència amb l'existent en la proteïna salvatge. És de destacar que, malgrat que s'ha postulat que la naturalesa de l'estat de transició descrita a partir d'estudis de plegament/desplegament induïts per pressió està d'acord amb els resultats del mètode d'enginyeria de proteïnes [167], aquest treball constitueix la primera comparació directa utilitzant un conjunt de mutants.

Aquests estudis han permès concloure que l'estat de transició del procés de plegament per pressió és entre un 40 i un 50% semblant a l'estat natiu. Des del punt de vista de les interaccions que es troben formades, es pot dir que l'estat de transició del nucli hidrofòbic de la RNasa A és una forma relativament expandida de l'estat plegat. La mitjana dels valors de Φ_f es troba al voltant de 0.43, la qual cosa situa l'estat de transició a mig camí entre l'estat desplegat i l'estat natiu, indicant que com a promig, el 43% de l'energia lliure de les interaccions es perd en arribar a l'estat de transició de desplegament, a partir de l'estat plegat.

El valor mig de β_p per les variants és de 0.4, suggerint que l'estat de transició s'assembla en un 40% a l'estat natiu des del punt de vista de la compactació. La disminució de volum entre l'estat plegat i el de transició, indica que aquest segon es troba més solvatat i que els buits han desaparegut en relació a l'estat plegat. Això suggereix que, malgrat que totes les mutacions en principi poden crear una cavitat, el

nucli hidrofòbic de la RNasa A presenta una plasticitat molt elevada que possibilita una reordenació considerable de l'empaquetament. Aquest fet està d'acord amb les energies d'interacció determinades en els cicles de dobles mutants que afecten les posicions 54, 57, 106 i 108 descrites en el primer capítol.

A partir del treball realitzat no és possible encara proposar un mecanisme pel procés de plegament per pressió de la RNasa A. Tanmateix, a partir dels estudis realitzats, i tenint en compte que l'estat desnaturalitzat per pressió de la RNasa A s'ha vist que conté estructura secundària residual [138] i mostra algunes característiques de glòbul fos i un interior líquid [136], sembla raonable proposar un estat de transició que tindria un elevat grau d'estructura secundària format i un nucli hidrofòbic més relaxat, no tant compacte. Això al seu torn, suggereix una via de plegament per pressió per al nucli hidrofòbic de la RNasa A que estaria d'acord amb un mecanisme de nucleació-condensació.

En treballar amb la proteïna salvatge a 40°C es va observar que el camí de plegament (salts negatius) i el de desplegament (salts positius) induït per pressió eren idèntics. Atès que per la RNasa A s'han descrit camins de plegament i desplegament diferents relacionats amb la presència d'enllaços Xaa-Pro en conformació cis [152, 171, 172] ens varem plantejar en el tercer capítol emprar una variant que incorpora un residu de W en la posició 115 amb dues finalitats:

- a) Incrementar el senyal fluorescent, la qual cosa hauria de permetre veure amb més facilitat diferències en els camins de plegament/desplegament en el cas de que aquestes existissin (cal tenir en compte que la RNasa A no presenta cap residu de W en la seva seqüència).
- b) Atès que la posició 115 es troba al costat de l'enllaç peptídic Asn113-Pro114 el qual en l'estat natiu es troba en conformació cis, la presència d'un W en aquesta posició podria servir de sonda local pel seguiment de la isomerització de l'esmentat enllaç peptídic.

La variant estudiada cinèticament, havia estat caracteritzada prèviament des d'un punt de vista termodinàmic presentant unes característiques estructurals i una estabilitat conformacional similars a les de la proteïna salvatge.

Els resultats obtinguts, indiquen que depenent de les condicions experimentals (especialment temperatura) s'arriba a situacions on les cinètiques, després de salts

positius o salts negatius, són significativament diferents. Els resultats s'han interpretat en el context d'un paisatge conformacional complex i s'ha proposat un model per tal d'explicar les cinètiques observades, les quals no estarien d'acord amb una descripció del procés de plegament/desplegament en dos estats al llarg d'una única coordenada. Per tal d'explicar el comportament observat, el model proposat incorpora una coordenada conformacional addicional i explica el procés de plegament/desplegament utilitzant un paisatge energètic i conformacional complex. En aquest model es descriu el procés en una superfície d'energia lliure de tres dimensions, la qual cosa permet representar el fet que el plegament i el desplegament puguin transcórrer des de punts diferents de la superfície.

A partir de les dades cinètiques s'observa que els perfils de relaxació s'ajusten bé a dues fases a pressions baixes per salts de pressió positius, mentre que per salts negatius només es detecta una única fase. Per a explicar l'existència de dues fases, cadascuna amb velocitats i amplituds diferents, en el desplegament i d'una única fase en el plegament, el model que es proposa (Figura 4.2) presenta les següents característiques:

Salts positius o desplegament:

- 1- A pressions baixes la proteïna es troba essencialment en el seu estat plegat (F), per la qual cosa es representa com un mínim d'energia lliure, [paisatge A].
- 2- Un salt positiu indueix, en primer lloc un canvi conformacional ràpid de desplegament (velocitat Φ_1), [paisatge B].
- 3- En segon lloc, el paisatge energètic s'adapta a la nova pressió, es a dir, arriba al seu equilibri, aquest procés és més lent que el canvi conformacional ràpid que s'ha descrit en el segon punt. Aquesta readaptació a les noves condicions, porta a una reducció de la barrera energètica existent entre les conformacions cis i trans, permetent el pas d'una a l'altra. Aquest canvi conformacional considerat lent (velocitat Φ_2), es pot atribuir a la isomerització cis-trans de l'enllaç peptídic natiu Asn113-pro114 [paisatge C](veure més endavant).
- 4- A pressions properes a $P_{1/2}$, [paisatges D i E], aquest segon canvi conformacional lent és menys apreciable, fins al punt d'arribar a ser indistingible a partir de pressions iguals a $P_{1/2}$ [paisatge F]. Aquest fet s'atribueix a una readaptació del paisatge energètic a les noves condicions que promouen l'eliminació de la barrera

energètica entre U_{cis} i U_{trans} . Així doncs a pressions més altes que $P_{1/2}$ la barrera energètica entre les dues conformacions U_{cis} i U_{trans} va desaparèixer i l'equilibri entre les dues espècies existents U_{cis} i U_{trans} es desplaça cap a la conformació U_{trans} a pressions més elevades, ocupant un mínim energètic més profund. En disminuir considerablement la barrera energètica que separa U_{cis} de U_{trans} les velocitats de les dues fases no es poden diferenciar

Salts negatius o replegament:

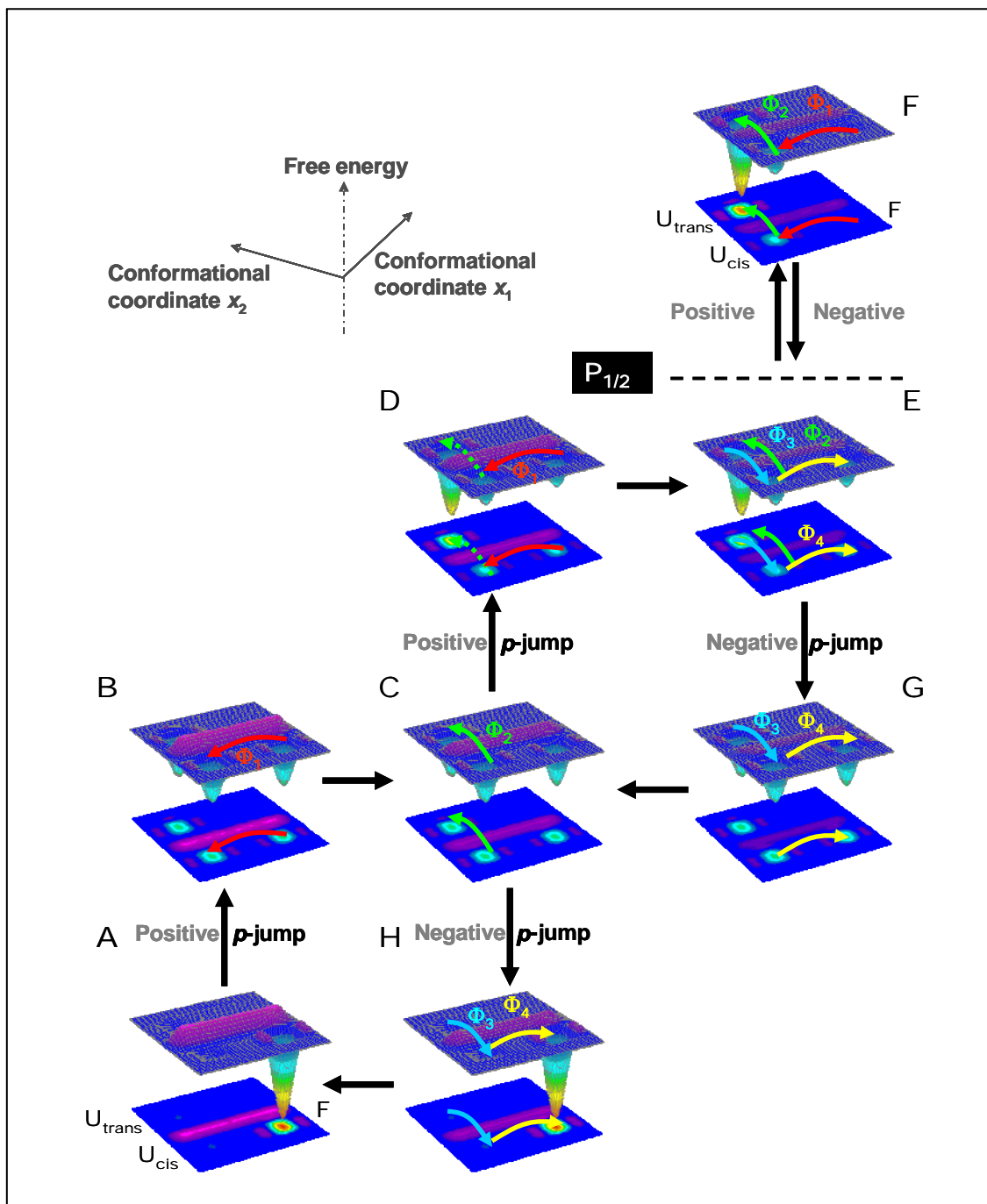
- 5- Un salt negatiu a qualsevol pressió, resulta sempre en una única fase cinètica, degut a que les velocitats dels dos canvis conformacionals que es produeixen són indistingibles l'una de l'altra (velocitat Φ_3 i Φ_4). En els salts negatius la proteïna es relaxa seguint una única fase (paisatge E) ocupant parcialment tant U_{cis} com F . Les dues velocitats Φ_3 i Φ_4 són indiferenciables atès que els dos estats despleats no estan separats per una barrera energètica elevada. La situació no canvia quan es fan salts a pressions més baixes (paisatge G). Finalment la barrera energètica que separa U_{cis} i U_{trans} lentament torna a incrementar (paisatge C). No obstant, en aquest estadi ja no té importància cinètica perquè la majoria de la proteïna es troba en l'estat plegat.

Aquest esquema de reacció hipotètic proposat està amb concordança amb resultats previs del grup de Scheraga [152, 171, 172], sobre l'estudi de desplegament i replegament de la RNasa A induït per desnaturalitzants químics utilitzant salts simples i dobles seguits per tècniques de "stopped flow". El nostre model està d'acord amb les conclusions que deriven d'aquest estudi i experiments cinètics de "pulsed-labelling".

El grup de Scheraga proposa en primer lloc que el desplegament de la RNasa A seguit per fluorescència consisteix en dues fases, una fase ràpida i una de lenta. La fase ràpida s'atribueix al desplegament conformacional mentre que la fase lenta s'atribueix a la isomerització cis-trans, principalment dels dos residus de prolina que en l'estructura nativa es troben en conformació cis. En segon lloc, en el mètode utilitzat en aquest darrer treball, la Tyr115 aporta informació local sobre la isomerització de l'enllaç peptídic en cis de Asn113-Pro114. En un treball recent del mateix grup [152] es descriu que l'estat isomèric de l'enllaç peptídic en el qual participa la Pro114 té un efecte pràcticament nul en la cinètica de plegament de la RNasa A. A més, tot i que la substitució de la Pro114 per Ala o Gly desestabilitza la RNasa A 3 kcal/mol [173],

dades prèvies obtingudes per NMR [174], raigs X [175], plegament proteic [176-178] i modelat molecular [179] indiquen que la RNasa A es replega per igual a partir de qualsevol dels dos isòmers.

Figura 4.2



Esquema del paisatge energètic proposat per la variant Y115W de la RNasa A en funció de la pressió. A temperatures més baixes de 50°C. En la figura s'il·lustren els salts positius resultants en 2 fases cinètiques i en una sola fase cinètica, corresponents a salts per sota i per sobre de $P_{1/2}$, respectivament, i els salts negatius que resulten en una sola fase en tot el rang de pressions utilitzat. En la superfície d'energia lliure s'indiquen els estats plegat (F) i desplegats (U_{cis} i U_{trans}), respectivament. Les fletxes verticals simbolitzen la direcció del salt de pressió mentre que les horitzontals representen l'adaptació del paisatge energètic a la nova condició després del salt de pressió corresponent.

A 50°C només s'observa una sola fase tant en els salts positius com en els salts negatius. Això es pot atribuir al fet que l'equilibri cis-trans dels enllaços peptídics Xaa-Pro és dependent de la temperatura. Una temperatura de 50°C és suficient per promoure una disminució significativa o fins i tot promoure la desaparició de la barrera energètica entre els estats desplecats en U_{cis} i en U_{trans} . Per tant s'observa una única fase tant en els salts positius com en els salts negatius.

Els resultats estan d'acord amb el fet que la regió estudiada sigui un centre de nucleació. Quan s'indueix el desplegament, el CFIS podria ésser un dels últims sub-dominis en desplegar-se i la isomerització cis-trans de l'enllaç peptídic de Asn113-Pro114 només podria tenir lloc després del desplegament conformacional, d'aquí la barrera energètica existent entre els dos estats conformacionals U_{cis} i U_{trans} . En el cas contrari, quan s'indueix el plegament un dels primers sub-dominis en plegar-se podria ser el CFIS independentment de l'estat isomèric en què es trobi l'enllaç peptídic Asn113-Pro114.

Finalment es va estudiar l'efecte d'alguns osmolits en l'estabilitat i el procés de plegament de la variant Y115W de la RNasa A. Els resultats obtinguts van indicar que la presència de glicerol reverteix l'efecte desnaturalitzant de la pressió i la temperatura. Amb la presència de glicerol al 30%, tant els valors de ΔG i ΔV (en valor absolut) disminuïen significativament. Com a conseqüència, els paràmetres termodinàmics determinats a 50°C s'assemblen als determinats a 30°C en absència de glicerol. En canvi, la presència de dextrans al 10% no tenia cap efecte significatiu en els paràmetres termodinàmics determinats a l'equilibri. Es va obtenir més informació amb les anàlisis cinètiques, on es van trobar resultats idèntics tant pels salts positius com pels negatius.

L'efecte estabilitzant del glicerol és conegut en altres proteïnes. Així compensa l'efecte desestabilitzador de la temperatura, disminuint el volum de l'estat de transició en reduir la capa d'hidratació d'aquest estat. El resultat, és un estat de transició, que s'assembla en el seu volum i les seves propietats energètiques a l'observat a baixes temperatures. L'efecte estabilitzador del glicerol, no sembla doncs, estar relacionat amb un increment de la viscositat del solvent. De fet, tal i com es mostra en l'últim capítol, el glicerol no pot ser substituït pel dextrans, un altre viscosogen.

La possible explicació de l'efecte estabilitzador del glicerol via la seva acció sobre el volum de l'estat de transició del procés de desplegament és atractiva, no obstant per a la seva generalització caldrien més treballs estudiant altres proteïnes mitjançant salts de pressió.

Malgrat que l'estudi del plegament proteic s'ha dut a terme durant dècades a partir d'estudis amb agents químics i temperatura principalment, els resultats d'aquest treball de tesi, ressalten la importància de la pressió com a eina per a l'estudi del plegament proteic no tan des d'un punt de vista termodinàmic sinó cinètic. Així mateix l'elecció d'un model proteic com la RNasa A, que ha estat abundantment estudiat, és d'especial utilitat per poder interpretar els resultats obtinguts per efecte de la pressió.

CONCLUSIONS

Conclusions

1. Les posicions V54, V57, I106 i V108, són les més crítiques per a l'estabilitat del principal nucli hidrofòbic de la RNasa A. Aquests residus adopten una disposició tipus gàbia, la tapa de la qual estaria constituïda per els residus F8 i F120.
2. Les posicions V47 i I81, contribueixen significativament en l'estabilització de l'estat plegat i es col·locarien en la connexió entre els dos lòbuls de la RNasa A. Aquests dos residus podrien actuar com a connectors entre els dos nuclis hidrofòbics localitzats un a cada lòbul de la proteïna.
3. Els altres residus estudiats, que envolten el principal nucli hidrofòbic de la RNasa A podrien estar jugant un paper secundari i més localitzat en la estabilització de la RNasa A. Les parelles V63-I107 i Q69-A109 contribuirien en l'enterrament del pont disulfur C65-C72 i probablement el protegirien de la reducció.
4. Les forces que intervenen en l'estabilitat conformacional de l'estat natiu de la RNasa A, l'efecte hidrofòbic i l'empaquetament, són com a mínim iguals energèticament parlant.
5. Es troba una bona correlació lineal entre els valors de ΔG_P i ΔG_T a 40°C per a totes les variants analitzades suggerint, que el procés de desnaturalització induït per pressió requereix un aport energètic equivalent a l'induït per temperatura, la qual cosa no implica que el camí de desplegament sigui equivalent ni que s'arribi a estats desplegats idèntics.
6. L'estructura de l'estat de transició del nucli hidrofòbic de la RNasa A, des del punt de vista d'interaccions formades, té una forma uniformement expandida de l'estructura plegada amb una mitjana de valor de Φ_f de 0.43, la qual cosa col·loca l'estat de transició a mig camí entre l'estat plegat i el desplegat. Això significa que, de mitjana, s'ha perdut el 43% de l'energia lliure d'interacció en aconseguir l'estat de transició de desplegament des de l'estat plegat.
7. Tant l'enzim salvatge com les variants presenten un volum d'activació de desplegament negatiu, la qual cosa col·loca l'estat de transició entre els estats plegat i desplegat. De mitjana, el valor de β_P per les variants es troba al voltant de 0.4,

suggestint que l'estat de transició s'assembla en un 40% a la forma nativa des d'un punt de vista de compactació.

8. La disminució en volum entre l'estat plegat i l'estat de transició indica que aquest últim està més solvatat i que s'han eliminat cavitats en comparació amb l'estat plegat. Aquest fet, suggereix que per les variants, encara que totes les mutacions creen cavitats, l'elevada plasticitat del nucli hidrofòbic de la RNasa A permet reordenaments importants de l'empaquetament interior. Això es troba en concordança amb les energies d'interacció calculades per les parelles de residus V54-I106, V54-V108, V57-I106 i V57-V108, utilitzant cicles de dobles mutants.
9. El conjunt dels resultats obtinguts en la caracterització de l'estat de transició de la RNasa A utilitzant pressió, suggereix un camí de plegament induït per pressió d'acord amb un mecanisme de nucleació-condensació per al principal nucli hidrofòbic de la RNasa A no reduïda.
10. Malgrat que el camí de plegament/desplegament induït per pressió de la RNasa A a 40°C és idèntic, en seguir les cinètiques de la variant Y115W, que termodinàmicament i estructuralment és molt similar a la proteïna salvatge, s'observa una cinètica de desplegament complexa depenent de la temperatura i pressió.
 - 10.1- Per a la variant Y115W a baixes temperatures i a pressions per sota de $P_{1/2}$, un salt positiu es tradueix en dues fases cinètiques, la primera de les quals correspon a un canvi conformacional ràpid de desplegament i la segona a una adaptació del paisatge energètic associada a un canvi conformacional lent, atribuït a la isomerització cis-trans de l'enllaç peptídic natiu Asn113-Pro114.
 - 10.2- A 50°C o a pressions per sobre de $P_{1/2}$, s'observa una sola fase en els salts positius, conseqüència de la desaparició de la barrera energètica entre els estats U_{cis} i U_{trans} , la qual cosa provoca que les velocitats associades al canvi conformacional de plegament i a la isomerització de l'enllaç Xaa-Pro són indistingibles, per la tècnica utilitzada.
 - 10.3- Un salt negatiu, a qualsevol pressió o temperatura, resulta sempre en una única fase cinètica, degut a que les velocitats associades al canvi

conformacional de plegament i a la isomerització de l'enllaç Xaa-Pro són indistingibles.

- 11.** El glicerol sembla compensar l'efecte de la temperatura i la pressió en el procés de desplegament, disminuint el volum de l'estat de transició per disminució de la capa d'hidratació de l'estructura de l'estat de transició.

Conclusions

1. The positions V54, V57, I106 i V108, are the most critical for the stability of the main hydrophobic core of RNase A. These residues adopt a cage-like disposition in which the lid is formed by F8 and F120.
2. The positions V47 i I81 contribute significantly to the stability of the folded state and lie in the two-lobe junction of RNase A. These two residues could act as a link between the hydrophobic cores located within each lobe.
3. The other studied residues that surround the main hydrophobic core could play a secondary and more localized role in the stability of RNase A. The pairs of residues V63-I107 and Q69-A109 could contribute to burying the C65-C72 disulfide bond, perhaps protecting it from reduction.
4. The forces which contribute to the conformational stability in the native state of RNase A, hydrophobicity and packing, are at least of equal energetic importance.
5. Good correlation was found between ΔG_P and ΔG_T at 40°C for all the variants, suggesting that the unfolding process requires equivalent energy for both denaturing agents, which does not imply that the unfolding way is equivalent nor that the unfolded states are identical.
6. The structure of the transition state of the hydrophobic core of RNase A from the point of view of formed interactions is a relatively uniformly expanded form of the folded structure with a mean Φ_T -value of 0.43, which places it half way between the folded and unfolded states. This means that, on average, 43% of the free energy of interaction is lost on reaching the transition state for unfolding from the folded state.
7. Both the wild-type enzyme and the variants present a negative unfolding activation volume which places the transition state between the native and unfolded state. On average the β_P -value for the variants is around 0.4, suggesting a transition state that is 40% native-like from the point of view of compactness.
8. The decrease in volume between the folded and transition state indicates that the latter is more solvated and that voids have been eliminated compared to the folded state. This suggests that, although all the mutations create cavities, the hydrophobic core of RNase A has high plasticity which allows an important rearrangement of the

interior's packing. This is in agreement with the interaction energies calculated for the pairs of residues V54-I106, V54-V108, V57-I106 i V57-V108, using double mutant cycles.

9. Taken in together the results obtained from the characterization of the transition state of the RNase A using pressure as a denaturant, may suggest a pressure-folding pathway according to a nucleation-condensation mechanism for the main hydrophobic core of non-reduced RNase A.
10. Although the folding/unfolding way of the RNase A induced by pressure at 40°C is identical, following the kinetics of Y115W variant, which thermodynamic and structurally is very similar to wild-type protein, we observe a complex unfolding kinetic depending on temperature and pressure.

10.1- For the Y115W variant, at low temperatures and pressures lower than $P_{1/2}$, a positive pressure-jump results in two kinetic phases, the first one corresponds to a rapid unfolding conformational change and the second one to a energetic landscape adaptation associated to a slow conformational change, which can be attributed to a cis-trans isomerization of the native Asn113-Pro114 peptid bond.

10.2- At 50°C and pressures above $P_{1/2}$, only one kinetic phase is observed in positive pressure jumps as a consequence of the vanishing of the energetic barrier between U_{cis} and U_{trans} states, which provokes that the rates associated to a folding conformational change and to a isomerization of the Xaa-Pro bond are indistinguishable, for the techniques used.

10.3- A negative pressure jump, results always only in one kinetic phase, due to the rates associated to a folding conformational change and the isomerization of the Xaa-Pro bond are indistinguishable.

11. Glycerol seems to compensate temperature and pressure effects on the unfolding process, by decreasing the volume of the transition state via its reducing action on the hydration shell of the transition state.

BIBLIOGRAFIA GENERAL

1. Wu, H., *Studies on denaturation of proteins. A theory of denaturation*. Chinese J. Physiol., 1931. **5**: p. 321-341.
2. Kauzmann, W., *Some factors in the interpretation of protein denaturation*. Adv Protein Chem, 1959. **14**: p. 1-63.
3. Thornton, J.M., et al., *Protein folds, functions and evolution*. J Mol Biol, 1999. **293**(2): p. 333-42.
4. Anfinsen, C.B., *Principles that govern the folding of protein chains*. Science, 1973. **181**(96): p. 223-30.
5. Monod, J., *Le hasard et la nécessité, Le Seuil*, ed. Paris. 1976.
6. Levinthal, J.D. and H. Rubin, *Serum induced changes in the fine structure of primary chick embryo cultures*. Exp Cell Res, 1968. **52**(2): p. 667-72.
7. Wetlaufer, D.B., *Nucleation, rapid folding, and globular intrachain regions in proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. **70**(3): p. 697-701.
8. Karplus, M. and D.L. Weaver, *Protein-folding dynamics*. Nature, 1976. **260**(5550): p. 404-6.
9. Karplus, M. and D.L. Weaver, *Protein folding dynamics: the diffusion-collision model and experimental data*. Protein Sci, 1994. **3**(4): p. 650-68.
10. Karplus, M. and A. Sali, *Theoretical studies of protein folding and unfolding*. Curr Opin Struct Biol, 1995. **5**(1): p. 58-73.
11. Dill, K.A., et al., *Principles of protein folding--a perspective from simple exact models*. Protein Sci, 1995. **4**(4): p. 561-602.
12. Bryngelson, J.D. and P.G. Wolynes, *Spin glasses and the statistical mechanics of protein folding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(21): p. 7524-8.
13. Levitt, M. and A. Warshel, *Computer simulation of protein folding*. Nature, 1975. **253**(5494): p. 694-8.
14. Taketomi, H., F. Kano, and N. Go, *The effect of amino acid substitution on protein-folding and -unfolding transition studied by computer simulation*. Biopolymers, 1988. **27**(4): p. 527-59.
15. Godzik, A., J. Skolnick, and A. Kolinski, *Simulations of the folding pathway of triose phosphate isomerase-type alpha/beta barrel proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(7): p. 2629-33.
16. Sali, A., E. Shakhnovich, and M. Karplus, *How does a protein fold?* Nature, 1994. **369**(6477): p. 248-51.
17. Kolinski, A. and J. Skolnick, *Monte Carlo simulations of protein folding. I. Lattice model and interaction scheme*. Proteins, 1994. **18**(4): p. 338-52.
18. Daggett, V. and M. Levitt, *Protein unfolding pathways explored through molecular dynamics simulations*. J Mol Biol, 1993. **232**(2): p. 600-19.
19. Baldwin, R.L., *Intermediates in protein folding reactions and the mechanism of protein folding*. Annu Rev Biochem, 1975. **44**: p. 453-75.
20. Kim, P.S. and R.L. Baldwin, *Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding*. Annu Rev Biochem, 1982. **51**: p. 459-89.
21. Kim, P.S. and R.L. Baldwin, *Intermediates in the folding reactions of small proteins*. Annu Rev Biochem, 1990. **59**: p. 631-60.
22. Zimm, B.H. and J.K. Bragg, *Theory of the phase transition between helix and random coil polypeptide chains*. J. Chem. Phys., 1959. **31**: p. 526-535.
23. Lifson, S. and A. Roig, *On the theory of helix-coil transition in polypeptides*. J. Chem. Phys., 1961. **34**: p. 1963-1974.
24. Fersht, A.R., *Nucleation mechanisms in protein folding*. Curr Opin Struct Biol, 1997. **7**(1): p. 3-9.
25. Jaenicke, R., *Folding and association of proteins*. Prog Biophys Mol Biol, 1987. **49**(2-3): p. 117-237.

26. Ptitsyn, O.B. and A.A. Rashin, [*Self-organization of the myoglobin molecule*]. Dokl Akad Nauk SSSR, 1973. **213**(2): p. 473-5.
27. Wetlaufer, D.B. and S. Ristow, *Acquisition of three-dimensional structure of proteins*. Annu Rev Biochem, 1973. **42**: p. 135-58.
28. Janin, J., *The protein kingdom: a survey of the three-dimensional structure and evolution of globular proteins*. Bull. Inst. Pasteur Paris, 1979. **77**: p. 337-373.
29. Chothia, C., *Principles that determine the structure of proteins*. Annu Rev Biochem, 1984. **53**: p. 537-72.
30. Levitt, M. and C. Chothia, *Structural patterns in globular proteins*. Nature, 1976. **261**(5561): p. 552-8.
31. Dill, K.A., *Theory for the folding and stability of globular proteins*. Biochemistry, 1985. **24**(6): p. 1501-9.
32. Harrison, S.C. and R. Durbin, *Is there a single pathway for the folding of a polypeptide chain?* Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(12): p. 4028-30.
33. Ghelis, C., *Transient conformational states in proteins followed by differential labeling*. Biophys J, 1980. **32**(1): p. 503-14.
34. Yon, J.M., *Protein folding: concepts and perspectives*. Cell Mol Life Sci, 1997. **53**(7): p. 557-67.
35. Yon, J.M., *Protein folding: a perspective for biology, medicine and biotechnology*. Braz J Med Biol Res, 2001. **34**(4): p. 419-35.
36. Matouschek, A. and A.R. Fersht, *Protein engineering in analysis of protein folding pathways and stability*. Methods Enzymol, 1991. **202**: p. 82-112.
37. Ballery, N., et al., *Characterization of an intermediate in the folding pathway of phosphoglycerate kinase: chemical reactivity of genetically introduced cysteinyl residues during the folding process*. Biochemistry, 1993. **32**(2): p. 708-14.
38. Garcia, P., et al., *Evidence for residual structures in an unfolded form of yeast phosphoglycerate kinase*. Biochemistry, 1995. **34**(2): p. 397-404.
39. Wetlaufer, D.B., *Folding of protein fragments*. Adv Protein Chem, 1981. **34**: p. 61-92.
40. Pecorari, F., et al., *Structure and functional complementation of engineered fragments from yeast phosphoglycerate kinase*. Protein Eng, 1993. **6**(3): p. 313-25.
41. Kuwajima, K., *The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure*. Proteins, 1989. **6**(2): p. 87-103.
42. Ohgushi, M. and A. Wada, *'Molten-globule state': a compact form of globular proteins with mobile side-chains*. FEBS Lett, 1983. **164**(1): p. 21-4.
43. Ptitsyn, O.B., et al., *Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding*. FEBS Lett, 1990. **262**(1): p. 20-4.
44. Chaffotte, A.F., et al., *A possible initial folding intermediate: the C-terminal proteolytic domain of tryptophan synthase beta chains folds in less than 4 milliseconds into a condensed state with non-native-like secondary structure*. Biochemistry, 1992. **31**(17): p. 4303-8.
45. Goto, Y. and A.L. Fink, *Conformational states of beta-lactamase: molten-globule states at acidic and alkaline pH with high salt*. Biochemistry, 1989. **28**(3): p. 945-52.
46. Brems, D.N. and H.A. Havel, *Folding of bovine growth hormone is consistent with the molten globule hypothesis*. Proteins, 1989. **5**(1): p. 93-5.
47. Shiraki, K., K. Nishikawa, and Y. Goto, *Trifluoroethanol-induced stabilization of the alpha-helical structure of beta-lactoglobulin: implication for non-hierarchical protein folding*. J Mol Biol, 1995. **245**(2): p. 180-94.
48. Ptitsyn, O.B., *How does protein synthesis give rise to the 3D-structure?* FEBS Lett, 1991. **285**(2): p. 176-81.

49. Uversky, V.N. and O.B. Ptitsyn, "Partly folded" state, a new equilibrium state of protein molecules: four-state guanidinium chloride-induced unfolding of beta-lactamase at low temperature. *Biochemistry*, 1994. **33**(10): p. 2782-91.
50. Uversky, V.N. and O.B. Ptitsyn, Further evidence on the equilibrium "pre-molten globule state": four-state guanidinium chloride-induced unfolding of carbonic anhydrase B at low temperature. *J Mol Biol*, 1996. **255**(1): p. 215-28.
51. Jeng, M.F. and S.W. Englander, Stable submolecular folding units in a non-compact form of cytochrome c. *J Mol Biol*, 1991. **221**(3): p. 1045-61.
52. Fink, A.L., et al., Classification of acid denaturation of proteins: intermediates and unfolded states. *Biochemistry*, 1994. **33**(41): p. 12504-11.
53. Dobson, C.M., Characterization of protein folding intermediates. *Curr Opin Struct Biol*, 1991. **1**: p. 22-27.
54. Arai, M. and K. Kuwajima, Role of the molten globule state in protein folding. *Adv Protein Chem*, 2000. **53**: p. 209-82.
55. Ptitsyn, O.B., Molten globule and protein folding. *Adv Protein Chem*, 1995. **47**: p. 83-229.
56. Amir, D., S. Krausz, and E. Haas, Detection of local structures in reduced unfolded bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Proteins*, 1992. **13**(2): p. 162-73.
57. Shortle, D. and C. Abeygunawardana, NMR analysis of the residual structure in the denatured state of an unusual mutant of staphylococcal nuclease. *Structure*, 1993. **1**(2): p. 121-34.
58. Neri, D., et al., NMR determination of residual structure in a urea-denatured protein, the 434-repressor. *Science*, 1992. **257**(5076): p. 1559-63.
59. Plaxco, K.W. and C.M. Dobson, Time-resolved biophysical methods in the study of protein folding. *Curr Opin Struct Biol*, 1996. **6**(5): p. 630-6.
60. Regenfuss, P., et al., Mixing liquids in microseconds. *Rev Sci Instrum*, 1985. **56**: p. 283-290.
61. Takahashi, S., et al., Folding of cytochrome c initiated by submillisecond mixing. *Nat Struct Biol*, 1997. **4**(1): p. 44-50.
62. Nolting, B., R. Golbik, and A.R. Fersht, Submillisecond events in protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(23): p. 10668-72.
63. Ballew, R.M., J. Sabelko, and M. Gruebele, Direct observation of fast protein folding: the initial collapse of apomyoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(12): p. 5759-64.
64. Phillips, C.M., Y. Mizutani, and R.M. Hochstrasser, Ultrafast thermally induced unfolding of RNase A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(16): p. 7292-6.
65. Jones, C.M., et al., Fast events in protein folding initiated by nanosecond laser photolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(24): p. 11860-4.
66. Pascher, T., et al., Protein folding triggered by electron transfer. *Science*, 1996. **271**(5255): p. 1558-60.
67. Burton, R.E., et al., Microsecond protein folding through a compact transition state. *J Mol Biol*, 1996. **263**(2): p. 311-22.
68. Hagen, S.J., et al., Diffusion-limited contact formation in unfolded cytochrome c: estimating the maximum rate of protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(21): p. 11615-7.
69. McCammon, J.A., A speed limit for protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(21): p. 11426-7.
70. Matouschek, A., et al., Transient folding intermediates characterized by protein engineering. *Nature*, 1990. **346**(6283): p. 440-5.
71. Lecomte, J.T. and C.R. Matthews, Unraveling the mechanism of protein folding: new tricks for an old problem. *Protein Eng*, 1993. **6**(1): p. 1-10.
72. Levitt, M., Effect of proline residues on protein folding. *J Mol Biol*, 1981. **145**(1): p. 251-63.

73. Ghelis, C., M. Tempete-Gaillourdet, and J.M. Yon, *The folding of pancreatic elastase: independent domain refolding and inter-domain interaction*. Biochem Biophys Res Commun, 1978. **84**(1): p. 31-6.
74. Fersht, A.R., A. Matouschek, and L. Serrano, *The folding of an enzyme. I. Theory of protein engineering analysis of stability and pathway of protein folding*. J Mol Biol, 1992. **224**(3): p. 771-82.
75. Fersht, A.R., *Characterizing transition states in protein folding: an essential step in the puzzle*. Curr Opin Struct Biol, 1995. **5**(1): p. 79-84.
76. Matouschek, A., et al., *Mapping the transition state and pathway of protein folding by protein engineering*. Nature, 1989. **340**(6229): p. 122-6.
77. Raleigh, D.P. and K.W. Plaxco, *The protein folding transition state: what are Phi-values really telling us?* Protein Pept Lett, 2005. **12**(2): p. 117-22.
78. Vidugiris, G.J., J.L. Markley, and C.A. Royer, *Evidence for a molten globule-like transition state in protein folding from determination of activation volumes*. Biochemistry, 1995. **34**(15): p. 4909-12.
79. Woenckhaus, J., et al., *Pressure-jump small-angle x-ray scattering detected kinetics of staphylococcal nuclease folding*. Biophys J, 2001. **80**(3): p. 1518-23.
80. Mohana-Borges, R., et al., *Folding of a pressure-denatured model protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(14): p. 7888-93.
81. Tan, C.Y., et al., *Pressure equilibrium and jump study on unfolding of 23-kDa protein from spinach photosystem II*. Biophys J, 2005. **88**(2): p. 1264-75.
82. Pappenberger, G., et al., *Denaturant-induced movement of the transition state of protein folding revealed by high-pressure stopped-flow measurements*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(1): p. 17-22.
83. Panick, G. and R. Winter, *Pressure-induced unfolding/refolding of ribonuclease A: static and kinetic Fourier transform infrared spectroscopy study*. Biochemistry, 2000. **39**(7): p. 1862-9.
84. Jacob, M., et al., *Microsecond folding of the cold shock protein measured by a pressure-jump technique*. Biochemistry, 1999. **38**(10): p. 2882-91.
85. Perl, D., G. Holtermann, and F.X. Schmid, *Role of the chain termini for the folding transition state of the cold shock protein*. Biochemistry, 2001. **40**(51): p. 15501-11.
86. Wolynes, P.G., J.N. Onuchic, and D. Thirumalai, *Navigating the folding routes*. Science, 1995. **267**(5204): p. 1619-20.
87. Bryngelson, J.D., et al., *Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: a synthesis*. Proteins, 1995. **21**(3): p. 167-95.
88. Onuchic, J.N., et al., *The energy landscape theory of protein folding: insights into folding mechanisms and scenarios*. Adv Protein Chem, 2000. **53**: p. 87-152.
89. Onuchic, J.N., et al., *Toward an outline of the topography of a realistic protein-folding funnel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(8): p. 3626-30.
90. Dobson, C.M. and M. Karplus, *The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment*. Curr Opin Struct Biol, 1999. **9**(1): p. 92-101.
91. Baldwin, R.L., *Protein folding. Matching speed and stability*. Nature, 1994. **369**(6477): p. 183-4.
92. Dill, K.A. and H.S. Chan, *From Levinthal to pathways to funnels*. Nat Struct Biol, 1997. **4**(1): p. 10-9.
93. Onuchic, J.N., et al., *Protein folding funnels: the nature of the transition state ensemble*. Fold Des, 1996. **1**(6): p. 441-50.
94. Weber, G., *Effects of temperature and pressure on molecular associations and on single peptide chain proteins*, in *Protein Interactions*. 1992, Chapman and Hall. p. 199-215.
95. Silva, J.L., et al., *The use of hydrostatic pressure as a tool to study viruses and other macromolecular assemblages*. Curr Opin Struct Biol, 1996. **6**(2): p. 166-75.

96. Heremans, K., *The phase diagram and the pressure-temperature behavior of proteins*, in *High Pressure Molecular Science*, J. Jonas and R. Winter, Editors. 1999, Kluwer Academic Publishers. p. 437-472.
97. Harpaz, Y., M. Gerstein, and C. Chothia, *Volume changes on protein folding*. *Structure*, 1994. **2**(7): p. 641-9.
98. Foguel, D. and J.L. Silva, *Cold denaturation of a repressor-operator complex: the role of entropy in protein-DNA recognition*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(17): p. 8244-7.
99. Oliveira, A.C., et al., *Arc repressor will not denature under pressure in the absence of water*. *J Mol Biol*, 1994. **240**(3): p. 184-7.
100. Hummer, G., et al., *The pressure dependence of hydrophobic interactions is consistent with the observed pressure denaturation of proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(4): p. 1552-5.
101. Hillson, N., J.N. Onuchic, and A.E. Garcia, *Pressure-induced protein-folding/unfolding kinetics*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(26): p. 14848-53.
102. Eriksson, A.E., et al., *Response of a protein structure to cavity-creating mutations and its relation to the hydrophobic effect*. *Science*, 1992. **255**(5041): p. 178-83.
103. Fleming, P.J. and F.M. Richards, *Protein packing: dependence on protein size, secondary structure and amino acid composition*. *J Mol Biol*, 2000. **299**(2): p. 487-98.
104. Frye, K.J. and C.A. Royer, *Probing the contribution of internal cavities to the volume change of protein unfolding under pressure*. *Protein Sci*, 1998. **7**(10): p. 2217-22.
105. Kuwata, K., et al., *High pressure NMR reveals a variety of fluctuating conformers in beta-lactoglobulin*. *J Mol Biol*, 2001. **305**(5): p. 1073-83.
106. Fuentes, E.J. and A.J. Wand, *Local stability and dynamics of apocytochrome b562 examined by the dependence of hydrogen exchange on hydrostatic pressure*. *Biochemistry*, 1998. **37**(28): p. 9877-83.
107. Royer, C.A., *Pressure denaturation of proteins*, in *High Pressure Molecular Science*, J. Jonas and R. Winter, Editors. 1999, Kluwer Academic Publishers. p. 473-496.
108. Silva, J.L., et al., *Dissociation of a native dimer to a molten globule monomer. Effects of pressure and dilution on the association equilibrium of arc repressor*. *J Mol Biol*, 1992. **223**(2): p. 545-55.
109. Peng, X., J. Jonas, and J.L. Silva, *Molten-globule conformation of Arc repressor monomers determined by high-pressure ¹H NMR spectroscopy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(5): p. 1776-80.
110. Panick, G., et al., *Structural characterization of the pressure-denatured state and unfolding/refolding kinetics of staphylococcal nuclease by synchrotron small-angle X-ray scattering and Fourier-transform infrared spectroscopy*. *J Mol Biol*, 1998. **275**(2): p. 389-402.
111. Prehoda, K.E., *High pressure effects on protein structure*, in *Protein Dynamics, Function and Design*, J.-F. Lefèvre and R.E. Holbrook, Editors. 1998, Plenum. p. 59-86.
112. Pryse, K.M., et al., *Kinetics and mechanism of the folding of cytochrome c*. *Biochemistry*, 1992. **31**(22): p. 5127-36.
113. Dinner, A.R., et al., *Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment*. *Trends Biochem Sci*, 2000. **25**(7): p. 331-9.
114. Nash, D.P. and J. Jonas, *Structure of pressure-assisted cold denatured lysozyme and comparison with lysozyme folding intermediates*. *Biochemistry*, 1997. **36**(47): p. 14375-83.
115. Inoue, K., et al., *Pressure-induced local unfolding of the Ras binding domain of RalGDS*. *Nat Struct Biol*, 2000. **7**(7): p. 547-50.
116. Kitahara, R., et al., *High pressure NMR reveals active-site hinge motion of folate-bound Escherichia coli dihydrofolate reductase*. *Biochemistry*, 2000. **39**(42): p. 12789-95.

117. Lima, L.M., D. Foguel, and J.L. Silva, *DNA tightens the dimeric DNA-binding domain of human papillomavirus E2 protein without changes in volume*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14289-94.
118. Ruan, K., et al., *Fluorescence and FTIR study of the pressure-induced denaturation of bovine pancreas trypsin*. Eur J Biochem, 1999. **265**(1): p. 79-85.
119. Tanford, C., *Protein denaturation*. Adv Protein Chem, 1968. **23**: p. 121-282.
120. Bridgman, P.W., *The coagulation of albumen by pressure*. J. Biol. Chem., 1914. **19**: p. 511-512.
121. Balny, C., P. Masson, and K. Heremans, *High pressure effects on biological macromolecules: from structural changes to alteration of cellular processes*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1595**(1-2): p. 3-10.
122. Nogués, *Pancreatic Ribonucleases*, in *Ribonucleases: Structures and Function*, G. D'Alessio and J.F. Riordan, Editors. 1997, Academic Press: New York. p. 271-304.
123. Neira, J.L. and M. Rico, *Folding studies on ribonuclease A, a model protein*. Fold Des, 1997. **2**(1): p. R1-11.
124. Raines, R.T., *Ribonuclease A*. Chem Rev, 1998. **98**(3): p. 1045-1066.
125. Chatani, E. and R. Hayashi, *Functional and Structural Roles of Constituent Amino Acid Residues of Bovine Pancreatic Ribonuclease A*. Journal of Bioscience and bioengineering, 2001. **92**(2): p. 98-107.
126. Wlodawer, A. and L. Sjolín, *Structure of ribonuclease A: results of joint neutron and X-ray refinement at 2.0-Å resolution*. Biochemistry, 1983. **22**(11): p. 2720-8.
127. Wlodawer, A., et al., *Structure of phosphate-free ribonuclease A refined at 1.26 Å*. Biochemistry, 1988. **27**(8): p. 2705-17.
128. Rico, M., et al., *3D structure of bovine pancreatic ribonuclease A in aqueous solution: an approach to tertiary structure determination from a small basis of 1H NMR NOE correlations*. J Biomol NMR, 1991. **1**(3): p. 283-98.
129. Santoro, J., et al., *High-resolution three-dimensional structure of ribonuclease A in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy*. J Mol Biol, 1993. **229**(3): p. 722-34.
130. Kim, E.E., et al., *Refinement of the crystal structure of ribonuclease S. Comparison with and between the various ribonuclease A structures*. Biochemistry, 1992. **31**(49): p. 12304-14.
131. Catanzano, F., et al., *Temperature-induced denaturation of ribonuclease S: a thermodynamic study*. Biochemistry, 1996. **35**(41): p. 13378-85.
132. Neira, J.L., et al., *Hydrogen exchange in ribonuclease A and ribonuclease S: evidence for residual structure in the unfolded state under native conditions*. J Mol Biol, 1999. **285**(2): p. 627-43.
133. Chakshusmathi, G., et al., *Native-state hydrogen-exchange studies of a fragment complex can provide structural information about the isolated fragments*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(14): p. 7899-904.
134. Koradi, R., M. Billeter, and K. Wuthrich, *MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures*. J Mol Graph, 1996. **14**(1): p. 51-5, 29-32.
135. Laskowski, R.A., et al., *PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures*. J. Appl. Cryst., 1993. **26**: p. 283-291.
136. Zhang, J., et al., *NMR study of the cold, heat, and pressure unfolding of ribonuclease A*. Biochemistry, 1995. **34**(27): p. 8631-41.
137. Nash, D., B.S. Lee, and J. Jonas, *Hydrogen-exchange kinetics in the cold denatured state of ribonuclease A*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1297**(1): p. 40-8.
138. Torrent, J., et al., *Pressure versus temperature unfolding of ribonuclease A: an FTIR spectroscopic characterization of 10 variants at the carboxy-terminal site*. Protein Sci, 2001. **10**(4): p. 725-34.

139. Takeda, N., M. Kato, and Y. Taniguchi, *Pressure- and thermally-induced reversible changes in the secondary structure of ribonuclease A studied by FT-IR spectroscopy*. *Biochemistry*, 1995. **34**(17): p. 5980-7.
140. Takeda, N., M. Kato, and Y. Taniguchi, *Pressure-induced secondary structure changes of ribonuclease A and ribonuclease S studied by FTIR spectroscopy*. *Biospectroscopy*, 1995. **1**(3): p. 207-216.
141. Torrent, J., et al., *Pressure versus heat-induced unfolding of ribonuclease A: the case of hydrophobic interactions within a chain-folding initiation site*. *Biochemistry*, 1999. **38**(48): p. 15952-61.
142. Gill, S.J. and R.L. Glogovsky, *Influence Of Pressure On The Reversible Unfolding Or Ribonuclease And Poly-Gamma-L-Glutamate*. *J Phys Chem*, 1965. **469**: p. 1515-9.
143. Brandts, J.F., R.J. Oliveira, and C. Westort, *Thermodynamics of protein denaturation. Effect of pressure on the denaturation of ribonuclease A*. *Biochemistry*, 1970. **9**(4): p. 1038-47.
144. Yamaguchi, T., H. Yamada, and K. Akasaka, *Thermodynamics of unfolding of ribonuclease A under high pressure. A study by proton NMR*. *J Mol Biol*, 1995. **250**(5): p. 689-94.
145. Chatani, E., et al., *Comparison of heat- and pressure-induced unfolding of ribonuclease a: the critical role of Phe46 which appears to belong to a new hydrophobic chain-folding initiation site*. *Biochemistry*, 2002. **41**(14): p. 4567-74.
146. Royer, C.A., *Revisiting volume changes in pressure-induced protein unfolding*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1595**(1-2): p. 201-9.
147. Hawley, S.A., *Reversible pressure--temperature denaturation of chymotrypsinogen*. *Biochemistry*, 1971. **10**(13): p. 2436-42.
148. Frye, K.J., C.S. Perman, and C.A. Royer, *Testing the correlation between delta A and delta V of protein unfolding using m value mutants of staphylococcal nuclease*. *Biochemistry*, 1996. **35**(31): p. 10234-9.
149. Heremans, K., *High pressure effects on proteins and other biomolecules*. *Annu Rev Biophys Bioeng*, 1982. **11**: p. 1-21.
150. Royer, C.A., et al., *Effects of amino acid substitutions on the pressure denaturation of staphylococcal nuclease as monitored by fluorescence and nuclear magnetic resonance spectroscopy*. *Biochemistry*, 1993. **32**(19): p. 5222-32.
151. Shin, H.C., et al., *Role of the [65-72] disulfide bond in oxidative folding of bovine pancreatic ribonuclease A*. *Biochemistry*, 2003. **42**(39): p. 11514-9.
152. Bhat, R., W.J. Wedemeyer, and H.A. Scheraga, *Proline isomerization in bovine pancreatic ribonuclease A. 2. Folding conditions*. *Biochemistry*, 2003. **42**(19): p. 5722-8.
153. Matheson, R.R. and H.A. Scheraga, *A Method for Predicting Nucleation Sites for Protein Folding Based on Hydrophobic Contacts*. *Macromolecules*, 1978. **11**: p. 819.
154. Beals, J.M., et al., *Conformational studies of a peptide corresponding to a region of the C-terminus of ribonuclease A: implications as a potential chain-folding initiation site*. *Biochemistry*, 1991. **30**(31): p. 7680-92.
155. Coll, M.G., et al., *Valine 108, a chain-folding initiation site-belonging residue, crucial for the ribonuclease A stability*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **265**(2): p. 356-60.
156. Kolbanovskaya, E.Y., et al., *Localization and analysis of nonpolar regions in onconase*. *Cell Mol Life Sci*, 2000. **57**(8-9): p. 1306-16.
157. Jackson, S.E., et al., *Effect of cavity-creating mutations in the hydrophobic core of chymotrypsin inhibitor 2*. *Biochemistry*, 1993. **32**(42): p. 11259-69.
158. Pace, C.N., et al., *Forces contributing to the conformational stability of proteins*. *Faseb J*, 1996. **10**(1): p. 75-83.
159. Serrano, L., et al., *The folding of an enzyme. II. Substructure of barnase and the contribution of different interactions to protein stability*. *J Mol Biol*, 1992. **224**(3): p. 783-804.

160. Finucane, M.D. and D.N. Woolfson, *Core-directed protein design. II. Rescue of a multiply mutated and destabilized variant of ubiquitin*. *Biochemistry*, 1999. **38**(36): p. 11613-23.
161. Koshi, J.M. and R.A. Goldstein, *Mutation matrices and physical-chemical properties: correlations and implications*. *Proteins*, 1997. **27**(3): p. 336-44.
162. Fitch, W.M. and J.J. Beintema, *Correcting parsimonious trees for unseen nucleotide substitutions: the effect of dense branching as exemplified by ribonuclease*. *Mol Biol Evol*, 1990. **7**(5): p. 438-43.
163. Chen, J., et al., *Proteins with simplified hydrophobic cores compared to other packing mutants*. *Biophys Chem*, 2004. **110**(3): p. 239-48.
164. Chen, J. and W.E. Stites, *Packing is a key selection factor in the evolution of protein hydrophobic cores*. *Biochemistry*, 2001. **40**(50): p. 15280-9.
165. Di Nardo, A.A., S.M. Larson, and A.R. Davidson, *The relationship between conservation, thermodynamic stability, and function in the SH3 domain hydrophobic core*. *J Mol Biol*, 2003. **333**(3): p. 641-55.
166. DeLano, W.L., *The Pymol Molecular Graphics System*. 2002, DeLano scientific LLC: San Carlos, CA, USA. p. The Pymol Molecular Graphics System.
167. Perrett, S. and J.M. Zhou, *Expanding the pressure technique: insights into protein folding from combined use of pressure and chemical denaturants*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1595**(1-2): p. 210-23.
168. Hammond, G.S., *A correlation of reaction rates*. *J. Am. Chem. Soc.*, 1955. **77**: p. 334-338.
169. Mozhaev, V.V., N. Bec, and C. Balny, *Pressure effects on enzyme reactions in mainly organic media: alpha-chymotrypsin in reversed micelles of Aerosol OT in octane*. *Biochem Mol Biol Int*, 1994. **34**(1): p. 191-9.
170. Udgaonkar, J.B. and R.L. Baldwin, *Early folding intermediate of ribonuclease A*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(21): p. 8197-201.
171. Juminaga, D., W.J. Wedemeyer, and H.A. Scheraga, *Proline isomerization in bovine pancreatic ribonuclease A. I. Unfolding conditions*. *Biochemistry*, 1998. **37**(33): p. 11614-20.
172. Wedemeyer, W.J., E. Welker, and H.A. Scheraga, *Proline cis-trans isomerization and protein folding*. *Biochemistry*, 2002. **41**(50): p. 14637-44.
173. Schultz, D.A. and R.L. Baldwin, *Cis proline mutants of ribonuclease A. I. Thermal stability*. *Protein Sci*, 1992. **1**(7): p. 910-6.
174. Xiong, Y., et al., *Solution NMR evidence for a cis Tyr-Ala peptide group in the structure of [Pro93Ala] bovine pancreatic ribonuclease A*. *Protein Sci*, 2000. **9**(2): p. 421-6.
175. Pearson, M.A., et al., *Crystal structures of two mutants that have implications for the folding of bovine pancreatic ribonuclease A*. *Protein Sci*, 1998. **7**(5): p. 1255-8.
176. Juminaga, D., et al., *Tyrosyl interactions in the folding and unfolding of bovine pancreatic ribonuclease A: a study of tyrosine-to-phenylalanine mutants*. *Biochemistry*, 1997. **36**(33): p. 10131-45.
177. Dodge, R.W. and H.A. Scheraga, *Folding and unfolding kinetics of the proline-to-alanine mutants of bovine pancreatic ribonuclease A*. *Biochemistry*, 1996. **35**(5): p. 1548-59.
178. Houry, W.A. and H.A. Scheraga, *Nature of the unfolded state of ribonuclease A: effect of cis-trans X-Pro peptide bond isomerization*. *Biochemistry*, 1996. **35**(36): p. 11719-33.
179. Pincus, M.R., et al., *Cis trans isomerization of proline in the peptide (His 105 Val 124) of ribonuclease A containing the primary nucleation site*. *J Protein Chem*, 1983. **2**: p. 131-146.
180. Font, J., et al., *Pressure- and temperature- induced unfolding studies: thermodynamics of core hydrophobicity and packing of ribonuclease A*. *Biol. Chem.*, 2005. **In press**.
181. Torrent, J., et al., *The use of pressure-jump relaxation kinetics to study protein folding landscapes*. *Biochim Biophys Acta.*, 2006. **In press**.

APÈNDIX

Material i mètodes

(Les cites bibliogràfiques d'aquest apartat estan recollides en l'apartat de bibliografia general)

Estudi del desplegament i replegament de la RNasa A

Quan una proteïna es desplega s'altera l'entorn polar dels seus residus aromàtics i aquest fet provoca un canvi en les propietats òptiques de la proteïna. Aquesta característica proporciona un sistema senzill per estudiar els canvis estructurals en les proteïnes induïts per algun agent desnaturalitzant. En aquest estudi s'ha utilitzat la temperatura i la pressió com a agents desnaturalitzants.

Els efectes provocats per un agent desnaturalitzant sobre les proteïnes responen al principi de "le Chatelier", on un sistema en equilibri tendeix a minimitzar els efectes d'una pertorbació externa a la qual és sotmès. Així doncs, un augment de temperatura provoca un increment de l'energia del sistema mentre que un augment de pressió provoca una disminució del volum del sistema.

La temperatura, a causa de l'agitació tèrmica, tendeix a disminuir el grau d'organització molecular d'una substància. Amb la pressió es poden separar els efectes dels canvis de volum i d'energia tèrmica, que apareixen simultanis amb la temperatura. Processos que alteren el volum del sistema són molt sensibles a la pressió. En les proteïnes doncs, l'efecte de la temperatura o de la pressió es tradueix en un desplegament d'aquestes provocat pel trencament de certs enllaços tal i com es mostra en la taula a1.1.

Taula a1.1

Interaccions hidrofòbiques			
Si temperatura	↗	, interaccions	↗
Si pressió	↗	, interaccions	↘
Interaccions electrostàtiques			
Si temperatura	↗	, interaccions	↘
Si pressió	↗	, interaccions	↘
Interaccions per ponts d'hidrogen			
Si temperatura	↗	, interaccions	↘
Si pressió	↗	, interaccions	↗

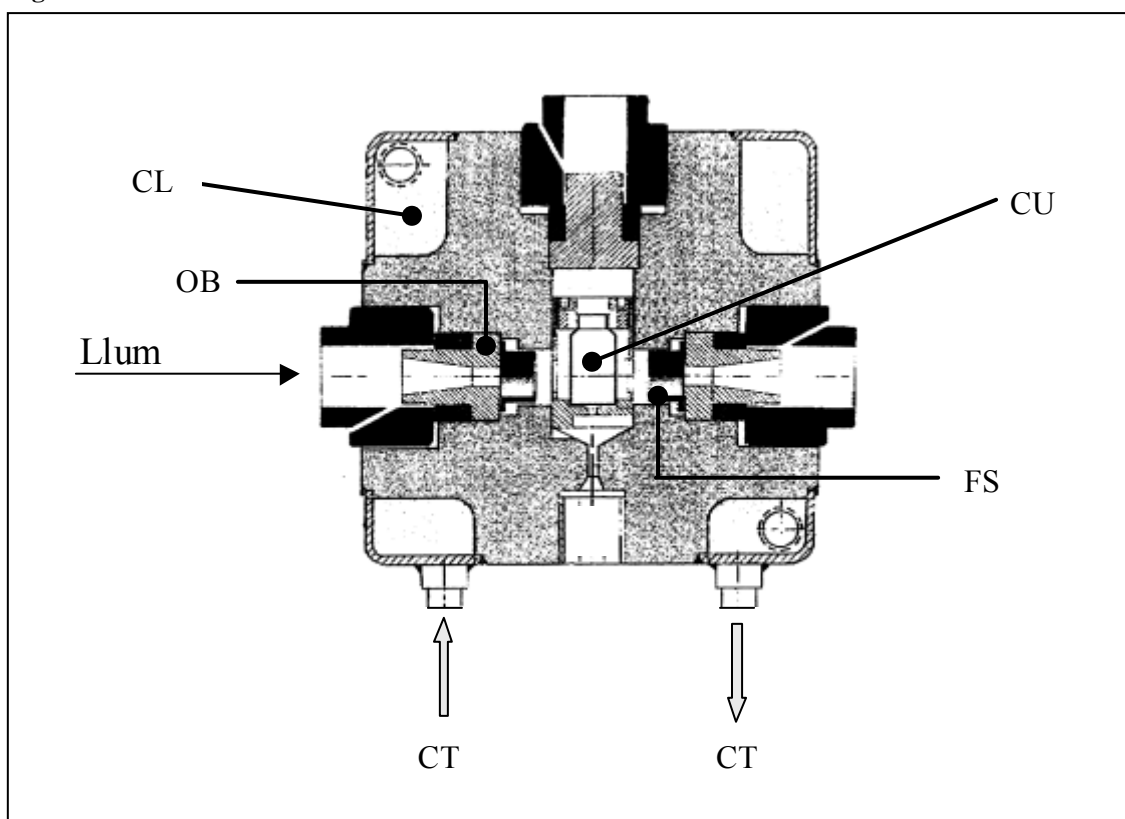
Efectes de la temperatura i la pressió sobre les interaccions no-covalents que estableixen les proteïnes.

Estudi del desplegament/replegament proteic a l'equilibri

Equipament

Pels experiments de pressió, es va instal·lar una cel·la d'alta pressió (0.1 – 700 MPa) (figura a1.1) dins de la cambra de cubetes d'un espectrofotòmetre CARY 3E (Varian, Palo Alto CA, USA) o d'un fluorímetre SLM-AMINCO model Aminco Bowman Series 2.

Figura a1.1



Representació d'una cel·la d'alta pressió. CT= Connexions al bany termostàtic; FS= Finestres de safir; OB= Obturadors; CL= Coberta per on circula el líquid del bany termostàtic; CU= Cubeta.

Aquesta cel·la ha estat dissenyada a l'INSERM U128 (França) i fabricada per l'S.O.F.O.P. (França) mitjançant un acer especial Marval X12 i unes finestres òptiques de safir sintètic. La carcassa central es troba embolcada per una coberta del mateix acer per on circula un líquid (aigua o alcohol), que prové d'un bany termostàtic NESLAB model RTE101D (França), per tal d'equilibrar la mostra a la temperatura desitjada.

La mostra es disposa dins d'una cubeta de quars cilíndrica. La cubeta se segella amb una pel·lícula de polietilè Dura-Seal que es manté posicionada, obturant l'obertura de la cubeta, per mitjà d'una anella de cautxú. Aquesta pel·lícula permet la transmissió de la pressió a l'interior de la cubeta. La pressió es genera mitjançant una bomba

manual i es controla per mitjà d'unes aixetes o comportes fabricades per NOVA model NW1.6 (Suïssa). L'aigua, com a transmissor de la pressió, és conduïda a través de tubs capil·lars d'acer inoxidable amb un diàmetre interior de 0.2 mm. La pressió de treball es mesura per mitjà d'un indicador digital de NEWPORT ELECTRONIQUE model Infcp (França).

Pel que fa a la cel·la per dur a terme els experiments de desnaturalització induïda per temperatura, es va emprar la cel·la termostatitzada que disposa el propi aparell, un espectrofotòmetre Lambda Bio 20 (Perkin elmer, Boston MA, USA)

Espectroscòpia d'absorció en l'ultraviolat

S'utilitzen diferents tècniques alhora de seguir el desplegament proteic per absorbància en l'ultraviolat. El mètode utilitzat tradicionalment, ha estat el seguiment de l'espectre d'absorció en l'ultraviolat entre 250 i 310 nm, el qual implica una sèrie de lectures que requereixen un tractament més específic i més laboriós, utilitzant la quarta derivada per tal de millorar la resolució dels espectres. El mètode utilitzat en aquest treball ha estat el seguiment de l'absorció a una longitud d'ona més concreta, com és a 287 nm, aquest mètode ens permet una anàlisi més ràpida i més senzilla sense cap pèrdua d'informació. S'ha escollit aquesta longitud d'ona per ser el pic d'absorció més important en l'espectre de la RNasa A i el punt on la diferència d'absorció entre l'estat plegat i desplegat és major.

Desnaturalització per temperatura i pressió

S'ha treballat sempre a una concentració de proteïna entre 0,5 i 0,8 mg/ml per la temperatura i entre 0.8 i 1 mg/ml per la pressió (la concentració és poc important, ja que es tracta d'un procés unimolecular i les corbes a diferents concentracions haurien de ser superposables) utilitzant acetat sòdic 50 mM pH 5.0 o MES 50 mM pH 5.0 com a amortidors, per la temperatura i la pressió respectivament, emprant cubetes de quars de 1 cm de pas de llum. Aquests amortidors s'han escollit donat que els seus valors de pKa no canvien significativament en funció de la temperatura o pressió. Els espectres d'absorció dels experiments de pressió es van enregistrar a 40°C, majoritàriament, mentre que els de temperatura es van enregistrar a 0,1 MPa. En el cas de temperatura s'ha utilitzat un espectrofotòmetre Lambda Bio 20, amb cambra de cubetes

termostatitzada per un bany d'aigua. Per la pressió s'ha utilitzat un espectrofotòmetre CARY 3E equipat amb una cel·la d'alta pressió.

Processament de les dades en els experiments de temperatura

Per analitzar el seguiment a una longitud d'ona determinada, on s'obtenen una sèrie de punts i després de corregir cadascuna de les lectures pels efectes de la temperatura en el volum de l'aigua (Gibson i Loeffler, 1941), cal ajustar-hi una corba. En aquest cas les dades obtingudes s'han ajustat a la corba sigmoide (1).

$$Abs = \frac{n-d+(q-m) \cdot t}{1+e^{-((\Delta H_m/R) \cdot ((1/(t+273.15)) - (1/(T_{1/2} + 273.15))) - (\Delta C_p/R) \cdot ((T_{1/2} + 273.15)/(t+273.15)) - d + (m \cdot t))}} \quad (1)$$

R = Constant dels gasos en J/K·mol

ΔC_p = Capacitat calorífica en KJ/K·mol

n = Punt de tall de la pre-transició

d = Punt de tall de la post-transició

q = Pendent pre-transició

m = Pendent post-transició

$T_{1/2}$ = Temperatura de fusió en °C

t = Temperatura (°C)

ΔH_m = Canvi d'entalpia a la temperatura de fusió

Els paràmetres termodinàmics ΔG , ΔH derivats de les corbes de desnaturalització induïdes per temperatura s'han determinat per mitjà de l'equació 2.

$$\Delta G = \Delta H_m(1 - (t/T_{1/2})) - \Delta C_p((T_{1/2} - t) + t \ln(t/T_{1/2})) \quad (2)$$

On ΔG és el canvi d'energia lliure de Gibbs de desplegament en kJ/mol, ΔH_m és el canvi d'entalpia en J, t és la temperatura en °K i $T_{1/2}$ és la temperatura de fusió en °K, ΔC_p és el canvi en la capacitat calorífica en kJ/K mol

Processament de les dades per els experiments de pressió

Per analitzar el seguiment a una longitud d'ona determinada, on s'obtenen una sèrie de punts, i després de corregir cadascuna de les lectures pels efectes de la pressió en el volum de l'aigua (Kell, 1973), cal ajustar-hi una corba. Les dades obtingudes s'han ajustat, igual que els experiments amb temperatura, a una corba sigmoide. Aquesta equació (3) té certes modificacions respecte a la mostrada anteriorment:

$$\text{Abs} = \frac{n-d-(q-m) \cdot P}{1 + e^{-((\Delta G - \Delta V \cdot P)/(R_p \cdot T))}} + d - (m \cdot P) \quad (3)$$

R_p = Constant dels gasos en MPa/K·mol

n = Punt de tall de la pre-transició

d = Punt de tall de la post-transició

q = Pendent pre-transició

m = Pendent post-transició

T = Temperatura de l'experiment en °K

P = Pressió en MPa

ΔV = Canvi de volum del sistema de desplegament en ml/mol

ΔG = Canvi en energia lliure de Gibbs de desplegament J/mol

Espectroscòpia de fluorescència sota alta pressió

Les mesures de fluorescència s'han portat a terme utilitzant un espectrofotòmetre de fluorescència Aminco Bowman series 2 (SLM Aminco, Foster City CA, USA) modificat per acomodar una cambra òptica d'alta pressió termostatitzada, permeten mesures fins a 700 MPa. La proteïna liofilitzada es va dissoldre a una concentració de 0.25 mg/ml en tampó MES 50 mM a pH 5.0, i filtrada utilitzant un filtre de 0.22 µm. Es va seleccionar aquest tampó per la seva dependència relativa del pH en front de la pressió. La solució de proteïna es va introduir en una cubeta de quars de 5 mm de diàmetre, segellada amb una pel·lícula de polietilè Dura-Sel que es manté posicionada, obturant l'obertura de la cubeta, per mitjà d'una anella de cautxú.

Per els estudis a l'equilibri, la fluorescència del triptòfan es va mesurar excitant a 290 nm utilitzant una amplada de banda de 8 nm i enregistrant l'emissió entre 310 i 440 nm amb una amplada de banda de 4 nm. Després de la correcció dels espectres per pressió i per la línia base, es va calcular la intensitat de fluorescència total entre les dues longitud d'ona, per seguir els processos de desplegament/replegament com a funció de l'increment/decrement de pressió, respectivament.

Processament de les dades

Seguint cada increment/decrement de pressió (passos de 20 MPa), es va observar que la fluorescència de la proteïna s'equilibrava correctament amb una pausa de 5 min abans de cada lectura. La intensitat total dels perfils de fluorescència a l'equilibri en front de la pressió es van ajustar a una corba sigmoide (4).

$$I = \frac{I_f - I_u}{1 + e^{-[(\Delta G + p\Delta V)/RT]}} + I_u \quad (4)$$

On I_f , I_u i I són les intensitats de fluorescència de l'estat plegat, desplegat i la intensitat de fluorescència observada a pressió p (MPa), respectivament. ΔG i ΔV són els canvis en energia lliure i volum del desplegament a 0,1 MPa en J/mol i ml/mol, respectivament.

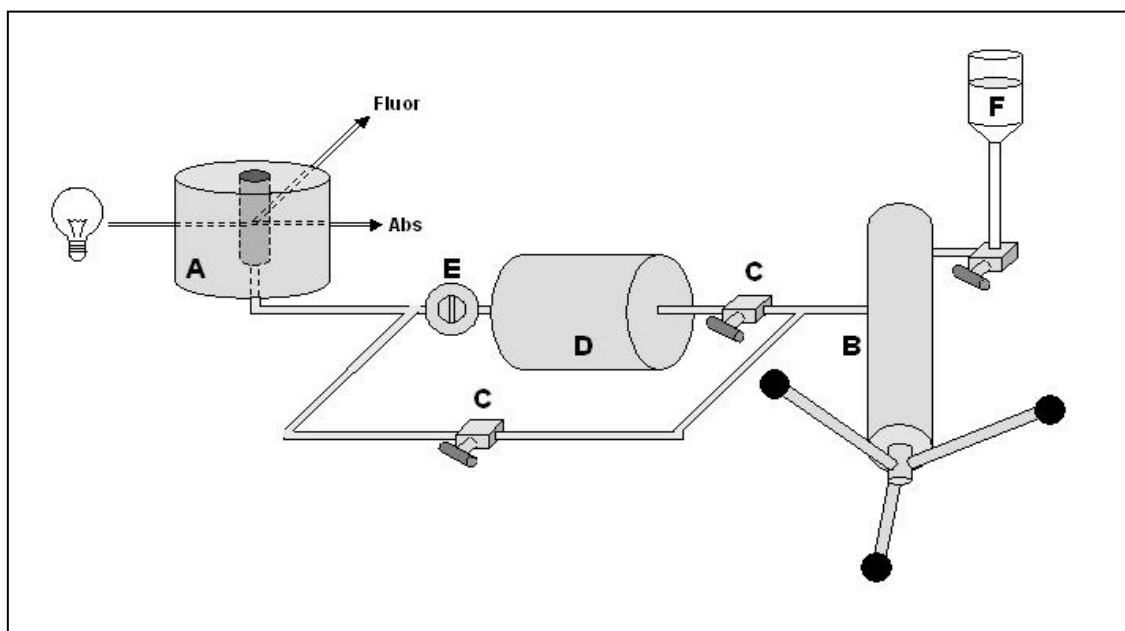
Estudi de les cinètiques de desplegament/replegament proteic utilitzant la tècnica dels salts de pressió.

Equipament

El principi experimental dels salts de pressió és senzill i es mostra de manera esquemàtica en la figura a1.2. S'utilitzen dues cel·les de pressió independents. Es pressuritzen via dos circuits diferents mitjançant un bomba de pistó manual i utilitzant aigua com a vector conductor de pressió. Les cel·les estan fabricades mitjançant un acer especial Marval X12 de Aubert i Duval (Neuilly sur seine, França) permeten experiments fins a 700 MPa. La pressió d'aquestes dues cel·les es controla a partir d'indicadors de pressió (Top Industrie, França). Una de les dues cel·les està termostatitzada (cel·la A). Aquesta conté la mostra i està equipada amb unes finestres de safir de 8 mm d'espessor. És la cel·la que substitueix el compartiment de la mostra en l'espectrofluorímetre (SLM Series 2, Aminco Bowman). La mostra es col·loca a l'interior d'una cubeta de quars cilíndrica, segellada amb una pel·lícula de polietilè. La cubeta es troba submergida en aigua. L'altra cel·la és òpticament cega i serveix com a reservori de pressió. Els salts de pressió s'inicien obrint una vàlvula pneumàtica col·locada entre les dues cel·les. Diferents controls experimentals han mostrat que l'equilibratge de la pressió entre les dues cel·les s'assoleix en un temps de menys de 5ms després de la obertura de la vàlvula.

El canvi de temperatura adiabàtica associat als salts de pressió no excedeix de 0.4°C, després de 20 s, la amplitud del canvi de temperatura disminueix a 0.2°C, i després de 50 s, es recupera la temperatura inicial.

Figura a1.2



Esquema del sistema de salts de pressió. Primer, s'estableix una pressió concreta a la cel·la d'alta pressió (A) utilitzant una bomba de pressió manual (B). Després, a través de les vlvules de pressió (obert/tancat) (C) i incrementant o disminuint la pressió en el reservori de pressió (D), es poden establir 2 circuits independents separats per una vlvula pneumtica controlada elctricament (E), els quals es poden mantenir a pressions diferents. D'aquesta manera, es produeix un salt de pressió al obrir rpidament la vlvula E, resultant en un equilibri de pressió rpid entre els dos reservoris (A and D) amb 5ms. El tanc d'aigua (F) es utilitza per omplir el sistema amb aigua [181].

Per els estudis cinètics, la intensitat de fluorescència de triptòfan es va enregistrar a 350 nm (amb una amplada de banda de 16 nm) i excitant a 290 nm utilitzant una amplada de banda de 4 nm per tal de minimitzar l'efecte del photo-bleaching. S'han realitzat salts de pressió de 40 MPa aproximadament.

Processament de les dades

Els perfils de relaxació de la reacció de desplegament/replegament, després de cada salt de pressió, es van ajustar a una exponencial senzilla i quan va ser necessari a una exponencial doble, d'acord amb les equacions (5) i (6)

$$I(t) = I_0 + A (1 - e^{-k_{obs} t}) \quad (5)$$

$$I(t) = I_0 + A (1 - e^{-k_{obs(1)} t}) + B (1 - e^{-k_{obs(2)} t}) \quad (6)$$

On $I(t)$ i I_0 corresponen a les intensitats de fluorescència a temps t i a temps 0 respectivament. A i B , són les amplituds de les fases, k_{obs} és la constant de velocitat mesurada a la pressió final p . els paràmetres cinètics termodinàmics d'activació es van determinar a partir de les exponencials simples tant

per els salts de pressió positius com per els negatius, en el cas de la exponencials dobles , es va utilitzar només la constant de velocitat de la fase ràpida.

D'acord amb una reacció en dos estats, la constant de velocitat mesurada a una pressió donada p és igual a la suma de les constants de velocitat microscòpiques pel desplegament $k_u(p)$ i pel replegament $k_f(p)$

$$k_{obs} = k_{obs}(p) = k_u(p) + k_f(p) \quad (7)$$

$$K(p) = \exp(-(\Delta G + p\Delta V) / RT) = k_u(p) / k_f(p) \quad (8)$$

On $K(p)$ és la constant d'equilibri a pressió p , ΔG i ΔV són els canvis en energia lliure i volum del desplegament obtinguts dels experiments a l'equilibri i p és la pressió final de cada salt.

Els ajustos lineals de $\ln k_f$ i $\ln k_u$ en front de la pressió final de cada salt permet calcular ΔV_f^\ddagger i ΔV_u^\ddagger , els volums d'activació per plegament i desplegament, respectivament, d'acord amb les equacions (9) i (10)

$$\ln k_u = -p (\Delta V_u^\ddagger / RpT) + \ln k_{u(0.1MPa)} \quad (9)$$

$$\ln k_f = -p (\Delta V_f^\ddagger / RpT) + \ln k_{f(0.1MPa)} \quad (10)$$

Aquestes equacions també ens permeten calcular els valors de ΔG_f^\ddagger i ΔG_u^\ddagger , l'energia lliure d'activació per el plegament i el desplegament, respectivament, d'acord amb les equacions (11) i (12):

$$\Delta G_f^\ddagger = -RpT (\ln k_{f(0.1MPa)}) + RpT (\ln B)$$

$$\Delta G_u^\ddagger = -RpT (\ln k_{u(0.1MPa)}) + RpT (\ln B)$$

$$B = k_B T / h$$

Rp = Constant dels gasos en MPa/K·mol

T = Temperatura de l'experiment en °K

k_B = Constant de Boltzmann en J/K

h = Constant de Planck J s

«Mai caminis pel camí traçat, doncs ell et condueïx únicament
cap a on els altres han anat»

Alexander Graham Bell