



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**CARACTERIZACIÓN TERMODINÁMICA DE LA SULFATASA SdsA1 DE
*Pseudomonas aeruginosa***

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. EN C. CÉSAR AGUIRRE MARTÍNEZ

TUTOR: DR. MIGUEL ANTONIO COSTAS BASÍN

FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Al Dr. Miguel Costas por su siempre excelente asesoría, comentarios, sugerencias, ayuda y consejos tanto personales como académicos.

A los miembros de mi Comité Tutor, la Dra. Rosario Muñoz Clares y el Dr. Enrique García Hernández, por las excelentes críticas realizadas a lo largo de este proyecto de investigación.

To Prof. Yuji Goto (Protein Folding Laboratory, Osaka University) for gently accepting me to work for few months in his laboratory where I got amazing results and really nice personal experiences. His comments and suggestions, from a different point of view, have been always useful.

A los Dres. Georgina Garza-Ramos, Daniel Alejandro Fernández, Luis Fernando Olguín, Adela Rodríguez Romero y Sergio Enríquez Flores por sus útiles comentarios y críticas para la publicación del primer artículo en la revista FEBS Letters.

Al Dr. Ángel Piñeiro, por toda la ayuda proporcionada para la interpretación y ajuste de los datos de Calorimetría de Titulación Isotérmica utilizando el software AFFINImeter.

A Satoshi Yasuda y al Dr. Toshiaki Arata por las facilidades y la asesoría teórica y experimental para realizar los experimentos de EPR (Laboratory of Molecular Biophysics and Biochemistry on Motility, Osaka University).

A mi colega y amigo Masatomo So por toda la ayuda técnica brindada durante mi estancia en Osaka, y por guiarme desde el más “simple” trámite burocrático en japonés y el uso de los equipos en el laboratorio del Dr. Goto, hasta acompañarme a conocer muchos lugares y experimentar las costumbres de aquel bello país.

A Daniel Padilla Chacón, por ayudarme a adaptarme a la forma de vida japonesa: desde evitar perderme en los trenes, como visitar lugares turísticos e históricos. Gracias en verdad, amigo.

A Alma Jessica Díaz Salazar por la excelente asistencia técnica recibida durante el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros del Laboratorio de Biofísicoquímica.

To my friends at Goto's Lab, especially to Mayu Terakawa, Tatsuya Ikenoue, Masanori Yagi and So-san. 本当にありがとうございました！頑張りましょうね！

A mi familia y amigos.

A CONACyT por la beca otorgada para mis estudios de doctorado (No. de becario 235245) y por la beca mixta para mi estancia de investigación en la Universidad de Osaka.

Al proyecto PAPIIT IN112813 por la beca otorgada durante el periodo de escritura de tesis.

Al programa de estancias cortas de la Universidad de Osaka FrontierLab@OsakaU por brindarme la oportunidad de conocer un mundo completamente distinto de investigación y trabajo, que ha enriquecido en gran manera mis habilidades en el estudio de las proteínas.

A la Coordinación de Estudios de Posgrado por las facilidades recibidas para los trámites de la estancia corta en la Universidad de Osaka, así como la ayuda para los gastos de transporte.

Al International Collaborative Research Program del Institute for Protein Research de la Universidad de Osaka por facilitar mi estancia a través del financiamiento parcial del alojamiento en el dormitorio de la universidad.

Al Posgrado en Ciencias Químicas de la UNAM.

A la Facultad de Química, donde he tenido la oportunidad de desarrollar mis habilidades en la investigación y docencia.

A la UNAM.

A mi familia y amigos

Los resultados de este trabajo se presentaron en:

XXIX Congreso Nacional de Bioquímica, Oaxaca, 2012.

3rd USA-Mexico Workshop in Biological Chemistry, Guanajuato, 2013.

IV Congreso de la Rama de Fisicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, Guanajuato, 2013.

Una parte de los resultados obtenidos fueron publicados en la revista *FEBS Letters*:

Autores: Aguirre C, Goto Y & Costas M

Año: 2016

Título: Thermal and chemical unfolding pathways of PaSdsA1 sulfatase, a homo-dimer with topologically interlinked chains

Revista: FEBS Letters

Volumen: 590

Páginas: 202–214

doi: 10.1002/1873-3468.12041

Jurado asignado

Presidente	Dra. Norah Yolanda Barba Bérens
1er Vocal	Dr. Rafael Zubillaga Luna
2do Vocal	Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco
3er Vocal	Dra. Alejandra Hernández Santoyo
Secretaria	Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig

Lugar donde se realizó la tesis:

1. Laboratorio de Biofisiología, Edificio F, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
2. Protein Folding Laboratory, Institute for Protein Research, Osaka University, Japan.

M. en C. César Aguirre Martínez

Sustentante

Dr. Miguel Antonio Costas Basín

Asesor

Índice general

ÍNDICE GENERAL	7
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABLAS	11
ABREVIATURAS	12
1 RESUMEN	13
2 ANTECEDENTES	15
2.1 ENZIMAS SULFATASAS	15
2.1.1 Presencia de los ésteres de sulfato y sulfonatos en la naturaleza	17
2.1.2 Arilsulfatasas	18
2.1.3 Alquilsulfatasas.....	19
2.1.4 Carbohidratossulfatasas.....	19
2.2 METALO-B-LACTAMASAS	20
2.2.1 Secuencia y estructura general de las MβL, las tres subclases.....	21
2.2.2 Coordinación de los metales	22
2.2.3 Mecanismos de catálisis.....	24
2.3 LA SULFATASA PaSdsA1	26
2.3.1 Características cinéticas de la sulfatasa PaSdsA1	27
2.3.2 Características estructurales de PaSdsA1	30
3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	36
3.2 OBJETIVO GENERAL	36
3.3 OBJETIVOS PARTICULARES	36
4 MATERIALES Y MÉTODOS	37
4.1 MATERIALES	37
4.2 PREPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA	37
4.3 DICROÍSMO CIRCULAR	39
4.4 CALORIMETRÍA DE BARRIDO DIFERENCIAL (DSC)	39
4.5. CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA (ITC)	39
4.5.1 Cinética Enzimática	39

4.6 CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE Zn^{2+} EN LAS MUESTRAS DE PROTEÍNA.....	41
4.7 TITULACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE LA FORMA APO CON Cu^{2+}	42
4.7.1 Dicroísmo circular y espectroscopía UV-Visible.	42
4.8 TENSIOMETRÍA DE GOTA PENDIENTE	43
5 ESQUEMA GENERAL DE PRESENTACIÓN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
6 DESNATURALIZACIÓN DE LA PASDSA1.....	46
6.1 DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA	46
6.2 DESNATURALIZACIÓN QUÍMICA INDUCIDA POR UREA	51
6.3 DISOCIACIÓN DE DÍMEROS Y ESTABILIZACIÓN DE MONÓMEROS	54
6.4 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA DE LOS MONÓMEROS	57
6.5 PANORAMA GLOBAL DE LA DESNATURALIZACIÓN DE LA SULFATASA PASDSA1	59
7 INTERACCIÓN PASDSA1-APO CON Zn^{2+} Y Cu^{2+}	61
7.1 ESTUDIO ESPECTROSCÓPICO DE LAS INTERACCIONES ENTRE METALES DE TRANSICIÓN Y PROTEÍNAS	61
7.1.1 Caracterización de la unión PaSdsA1/ Cu^{2+} por espectroscopía de absorción.....	64
7.1.2 Caracterización de la unión PaSdsA1/ Cu^{2+} por dicroísmo circular	65
7.1.3 Caracterización de la unión PaSdsA1/ Cu^{2+} por EPR.....	75
7.2 ESTUDIO CALORIMÉTRICO DEL MECANISMO DE UNIÓN PASDSA1- Zn^{2+} / Cu^{2+}	77
8 CONCLUSIONES	87
9 PERSPECTIVAS	88
10 APÉNDICE.....	90
11 ARTÍCULO FEBS LETTERS.....	95
12 BIBLIOGRAFÍA	109

Índice de figuras

FIGURA 1. RUTAS BIOSINTÉTICAS DE LA CISTEÍNA EN <i>E. COLI</i> Y <i>P. AERUGINOSA</i>	16
FIGURA 2. PLEGAMIENTO GENERAL DE LAS METALO-B-LACTAMASAS	22
FIGURA 3. EJEMPLOS REPRESENTATIVOS DE LA ESFERA DE COORDINACIÓN DE LOS IONES ZN EN LAS METALO-B-LACTAMASAS DE SUBCLASE B	23
FIGURA 4. EFECTO DE LA SUSTITUCIÓN DE LOS IONES ZN POR Cd(II) Y Co(II) EN LA ESFERA DE COORDINACIÓN DE LOS METALES EN ALGUNAS METALO-B-LACTAMASAS	24
FIGURA 5. MECANISMO DE CATÁLISIS DE LAS METALO-B-LACTAMASAS CON UNO Y DOS ÁTOMOS DE ZN EN EL SITIO CATALÍTICO	25
FIGURA 6. ESTRUCTURA CRISTALOGRÁFICA DE LA SULFATASA PASDsA1	27
FIGURA 7. SITIO CATALÍTICO DE LA FORMA HOLO DE PASDsA1 (2CFU)	28
FIGURA 8. MECANISMO DE CATÁLISIS DE LA SULFATASA PASDsA1, SEGÚN [59]	29
FIGURA 9. MECANISMO DE CATÁLISIS DE LA PASDsA1.	29
FIGURA 10. ESTRUCTURA CRISTALOGRÁFICA DE LA PASDsA1 (PDB 2CFZ)	30
FIGURA 11. DIFERENCIAS ESTRUCTURALES ENTRE LA FORMA 2ZN Y HOLO DE LA ENZIMA PASDsA1	31
FIGURA 12. FACTORES B DE TEMPERATURA PARA LAS FORMAS 2ZN (EN AZUL, PDB 2CFZ, RESOLUCIÓN 2.05 Å) Y HOLO (EN ROJO, PDB 2CG3, RESOLUCIÓN 2.6 Å) DE PASDsA1	32
FIGURA 13. TOPOLOGÍAS ESPECIALES EN PROTEÍNAS	33
FIGURA 14. EJEMPLOS REPRESENTATIVOS DE OTRAS PROTEÍNAS CON CADENAS ENTRELAZADAS	34
FIGURA 15. ELECTROFORESIS NATIVA DE LAS FRACCIONES PURIFICADAS DE LA ENZIMA PASDsA1	38
FIGURA 16. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA PASDsA1 EN FORMA HOLO POR ITC	40
FIGURA 17. EFECTO DEL PH EN LA SOLUBILIDAD DEL ZN(II)	41
FIGURA 18. DETERMINACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE METALES PESADOS POR EL MÉTODO DE PAR [160,161].	42
FIGURA 19. DIAGRAMA GENERAL DE RESULTADOS.	44
FIGURA 20. DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA DE LA PROTEÍNA PASDsA1	46
FIGURA 21. METALO-B-LACTAMASA AE036 DE AEROMONAS HYDROPHILA	47
FIGURA 22. CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE METALES Y ESPECTROS CD DE LAS TRES FORMAS DE PASDsA1	48
FIGURA 23. TERMOGRAMAS DSC PARA LAS FORMAS APO, 2ZN Y HOLO DE PASDsA1	49
FIGURA 24. GRÁFICAS DE ARRHENIUS PARA LA DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA IRREVERSIBLE DE LAS FORMAS HOLO, 2ZN Y APO DE PASDsA1	50
FIGURA 25. DESNATURALIZACIÓN QUÍMICA DE LA FORMA HOLO DE PASDsA1	53
FIGURA 26. DISOCIACIÓN DE DÍMEROS Y ESTABILIZACIÓN DE MONÓMEROS POR EL SDS	54
FIGURA 27. TENSIÓN SUPERFICIAL DEL DODECILSULFATO DE SODIO (SDS) EN EL AMORTIGUADOR EMPLEADO	55
FIGURA 28. EFECTO DEL SDS SOBRE EL PERFIL CALORIMÉTRICO Y LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PASDsA1 EN FORMA HOLO	56
FIGURA 29. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA DE LA FORMA PASDsA1 MONOMÉRICA EN PRESENCIA DE 1.5 mM SDS	57
FIGURA 30. TRAZAS CALORIMÉTRICAS DE LA FORMA HOLO DE LA PASDsA1 PRECALENTADA A 50 °C EN PRESENCIA DE 1.5 mM SDS (A) Y DE LOS MONÓMEROS ELUIDOS DE LA COLUMNA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR EN AMORTIGUADOR SUPLEMENTADO CON 1.5 mM SDS (B)	58
FIGURA 31. RUTAS DE DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA Y QUÍMICA DE LA FORMA HOLO DE LOS DÍMEROS DE PASDsA1	59
FIGURA 32. DIAGRAMA DE ORBITALES MOLECULARES PARA UN METAL PARAMAGNÉTICO UNIDO A UNA PROTEÍNA	61
FIGURA 33. TITULACIÓN DE LA FORMA PASDsA1 APO CON Cu ²⁺ SEGUIDA POR ESPECTROSCOPÍA UV-VISIBLE	63
FIGURA 34. TITULACIÓN DE LA FORMA PASDsA1 APO CON Cu ²⁺ SEGUIDA POR DICROÍSMO CIRCULAR	66
FIGURA 35. TITULACIÓN DE LA FORMA PASDsA1-APO CON Cu ²⁺	68
FIGURA 36. DECONVOLUCIÓN GLOBAL DE LOS ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR Y UV-VISIBLE	70
FIGURA 37. HIDRÓLISIS DEL SDS CATALIZADA POR LA PASDsA1-Cu ²⁺ -HOLO, SEGUIDA POR ITC	73

FIGURA 38. TITULACIÓN DE LA FORMA APO DE LA PASDsA1 CON Cu^{2+} UTILIZANDO RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA (EPR)	75
FIGURA 39. MECANISMO DE UNIÓN DE LA PASDsA1 CON M^{2+} , PROPUESTO A PARTIR DE LOS RESULTADOS DE TITULACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE PASDsA1-APO CON Cu^{2+}	78
FIGURA 40. DIAGRAMA DE LOS EQUILIBRIOS DE UNIÓN POSIBLES EN UNA MOLÉCULA RECEPTORA CON DOS SITIOS DISPONIBLES DE INTERACCIÓN	79
FIGURA 41. AJUSTE AL MODELO HÍBRIDO DE LA FIGURA 39, UTILIZANDO EL SERVIDOR AFFINIMETER [189,190], DE LOS EXPERIMENTOS DE TITULACIÓN POR ITC DE LA PASDsA1-APO CON Zn^{2+} (A, C Y E) Y CON Cu^{2+} (B, D Y F)	83
FIGURA 42. ESPECTRO DE MASAS DE LA PROTEÍNA PASDsA1 EN FORMA HOLO DIMÉRICA CON COLA DE HISTIDINAS	91
FIGURA 43. ESPECTRO DE MASAS DE LA PROTEÍNA PASDsA1 EN FORMA HOLO DIMÉRICA DESPUÉS DEL CORTE DE LA COLA DE HISTIDINAS	92

Índice de tablas

TABLA 1. RESIDUOS COORDINANTES DE LOS IONES DE Zn^{2+} EN LA SUBCLASE B DE LAS METALO-B-LACTAMASAS.	23
TABLA 2. PROTEÍNAS QUE FORMAN CONCATÁMEROS. SE CONOCEN ÚNICAMENTE 6 PROTEÍNAS QUE FORMAN CONCATÁMEROS EN LA NATURALEZA. EL RESTO HA SIDO PRODUCIDO A TRAVÉS DE LA INGENIERÍA DE PROTEÍNAS, COMO P53CAT ^{DM}	35
TABLA 3. PARÁMETROS DE LOS AJUSTES GLOBALES DE FUNCIONES GAUSSIANAS MÚLTIPLES A LOS ESPECTROS DE ABSORCIÓN ELECTRÓNICA Y DICROÍSMO CIRCULAR PARA LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO PASdsA1-Cu(II) DE LA FIGURA 36.....	71
TABLA 4. PARÁMETROS CINÉTICOS DE MICHAELIS-MENTEN DE LA REACCIÓN DE HIDRÓLISIS CATALIZADA POR LA PASdsA1-HOLO- Zn^{2+} Y PASdsA1-HOLO- Cu^{2+} . LOS VALORES SE OBTUVIERON A PARTIR LOS AJUSTES MOSTRADOS EN LAS FIGURA 16 Y FIGURA 37.....	74
TABLA 5. PARÁMETROS DE AJUSTE AL MODELO HÍBRIDO 1:4 PARA LOS SISTEMAS PASdsA1- Zn^{2+} Y PASdsA1- Cu^{2+}	84
TABLA 6. VECINOS DEL RESIDUO E280, LOS IONES ZNA Y ZNB DETERMINADOS A PARTIR DE LAS ESTRUCTURAS DE LAS FORMAS HOLO Y 2ZN.	93

Abreviaturas

PaSdsA1	Sulfatasa SdsA1 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
DSC	Calorimetría de Barrido Diferencial
T _m	Temperatura de fusión
<i>k</i>	Constante de rapidez de orden 1
E _{act}	Energía de activación
ITC	Calorimetría de titulación isotérmica
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
OD	Densidad óptica
TEV	Virus del jaspeado del Tabaco
NiNTA	Ácido Ni ²⁺ -nitrilotriacético
DTT	Ditiotreitol
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico
Tris	Tris(hidroximetil)aminoetano
PAR	4-(2-piridilazo)-resorcinol
MβL	Metalo-β-lactamasas
PAPS	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfato
SSI	Sulfate Starvation Induced proteins
tRNA	RNA de transferencia
EPR	Resonancia Paramagnética Electrónica
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
PAC	Espectroscopía de Correlación Angular Perturbada
PDB	Protein Data Bank
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
CD	Dicroísmo Circular
GdnHCl	Cloruro de Guanidinio
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
LMCT	Transferencia de carga ligante a metal

1 Resumen

PaSdsA1 sulfatase is a large homodimeric metalloenzyme with 658 residues per monomer that enables *Pseudomonas aeruginosa* to hydrolyze the surfactant sodium dodecyl sulfate (SDS). The folding characteristics of this protein resembles the metallo-beta-lactamases folding motives, an important model for metalloenzymes. The monomer chains are interlinked in a dimerization domain, establishing a non-covalent entanglement that avoids the dissociation of the dimeric protein.

To study the unfolding pathways, thermal and chemically induced denaturation experiments using calorimetric and spectroscopic techniques were performed. In the native protein three forms coexist, each with a different number of zinc atoms per dimer: four (holodimer), two (2Zn) and none (apo). A methodology for separating each of these forms was established. In the chemical unfolding with urea of the holodimers the entanglement of the chains is preserved, and this allows the unfolding process to be reversible. The main conclusions emerging from the research work are: (i) the thermal unfolding of the holo form is irreversible and kinetically controlled, the final state being protein aggregates; (ii) the chemical denaturation with urea is reversible implying that the entanglement of the chains in the dimerization domain is preserved in the unfolded state, and allowing the process to be reversible; (iii) the affinity of the protein for Zn atoms is high enough for the chemically unfolded dimer with entangled chains to be able to recruit Zn from the media during the refolding process, producing the three forms; (iv) in the presence of SDS, the thermal unfolding favors dimer dissociation, untangling the interlinked chains and producing monomers that are stabilized by the SDS molecules; (v) the thermal unfolding of the SDS stabilized monomers is reversible but does not produce dimers, implying that chain entanglement is not a spontaneous process but instead requires external aid [FEBS Lett. 590, 202-214 (2016)].

1. Resumen

The metal binding mechanism of Zn (II) and Cu (II) to the apo form of the sulfatase was also studied using UV-Absorption, CD and EPR spectroscopies (for PaSdsA1-Cu²⁺ system) as well as Isothermal Titration Calorimetry (for both PaSdsA1-Cu²⁺ and PaSdsA1-Zn²⁺). For Cu (II)-Apo binding, studying the metal electronic transitions due to d-d orbital bands and Ligand-Metal Charge Transfer (LMCT) from protein to metal, and how they varied as the Cu solution was added, we obtained significant changes that let us propose a metal binding mechanism for the PaSdsA1-Cu²⁺ system: two metal ions bind independently to a binding site in each monomer of the dimer, which involves independent site equilibria. Then, the third and fourth metal ions bind PaSdsA1 through sequential stoichiometric reactions. The ITC binding experiments employing Zn (II) confirmed the metal binding mechanism is the same than the observed for the system PaSdsA1-Cu²⁺.

2 Antecedentes

2.1 Enzimas Sulfatasas

El azufre es un elemento que constituye el 0.1 % de la superficie terrestre y juega un papel fundamental en una variedad de enzimas, en las cuales suele actuar como cofactor, como en el caso de la biotina, la coenzima A, la coenzima M, la tiamina y el ácido lipoico, entre otros. Además, es un elemento crítico en muchos procesos de óxido-reducción, tanto en centros catalíticos formados por unidades de Fe y S, así como componente activo redox en puentes disulfuro entre residuos de cisteína [1,2]. El azufre, en procesos biosintéticos, proviene de la asimilación de sulfato inorgánico por parte de las bacterias y las plantas. El proceso de biosíntesis de cisteína, por la ruta de asimilación de sulfato inorgánico, procede a través del transporte del sulfato externo hacia el interior de la célula, seguido por la activación del mismo a través de la incorporación al 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfato (PAPS), después una subsecuente reducción a sulfito y a sulfuro, y, finalmente, la transferencia de este sulfuro a alguna molécula orgánica para producir cisteína (**Figura 1**) [3].

En ausencia de sulfato inorgánico y cisteína, las bacterias sintetizan proteínas específicas que son requeridas para la movilización de fuentes alternativas de azufre externo, y para el uso de las últimas trazas disponibles de sulfato inorgánico dentro de la célula. Estas proteínas se denominan proteínas inducidas por ausencia de azufre (SSI, por sus siglas en inglés: *Sulfate Starvation Induced proteins*). Las fuentes alternativas de azufre pueden ser sulfonatos, ésteres de sulfato, metionina, sulfamatos (R-NHSO₃), órganosulfuros (R-SS-R') o tioéteres (R-S-R') [4,5]. Estas respuestas celulares han sido estudiadas detalladamente en análisis proteómicos [6]. Algunas de las proteínas

2. Antecedentes

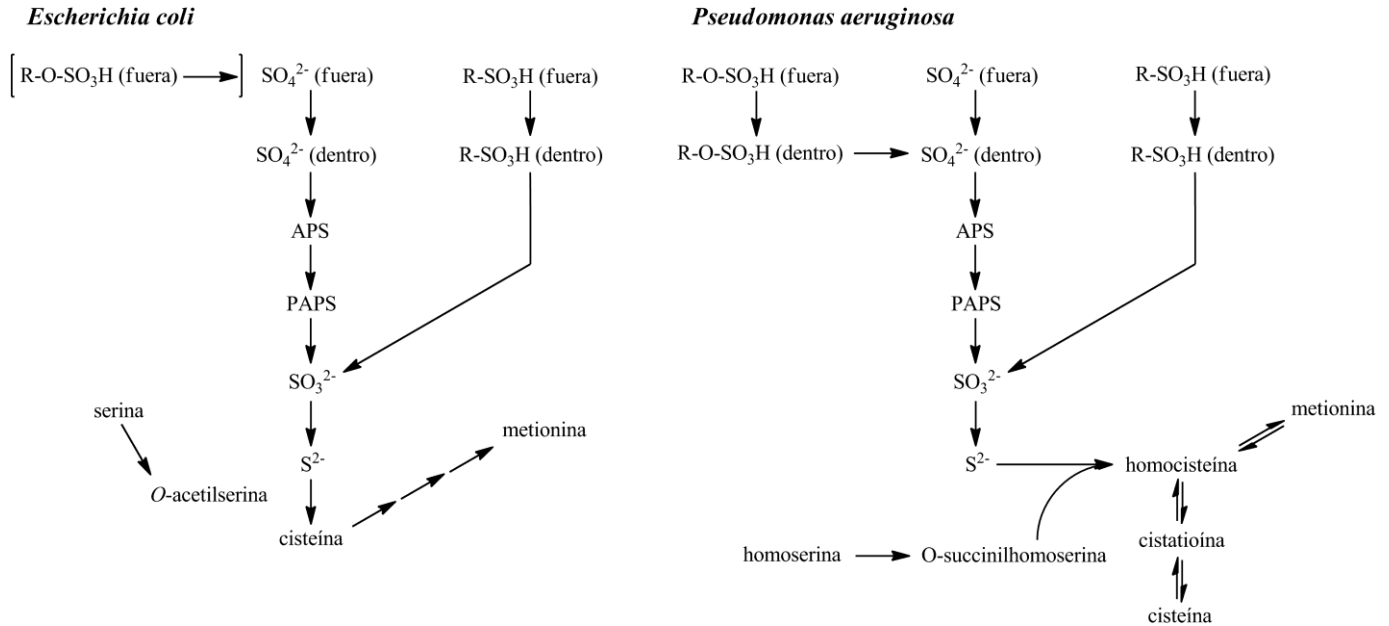


Figura 1. Rutas biosintéticas de la cisteína en *E. coli* y *P. aeruginosa*. En bacterias entéricas, el sulfuro es transferido a un derivado de la serina para generar cisteína, mientras que en *P. aeruginosa*, la molécula aceptora es la *O*-succinilhomoserina, para producir homocisteína, la cual, a su vez, será utilizada para generar cisteína y metionina [1,3].

SSI de *E. coli* y *P. aeruginosa* han sido secuenciadas por espectrometría de masas, lo cual ha permitido identificar algunas características distintivas para clasificarlas en tres categorías principales [6–8]:

- 1) Enzimas y sistemas de transporte involucrados en la incorporación de azufre a partir de rutas alternativas desde el medio ambiente o entorno. Estas proteínas SSI también incluyen proteínas periplásmicas de unión a sulfato, cisteína y sulfonatos, así como exosulfatasas [9].
- 2) Variedades de proteínas celulares vitales, pero con un contenido reducido de azufre, en las cuales algunos residuos de cisteína y metionina, que no son críticos para la función de la proteína, han sido reemplazados por otros aminoácidos. Un ejemplo es la variedad baja en cisteína y metionina de la lipoproteína NlpA de *Pseudomonas aeruginosa* [4].
- 3) Enzimas involucradas en la movilización de los depósitos intracelulares de compuestos azufrados. Por ejemplo, en *E. coli* se ha observado que el contenido de compuestos azufrados disminuye a la mitad durante la carencia de azufre, implicando que la viabilidad de la célula se mantiene a través de la redistribución del azufre total de la misma [10].

2.1.1 Presencia de los ésteres de sulfato y sulfonatos en la naturaleza

Los sulfonatos xenobióticos son utilizados en una amplia variedad de productos comunes, tan diversos como colorantes, abrillantadores, detergentes, aditivos para cementos, y como intermediarios en la industria química. Muchos de estos compuestos e intermediarios de síntesis son liberados al medio ambiente y son fácilmente hallados como contaminantes en ríos, drenajes y océanos [11–16].

En mamíferos, la sulfuración de xenobióticos es un paso clave para el proceso de desintoxicación y excreción de xenobióticos aromáticos, debido a que los correspondientes compuestos en su forma azufrada resultan, generalmente, más solubles en agua y menos reactivos que sus contrapartes no azufradas. La sulfuración puede ocurrir directamente sobre un grupo hidroxilo (por ejemplo, catecoles), o después de una etapa inicial de hidroxilación por los citocromos P450, para que los compuestos conjugados sean excretados mediante la orina o la bilis [17]. Debe hacerse notar que las bacterias utilizan mecanismos similares para la desintoxicación por compuestos xenobióticos [18].

La sulfuración de residuos de tirosina es una modificación postraducciona común que tiene lugar en las cercanías del complejo de Golgi en organismos eucariontes [19–21], lo cual representa hasta el 1 % del contenido total de tirosina en la célula [22]. En mamíferos, las reacciones de sulfuración y desulfuración también son relevantes porque regulan la concentración y transporte de moléculas biológicamente activas, como son los estrógenos, que son transportados por todo el organismo como ésteres de sulfato e hidrolizados en el tejido objetivo para regenerar al esteroide activo [23]. Los ésteres de sulfato son entonces moléculas biológicamente activas a las que tanto bacterias como organismos eucariontes se exponen de forma natural.

Los tensoactivos derivados de sulfatos de alquilo son abundantemente utilizados en formulaciones para detergentes, pastas dentales, antiácidos, productos de higiene personal, productos de limpieza para automóviles, etc., y son liberados como contaminantes al medio ambiente [24]. Se sabe que los sulfatos de alquilo primarios y secundarios son rápidamente degradados por bacterias ambientales, y por ello no se alcanzan concentraciones demasiado altas en el medio ambiente [25]. Se conocen, además, otros ésteres sulfatos de alquilo que se presentan en la naturaleza y no son agentes xenobióticos, los cuales van desde el sulfato de metilo hasta sulfatos de cadenas alifáticas mayores y sulfatos alifáticos parcialmente clorados derivados de algas

[26]. Algunos estudios sugieren que la capacidad de las bacterias para degradar sulfatos de alquilo xenobióticos proviene de la exposición primaria a estos compuestos naturales sulfatados, como se mencionó en el párrafo anterior, razón por la cual se han encontrado alquilsulfatasas (o al menos se han identificado secuencias que codifican para sulfatasas) en organismos que no han sido expuestos a la contaminación por surfactantes [27,28].

Las enzimas sulfatasas (EC 3.1.6.-, *EC: Enzyme Commission numbers*) son proteínas que hidrolizan ésteres de sulfato aromáticos y alifáticos, y han sido aisladas en bacterias [26], hongos [29,30], algas [31–33], organismos eucariontes superiores [34] y plantas [35,36]. En humanos, la mayor parte de las sulfatasas se localizan en los ambientes ácidos de los lisosomas, y están involucradas en la desulfuración de glicosaminoglicanos, como el sulfato de heparina, el sulfato de condroitina y el sulfato de dermatano [34,37].

En términos generales, podemos establecer, por el sustrato que es reconocido e hidrolizado, tres principales tipos de sulfatasas: las arilsulfatasas, las alquilsulfatasas y las carbohidratosulfatasas.

2.1.2 Arilsulfatasas

Las arilsulfatasas bacterianas se han identificado y estudiado en una variedad de especies, incluyendo enterobacterias (*Klebsiella* [38–40], *Salmonella* [41,42], *Enterobacter* [43,44], *Proteus* [45,46], *Serratia* [47]), *Pseudomonas* (*Pseudomonas* [9,48,49], *Comamonas* [50]), micobacterias y cianobacterias [51]. Las arilsulfatasas contienen una secuencia conservada de aminoácidos en el motivo del sitio activo, el cual es requerido para la actividad catalítica. Esta secuencia (C/S-X-P-X-R-X₄-TG) se encuentra conservada tanto en sulfatasas procariontes como en eucariontes y, en todos los casos, se ha observado una modificación postraducciona del residuo catalítico de cisteína o serina a la formilglicina (FGly). La presencia del residuo modificado FGly ha sido demostrada en diversas enzimas, como las arilsulfatasas lisosomales A y B de humano [52–54]. La pérdida de la capacidad de modificar el residuo de cisteína en FGly produce la enfermedad de almacenamiento lisosomal MSD, en la cual las actividades catalíticas de todas las sulfatasas lisosomales se ven drásticamente afectadas [55].

El análisis estructural de rayos X de las arilsulfatasas A y B de humano ha mostrado que el residuo FGly en estas proteínas está presente en el sitio activo de la enzima, como hidrato o como hemiacetal del éster sulfato, en la base de un hueco cargado positivamente [56,57]. Este hidrato

2. Antecedentes

juega un papel crucial en el mecanismo de catálisis, en donde se encarga de realizar el ataque nucleofílico sobre el átomo de azufre para liberar al correspondiente alcohol tras la ruptura del enlace S-O. La mutación de la cisteína del sitio activo de las sulfatasas humanas por serina lleva a una pérdida casi total de la actividad enzimática [54].

2.1.3 Alquilsulfatasas

Las alquilsulfatasas difieren de las arilsulfatasas no sólo en la variedad de los sustratos que reconocen, sino también desde el punto de vista mecanístico. Mientras que las arilsulfatasas hidrolizan el enlace S-O de sus sustratos, las alquilsulfatasas pueden hidrolizar el enlace C-O, como en el caso de las alquilsulfatasas que invierten la estereoquímica del producto (Pisa1 y PaSdsA1, ambas de *P. aeruginosa* [26,58–60]). Otra diferencia notable es que las alquilsulfatasas no forman un intermediario covalente enzima-sustrato; sino que contienen sitios catalíticos dependientes de Zn^{2+} que coordinan moléculas de agua, las cuales son las responsables del ataque nucleofílico sobre el sustrato [61].

Una de las primeras alquilsulfatasas estudiadas es la correspondiente al gen de *Pseudomonas* sp. ATCC19151, *sdsA*, que fue identificado por complementación de varias mutantes de cepas que utilizan SDS como sustrato. Se identificaron dos genes que son requeridos para el uso del SDS, *sdsA* y *sdsB*. La proteína putativa SdsB es un miembro de la familia LysR de reguladores transcripcionales, y está relacionada con la proteína regulatoria requerida para la desulfonación de arilsulfonatos en *P. putida*. El rol regulatorio de la proteína SdsB se demostró por el hecho de que el fenotipo SDS-negativo de una mutante en *sdsB* pudo complementarse por un gen *sdsA* expresado constitutivamente detrás del promotor T7. La proteína SdsB entonces se requiere para la expresión del gen *sdsA*, que codifica para una proteína de 59 kDa [62–64]. Se han encontrado homólogos de la proteína SdsA en *E. coli* (YjcS; 32 kDa, 32 % identidad de aminoácidos con SdsA), y en *P. aeruginosa* (30 % identidad sobre la proteína SdsA completa), que, a su vez, comparten características estructurales y de plegamiento con las metalo- β -lactamasas de diversos organismos [58,65,66].

2.1.4 Carbohidratossulfatasas

La mayoría de las sulfatasas eucariontes son en realidad carbohidratossulfatasas, que actúan sobre los glicosaminoglicanos [34]. Diversas enzimas se han identificado como miembros de este grupo, incluyendo enzimas de *Proteus vulgaris*, *Flavobacterium heparinum* y *Bacteroides*

thetaitoamicron. La ruptura del glicosaminoglicano por estas bacterias involucra la hidrólisis del polímero por una liasa, usualmente extracelular, seguida por una desulfuración de los resultantes disacáridos sulfatados e hidrolizados por una glucuronidasa, hasta generar los correspondientes monosacáridos como productos finales [67].

2.2 Metallo- β -lactamasas

Los antibióticos β -lactámicos son esenciales en el tratamiento de infecciones comunes bacterianas [61]. Dentro de estos antibióticos, se encuentran estructuras de gran diversidad, incluyendo penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenems. Los β -lactámicos actúan como pseudosustratos de las DD-transpeptidasas, también conocidas como proteínas de unión a penicilinas (PBPs). La ruptura del enlace β -lactámico lleva a la acilación e inhibición de las transpeptidasas, inhibiendo irreversiblemente la formación de la pared celular de péptidoglicano [68].

Las bacterias han evolucionado tres estrategias para combatir a los antibióticos β -lactámicos: (i) la alteración del sitio blanco (PBPs), (ii) la reducción de la permeabilidad a través de la membrana bacteriana y (iii) la producción de enzimas β -lactamasas [69]. Estas enzimas catalizan la hidrólisis del anillo β -lactámico de cuatro heteroátomos con la consecuente ruptura del enlace amida. En la clasificación de β -lactamasas, las clases A, C y D son evolutivamente distintas, pero todas funcionan con un sitio activo de serina cuya cadena lateral es el agente nucleofílico clave en el proceso catalítico. La clase B representa a las metallo- β -lactamasas dependientes de Zn [68]. Las metallo- β -lactamasas dependientes de Zn no tienen similitud estructural o de secuencia con las β -lactamasas de serina y tienen un amplio perfil de sustratos. Estas β -lactamasas dependientes de Zn fueron descubiertas en 1966 por Sabath y Abraham en una cepa inocua de *Bacillus cereus* [70]. El descubrimiento de M β L transferibles en la década de 1990, identificadas en *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacteroides fragilis*, alarmó a la comunidad científica, debido a que, por primera vez, los organismos acarreadores eran clínicamente relevantes y la posibilidad de una diseminación horizontal de estas enzimas fue reconocida [71–73].

Las metallo- β -lactamasas son las enzimas responsables de la resistencia bacteriana contra los antibióticos β -lactámicos [61]. Estas enzimas muestran una considerable diversidad en términos de secuencia y han sido agrupadas en tres diferentes subclases, B1, B2 y B3, que comparten un patrón de plegamiento común. En cada caso, la enzima activa contiene sitios de unión para dos

2. Antecedentes

iones de Zn muy cercanos entre ellos, aunque los aminoácidos que los coordinan varían de una subclase a otra. En las subclases B1 y B3, existe controversia sobre si es uno o dos iones de Zn los requeridos para la actividad enzimática; sin embargo, recientes experimentos indican que hay cooperatividad positiva en la unión del Zn [74–76] y que la especie catalíticamente relevante es la enzima con dos átomos de Zn [75,77]. Las enzimas de subclase B2, por otro lado, son activas en el estado con un solo ion de Zn, y se inhiben si se une un segundo ion metálico [78,79]. Los iones Zn^{2+} juegan un papel fundamental en el mecanismo de catálisis, facilitando el ataque nucleofílico en el carbonilo de amida por parte del ion hidroxilo, que actúa también como ligante puente entre los dos átomos de Zn, estableciendo un intermediario aniónico tetraédrico y coordinando la salida del nitrógeno de la amida [80–84].

2.2.1 Secuencia y estructura general de las MβL, las tres subclases

Las MβL contienen entre 240 y 310 aminoácidos, de los cuales entre 17 y 30 componen un péptido señal, que es removido post-traduccionalmente para generar proteínas maduras [61,68]. Las MβL se agrupan en tres subclases: B1, B2 y B3, de acuerdo con las similitudes de secuencia y la esfera de coordinación del Zn, aunque estas similitudes tampoco son estrictamente restrictivas [80,85,86]. La identidad de secuencia entre las subclases B1 y B2 está entre 14 y 24 %, mientras que la identidad entre las subclases B3 y (B1 + B2) va desde el 2 hasta un 14 %. Los marcadores clave de secuencia son los ligantes que coordinan a los iones metálicos, que se encuentran conservados en una secuencia consenso **HXHXD(X)_iH(X)_jC(X)_kH** (donde $i= 55-74$, $j= 18-24$ y $k= 37-41$) [87]. Los análisis filogenéticos sugieren que las subclases B1 y B2 están evolutivamente relacionadas y comparten ciertos elementos significativos de secuencia, pero la subclase B3, aunque comparte similitudes estructurales con B1 y B2, se encuentra evolutivamente mucho más distante [88].

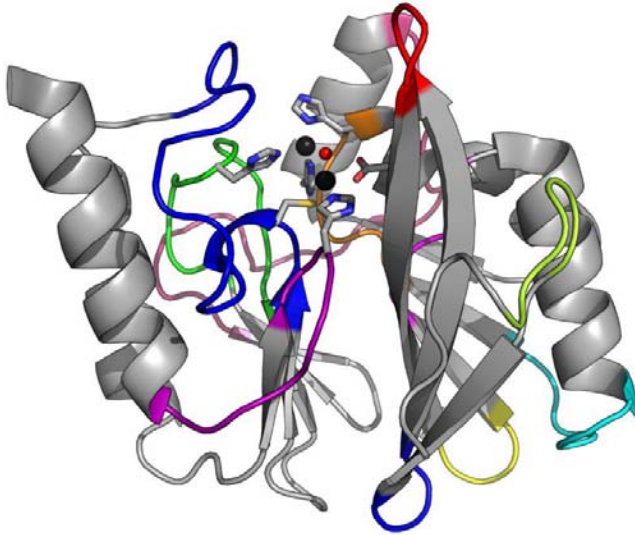


Figura 2. Plegamiento general de las Metallo- β -lactamasas. Estructura cristalográfica de la proteína VIM-2 de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB 1KO3). Las esferas negras representan los iones Zn^{2+} , mientras que la esfera roja representa al ion hidroxilo que establece enlaces de coordinación puente con ambos iones metálicos. Los iones Zn^{2+} están entre dos series de láminas β , a su vez flanqueadas por hélices α [89].

La definición de las tres subclases está soportada por datos estructurales [66,68,86]. Todas las M β L para las cuales se ha determinado su estructura tridimensional comparten una estructura $\alpha\beta/\beta\alpha$, con un sándwich central de láminas β flanqueado a cada lado por hélices α , el denominado plegamiento M β L (**Figura 2**) [89]. Este motivo fue observado primero en M β L, pero se ha observado recientemente en muchos otros tipos de proteínas, con toda una variedad de actividades catalíticas diferentes y distintas especificidades por metales [66]. La mayoría de estas proteínas caen en dos grupos: (i) las hidrolasas, incluyendo a las mismas M β Ls, glioxilasa II, lactonasas y nucleasas (como la RNasa Z, involucrada en la maduración de tRNA), las cuales contienen generalmente centros con dos iones de Zn o Mn [90–93], y (ii) óxidorreductasas con centros con dos iones de Fe, como la rubredoxina:oxígeno óxidorreductasa, la óxido nítrico reductasa y una β -hidrolasa involucrada en biosíntesis de antibióticos [94–96].

2.2.2 Coordinación de los metales

Las M β L requieren Zn como cofactor y tienen dos sitios de unión a metales muy próximos entre ellos. Éstos suelen denominarse como sitios Zn1 o 3H (por unirse tres residuos de His al metal) y Zn2 o DCH (unión con Asp, Cys y His), aunque existen variaciones en los residuos que coordinan a los iones metálicos, particularmente entre las diferentes subclases, como se muestra en la siguiente tabla [97]:

2. Antecedentes

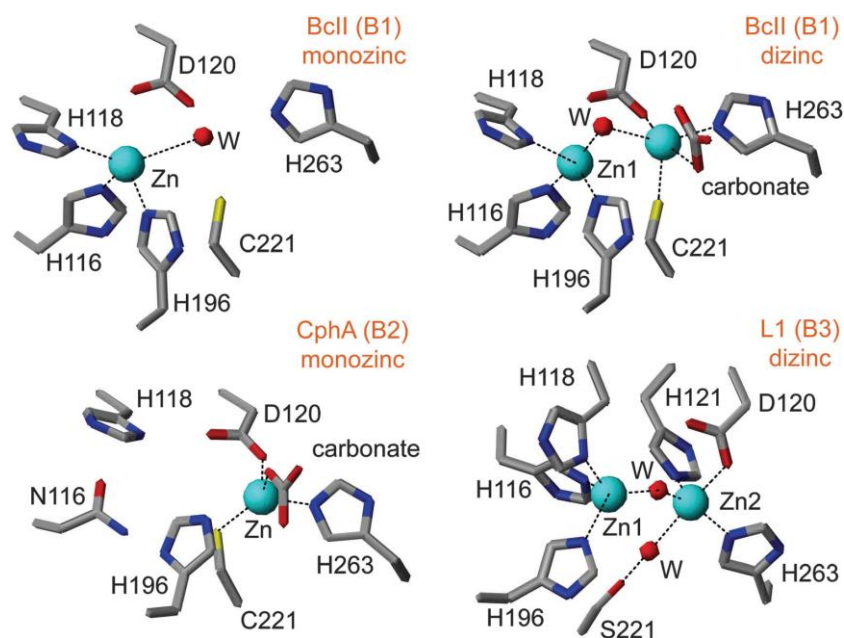


Figura 3. Ejemplos representativos de la esfera de coordinación de los iones Zn en las metalo- β -lactamasas de subclase B. *BclI* con uno (1BMC) y con dos iones de Zn (1BVT), subclase B1. *CphA* con un solo ion Zn (1X8G), subclase B2. Enzima *L1* con dos iones Zn (1SML), subclase B3. Se utilizó la numeración BBL para todos los casos. Tomado de [61].

Tabla 1. Residuos coordinantes de los iones de Zn^{2+} en la subclase B de las metalo- β -lactamasas.

Subclase	Residuos coordinantes
B1	Sitio Zn1: H116, H118, H196 Sitio Zn2: D120, C221, H263
B2	Sitio Zn1 (Inhibidor): D120, C221, H263 Sitio Zn2 (Monozinc): N116, H118, H196
B3	Posibilidad 1 Sitio Zn1: H116, H118, H196 Sitio Zn2: D120, H121, H263 Posibilidad 2 Sitio Zn1: Q116, H118, H196 Sitio Zn2: D120, H121, H263

Se han obtenido estructuras cristalográficas de M β L con un solo átomo de Zn unido (particularmente cuando la proteína es cristalizada a bajos valores de pH, circunstancias en las que los residuos coordinantes se protonan fácilmente) [61], pero las evidencias experimentales indican que todas las M β Ls son capaces de unir dos iones Zn bajo las condiciones apropiadas [98]. Algunas estructuras representativas de esta clase de proteínas se muestran en la **Figura 3**.

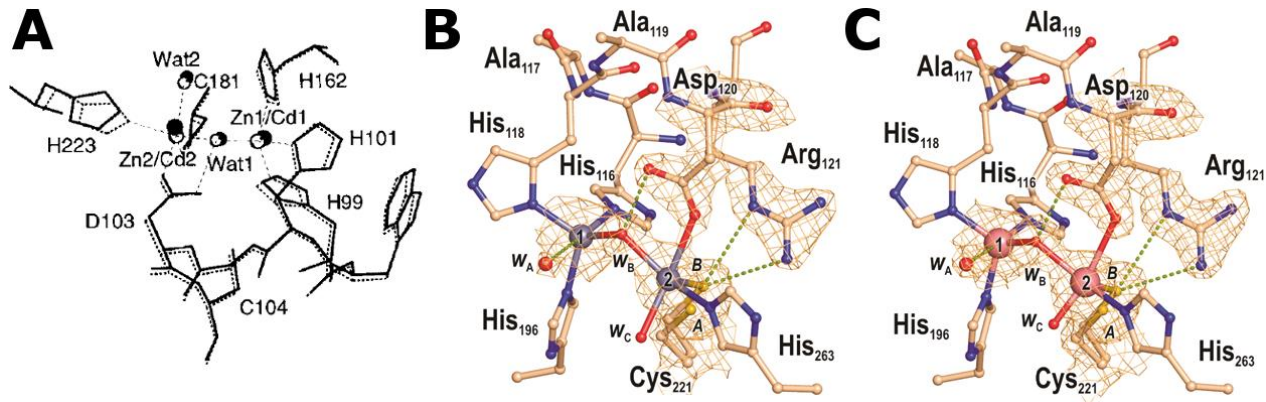


Figura 4. Efecto de la sustitución de los iones Zn por Cd(II) y Co(II) en la esfera de coordinación de los metales en algunas metalo-β-lactamasas. (A) Estructura cristalina del sitio activo de la MβL de *Bacteroides fragilis*, mostrando la superposición de los centro binucleares de Cd²⁺ (línea sólida) y Zn²⁺ (línea punteada) y sus ligantes [102]. Wat1 representa el grupo hidroxilo puente entre ambos iones metálicos. (B y C) Estructura del sitio activo de la MβL BcII de *Bacillus cereus* unida con Zn²⁺ (panel B) y con Co²⁺ (panel C). Los números 1 y 2 indican los metales que se unen a los sitios 3H y DCH, respectivamente [103].

Las MβLs funcionan únicamente con Zn *in vivo*; sin embargo, se ha observado actividad significativa *in vitro* con otros iones metálicos, incluyendo Cd²⁺, Co²⁺, Cu²⁺ y Mn²⁺ [99–101]. En el caso de las MβLs de *B. fragilis* y *B. cereus*, ambas pertenecientes a la subclase B1, sustituidas con Cd²⁺ y Co²⁺, respectivamente, muestran un efecto casi imperceptible en la geometría de la coordinación del metal (Figura 4) [102,103]. El uso de la sustitución de metales ha sido una herramienta invaluable en el estudio de las MβLs, permitiendo el uso de técnicas espectroscópicas, como espectroscopía electrónica, EPR, RMN y espectroscopía de correlación angular perturbada (PAC), las cuales no pueden emplearse para las enzimas nativas con Zn (II) [104–108].

2.2.3 Mecanismos de catálisis

El Zn confiere importantes ventajas en la catálisis enzimática a las MβL debido a su rol como ácido de Lewis y a la flexibilidad en la geometría de coordinación combinada con la interacción fuerte con los sitios disponibles (cuatro interacciones en el sitio 3H y cinco en el DCH) [82], así como el rápido intercambio de ligante, como el observado en el ataque nucleofílico por parte del ion hidróxido puente entre los iones Zn [84]. Aún cuando las β-lactamasas de Zn han sido mucho menos estudiadas que sus contrapartes con sitios activos de serina, se ha llegado a un consenso en términos del mecanismo general de catálisis. El rol de los iones Zn parece claro (Figura 5). El Zn actúa como un ácido de Lewis al coordinarse con el oxígeno carbonílico de la amida del anillo β-lactámico, confiriendo una mayor deficiencia electrónica al carbono carbonílico, lo cual facilitaría el ataque nucleofílico por parte del grupo hidroxilo puente que coordina al Zn. También

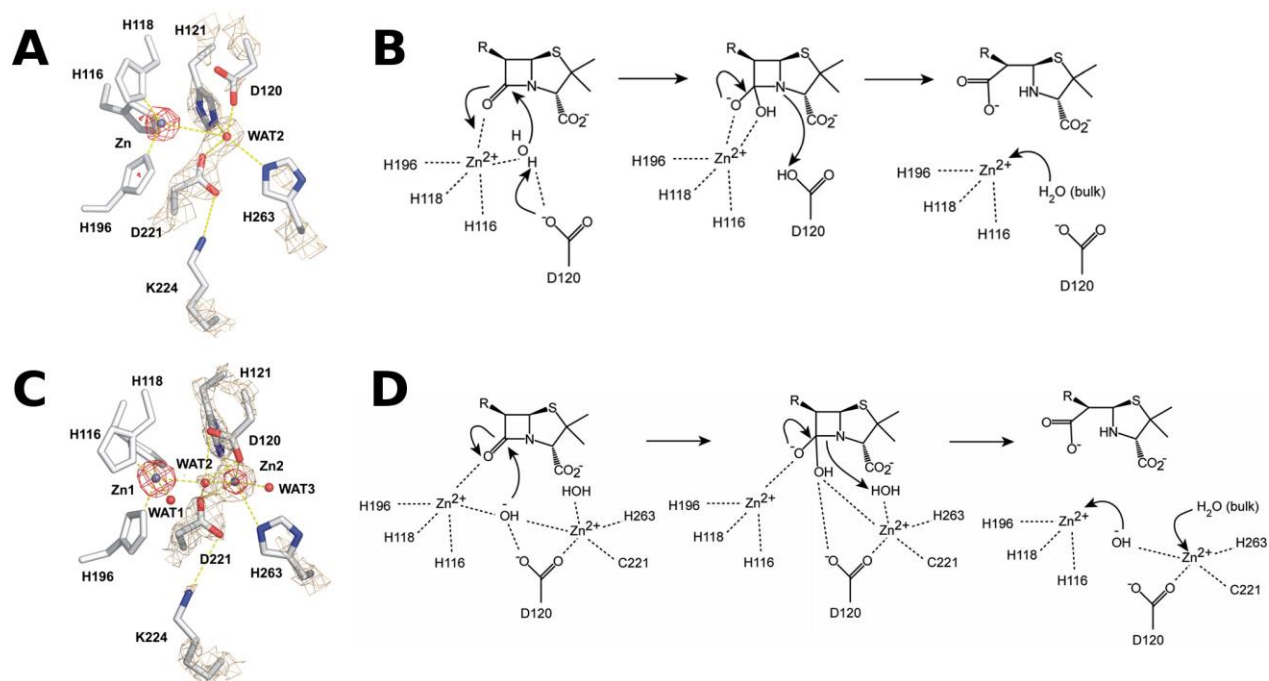


Figura 5. Mecanismo de catálisis de las metalo-β-lactamasas con uno y dos átomos de Zn en el sitio catalítico. (A) Estructura cristalina de la β-lactamasa II de *Bacillus cereus* con un solo átomo de Zn (PDB 2NZF, [98]). (B) Mecanismo de catálisis para MβL con un solo ion Zn²⁺ [83]. Este mecanismo involucra la desprotonación de la molécula de agua coordinada al metal por parte del residuo D120, formando un ion hidróxido, el cual realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono carbonílico. El ion Zn²⁺ estabiliza la carga del intermediario generado. La ruptura del enlace C-N del anillo β-lactámico se favorece por la protonación del átomo de N del intermediario por parte del residuo D120. (C) PDB 2NYP Estructura cristalina de la β-lactamasa II de *Bacillus cereus* con dos átomos de Zn (PDB 2NXA, [98]). (D) Mecanismo de catálisis con dos átomos de Zn [82,83]. En este mecanismo, el hidróxido puente que coordina a ambos iones Zn²⁺ realiza el ataque nucleofílico sobre el carbono carbonílico del sustrato. La carga del oxianión generado también se estabiliza por interacción con el primer átomo de Zn. La protonación del átomo de N del intermediario se favorece por una molécula de agua proveniente del medio, regenerando el ión hidróxido que sirve de puente entre los iones de Zn²⁺. La entrada de una molécula adicional de agua recupera la esfera de coordinación del segundo átomo de Zn.

es posible que el Zn estabilice la carga negativa que se produce en el oxígeno carbonílico en el intermediario tetraédrico aniónico. La coordinación al metal produciría una disminución en el pKa de la molécula de agua coordinada, llevando a un incremento en la concentración de iones hidróxido [109]. Sin embargo, el hidroxilo formado mediante esta ionización es estabilizado por la coordinación a ambos iones de Zn. Finalmente, la ruptura del intermediario tetraédrico podría ser facilitada por la coordinación directa del nitrógeno de la amina saliente al ion metálico, o bien, una molécula de agua unida al metal podría actuar como catalizador ácido general, protonando el nitrógeno de la amina del grupo saliente. Una gran cantidad de estudios han sido llevados a cabo, incluyendo dependencia con el pH, efectos isotópicos, efectos por mutaciones puntuales, aunque la relativa plasticidad del sitio activo vuelve difícil la interpretación, y estudios espectroscópicos

de enzimas con metales sustituidos, han demostrado cambios en la coordinación de los metales conforme la reacción procede [77].

2.3 La Sulfatasa PaSdsA1

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram-negativo que pertenece al género *Pseudomonas* [110]. Esta bacteria es un patógeno oportunista capaz de infectar a individuos cuyo sistema inmunológico se encuentra debilitado, por ejemplo, personas viviendo con VIH, con quemaduras severas, fibrosis quística, etc. [111–113]. También ha sido encontrada creciendo en aguas de desecho, drenajes y otros sitios donde el dodecilsulfato de sodio (SDS) y otros tensoactivos utilizados en productos comerciales de limpieza se encuentran presentes [114,115]. Diversos estudios han demostrado que *Pseudomonas aeruginosa* puede crecer tomando como fuente única de carbono y azufre a la molécula de SDS, esto se debe a actividad de la enzima PaSdsA1, que es capaz de hidrolizar al SDS para producir 1-dodecanol y SO_4^{2-} . Con esto, el organismo logra incorporar el grupo SO_4^{2-} en la ruta de síntesis de cisteína y metionina [1,58,62,65].

Es importante mencionar que las sulfatasas pueden clasificarse no solamente por el tipo de sustrato que hidrolizan (ver **Secciones 2.1.2 a 2.1.4**), sino también por las características mecánicas que las distinguen [58,60]:

Clase I: arilsulfatasas y carbohidrosulfatasas dependientes de la modificación de un residuo catalítico de Ser y/o Cys por FGly. Estas proteínas actúan sobre carbohidratos y hormonas sulfatadas [116].

Clase II: sulfatasas dependientes de α -cetoglutarato que hidrolizan a través de un mecanismo oxidativo. Estas proteínas contienen Fe(II) en el sitio activo [117].

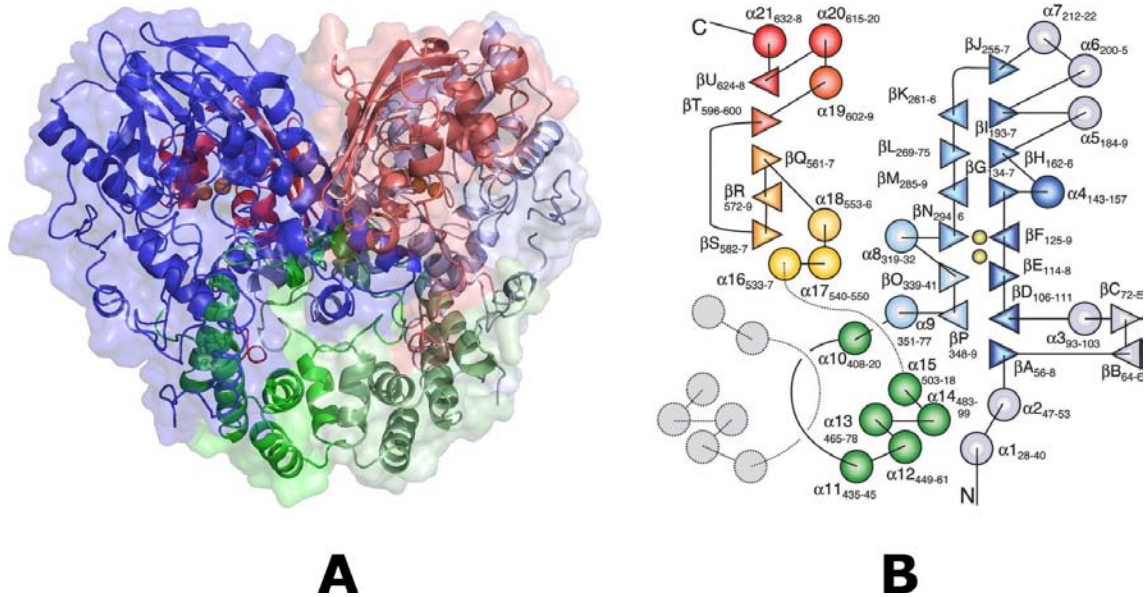


Figura 6. Estructura cristalográfica de la sulfatasa PaSdsA1. (A) Representación de los dominios estructurales que conforman al dímero PaSdsA1. En azul se muestra el dominio amino terminal, donde se encuentra el sitio catalítico, en verde el dominio de dimerización, con una topología que permite que los monómeros se entrelacen, y en rojo el dominio carboxilo terminal, que permite el reconocimiento e interacción inicial con el sustrato (PDB 2CFZ). (B) Esquema de los elementos de estructura secundaria de cada monómero (tomado de [58]). Los círculos representan hélices α , los triángulos hebras β , los risos por líneas y los iones Zn^{2+} por esferas amarillas. El código de colores es el mismo que en (A). Nótese que los átomos de Zn están rodeados por láminas β formando un sándwich. Este elemento de superestructura secundaria se rodea a su vez de hélices alfa. Este tipo de conformación estructural es el típico observado en la superfamilia de las metalo- β -lactamasas (ver sección 2.2).

Clase III: sulfatasas pertenecientes al grupo de las metalo- β -lactamasas dependientes de Zn(II) [58,65,66].

La estructura de la enzima PaSdsA1 ha sido resuelta por difracción de rayos X (Figura 6) y, considerando la manera alternativa de clasificar a las sulfatasas, la sulfatasa PaSdsA1 ha sido definida como el primer miembro de la clase III de sulfatasas [58,66]; sin embargo, en años recientes, han sido encontrados nuevos miembros de esta clase, como lo es la enzima Pisa1, también de *P. aeruginosa* [59,60]. Estas proteínas se caracterizan por tener en su sitio catalítico dos átomos de Zn [60] (la forma holo) y un patrón de plegamiento similar al presente en la familia de las metalo- β -lactamasas [66,68].

2.3.1 Características cinéticas de la sulfatasa PaSdsA1

Con base en la estructura cristalográfica de la proteína PaSdsA1 en complejo con el análogo del sustrato no reactivo decilsulfonato de sodio (1DA, ver Figura 7), se propuso que en el

2. Antecedentes

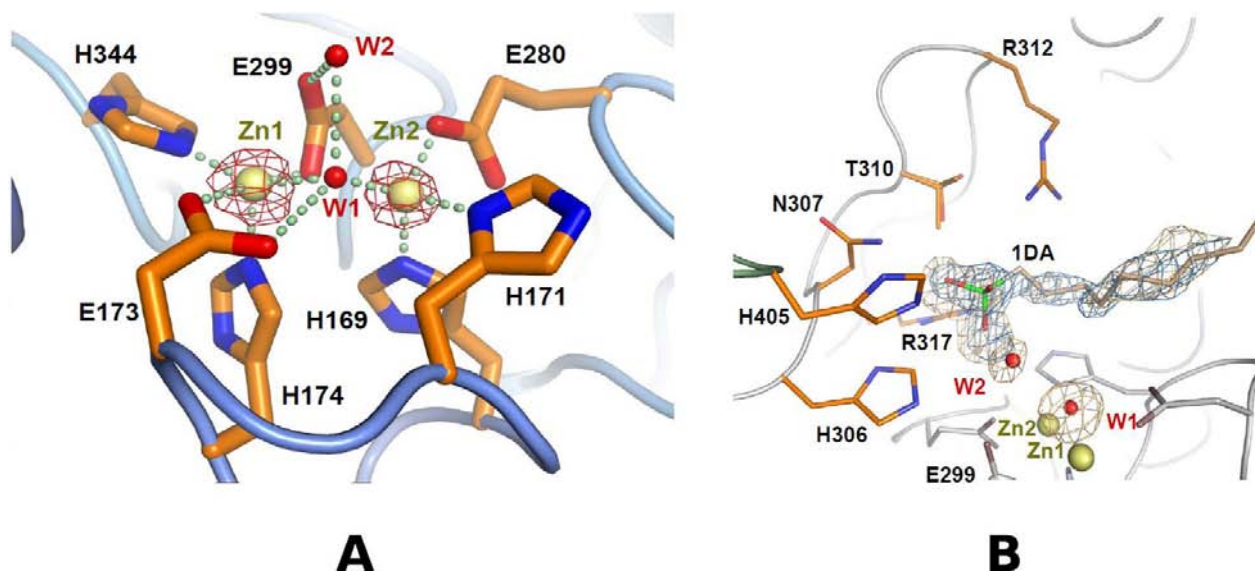


Figura 7. Sitio catalítico de la forma holo de PaSdsA1 (2CFU). (A) El sitio catalítico se caracteriza por contener dos átomos de Zn (esferas amarillas) coordinados por residuos de His, Glu y Asp, y una molécula de agua (W1), la cual coordina a ambos átomos metálicos, funcionando como ligante puente. Una segunda molécula de agua (W2) establece interacciones con E299 y con la molécula puente W1, lo cual restringe el movimiento de la misma, efecto que se refleja en el relativamente pequeño valor del factor B de temperatura de W2. (B) PaSdsA1 cristalizada en presencia de un análogo no reactivo del SDS, el decilsulfonato de sodio (1DA). Puede observarse que la molécula de agua W2 se encuentra posicionada cerca del átomo de azufre del 1DA, sugiriendo que el ataque nucleofílico de esta molécula sobre el sustrato es el paso que da inicio a la reacción. La cercanía del residuo R312 con el sustrato sugiere que los átomos de N de R312 formarían interacciones con el átomo de oxígeno que une al grupo sulfato con la cadena alifática del sustrato. Esto permitiría el correcto posicionamiento del sustrato en el sitio catalítico para llevar a cabo la reacción [58].

mecanismo de catálisis de la PaSdsA1 participaría una molécula de agua (W2 en **Figura 7.B**), que formaba interacciones con un clúster binuclear de iones Zn(II) y con el residuo E299, quien es la responsable del ataque nucleofílico sobre el átomo de azufre, debido a la cercanía entre esta molécula de agua y el azufre, lo cual no tendría efecto alguno sobre la estereoquímica del producto formado [58]. Sin embargo, estudios más recientes utilizando técnicas de marcaje radiactivo con ^{18}O [59,60], han revelado que la hidrólisis catalizada por la PaSdsA1 produce una inversión en la estereoquímica del átomo de C que se une al grupo sulfato, lo cual sugiere fuertemente que el ataque nucleofílico no se realiza sobre el átomo de azufre, sino en el átomo de carbono adyacente al grupo sulfato. Por esta razón esta sulfatasa no es capaz de hidrolizar arilsulfatos ni carbohidratos sulfatados. Con estas nuevas evidencias, el mecanismo de catálisis entonces llevaría la siguiente secuencia de reacción (ver también **Figura 8 y 9**):

Paso 1. El sustrato aniónico se posiciona en el sitio catalítico a través de interacciones electrostáticas entre el grupo sulfato y el residuo Arg317, de puentes de hidrógeno con Asn307, e

2. Antecedentes

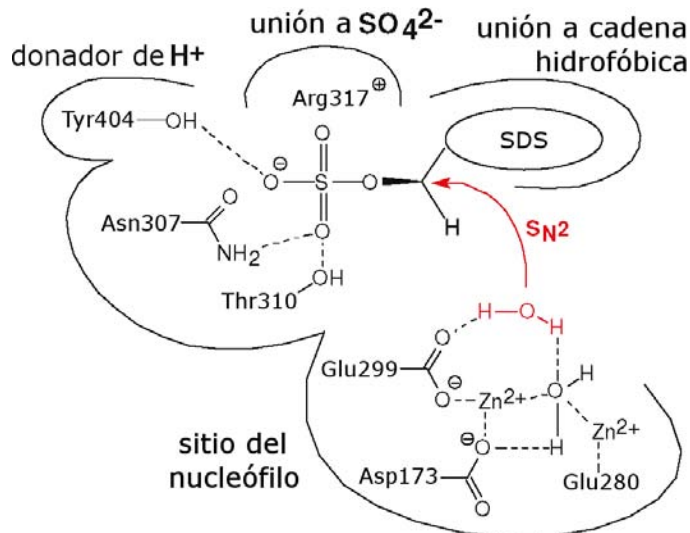


Figura 8. Mecanismo de catálisis de la sulfatasa PaSdsA1, según [59]. El mecanismo involucra el ataque nucleofílico S_N2 de una molécula activada de agua sobre el átomo de carbono adyacente al sulfato del SDS.

interacciones dipolo-dipolo entre Arg312 y el átomo de oxígeno entre los átomos de azufre y carbono.

Paso 2. Una molécula activada de agua realiza un ataque nucleofílico S_N2 sobre el átomo de carbono inicial de la cadena alifática del sustrato. La molécula de agua se activa mediante interacciones con el residuo Glu299 (lo cual aumenta el pK_a de esta molécula de agua y le permite realizar el ataque en la forma desprotonada OH⁻) y también con el hidróxido puente que coordina a ambos iones Zn²⁺.

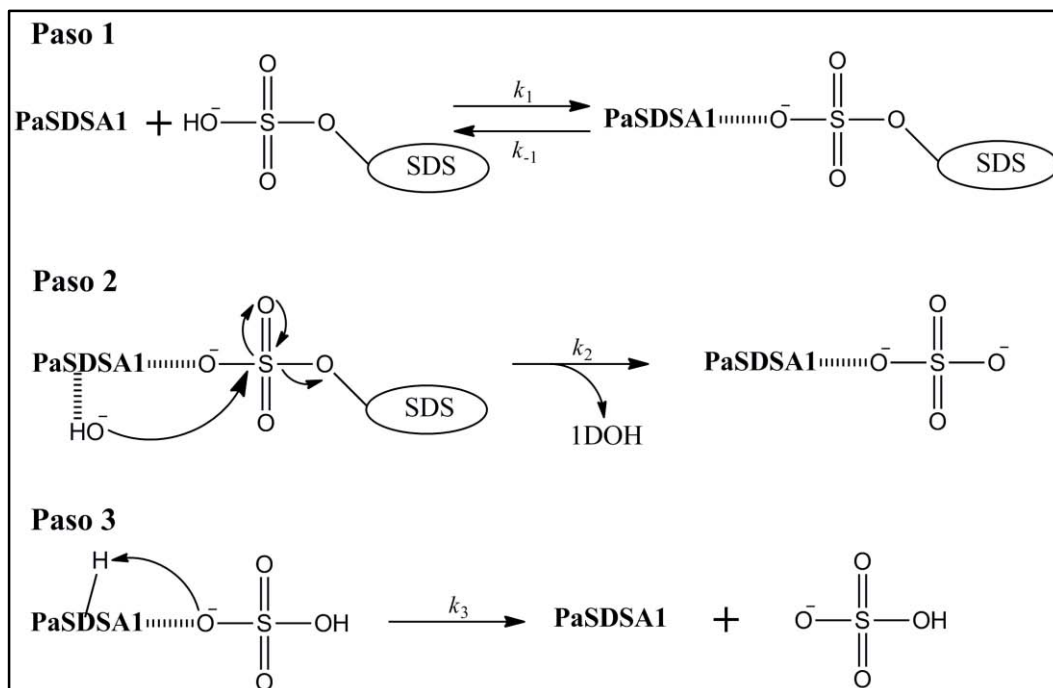


Figura 9. Mecanismo de catálisis de la PaSdsA1. Ver descripción en el texto. 1DOH representa al producto 1-dodecanol.

2. Antecedentes

Paso 3. La protonación del grupo saliente SO_4^{2-} por parte del residuo Tyr404 facilita la salida de este producto inorgánico. La expulsión del grupo HSO_4^- regenera el sitio catalítico de la enzima.

2.3.2 Características estructurales de PaSdsA1

PaSdsA1 es una proteína homodimérica muy grande (146.7 kDa) que contiene 658 residuos de aminoácido por monómero. Estas subunidades se encuentran unidas a través de un dominio de dimerización, compuesto por 140 aminoácidos, donde ambas cadenas se encuentran entrelazadas (**Figura 10.C y D**) [58]. El entrecruzado o enlace entre ambas cadenas involucra las asas que separan a las hélices α_{10} y α_{11} , y se compone de 14 aminoácidos por cadena (GYDGNPATLDPLS). Cada una de las asas penetra profundamente la subunidad adyacente, como se muestra en la **Figura**

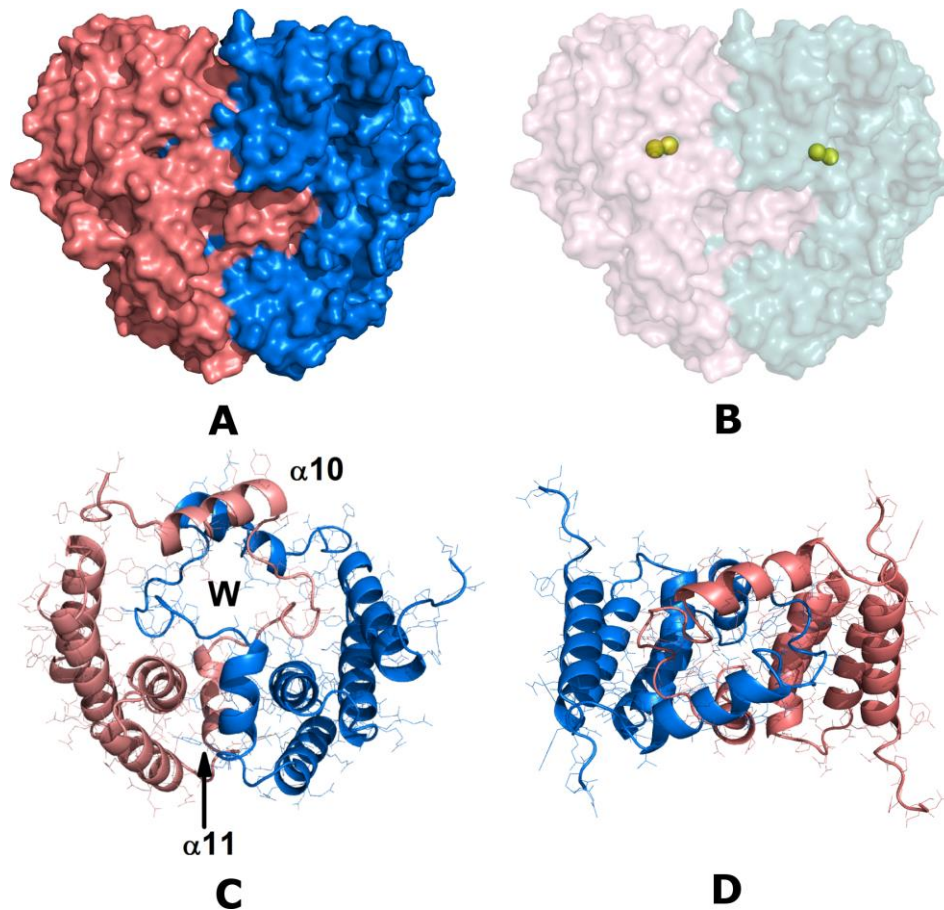


Figura 10. Estructura cristalográfica de la PaSdsA1 (PDB 2CFZ). (A) Estructura homodimérica de la sulfatasa. (B) Posición de los dos átomos de Zn en cada monómero. (C) y (D) Distintas vistas del dominio de dimerización. El entrelazamiento de las cadenas de monómeros involucra a los rizados que separan las hélices α_{10} y α_{11} . La letra W en (C) denota una cavidad ocupada por 30 moléculas de agua.

2. Antecedentes

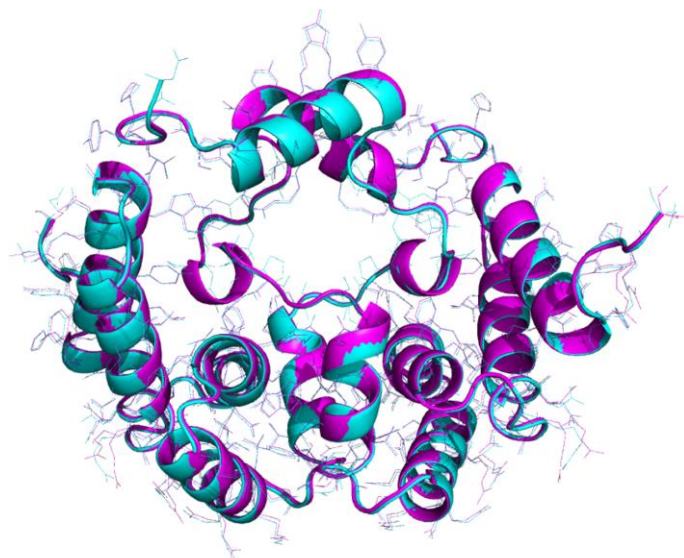
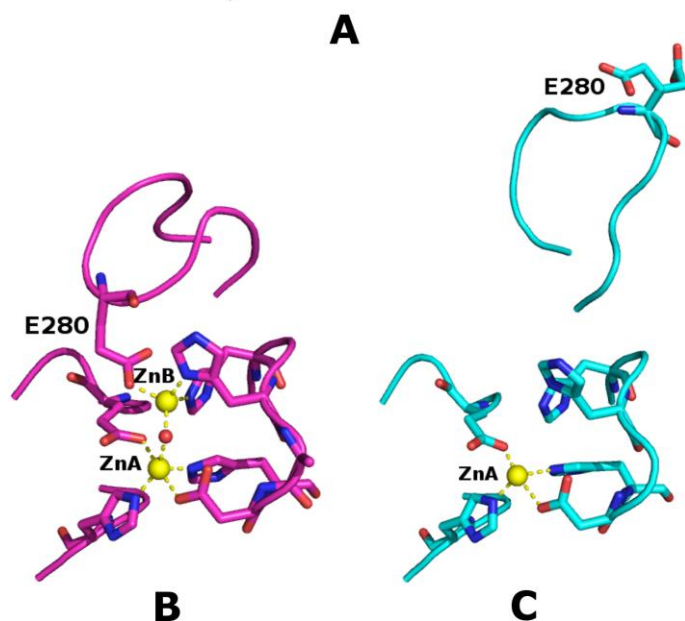


Figura 11. Diferencias estructurales entre la forma 2Zn y holo de la enzima PaSdsA1. (A) Superposición del dominio de dimerización de la forma holo (en magenta, PDB 2CFU) y de la forma 2Zn (en cian, PDB 2CG3). (B) y (C) Sitio catalítico para las formas holo y 2Zn, respectivamente. Los átomos de Zn (ZnA y ZnB) se representan mediante esferas amarillas. La esfera roja entre los átomos de Zn es la molécula de H₂O que establece enlaces de coordinación puente, enlazando ambos metales. El asa que contiene al residuo E280, el cual coordina al átomo ZnB en la forma holo, se encuentra desplazado en la forma 2Zn, exponiendo los residuos del sitio catalítico al disolvente.



10.B, C y D. Es importante remarcar el hecho de que no hay puentes disulfuro intra o intermoleculares que favorezcan esta topología debido a que la sulfatasa PaSdsA1 no contiene un solo residuo de cisteína. Dentro del entrecruzado se localiza una cavidad en la cual hay alrededor de 30 moléculas de agua (Figura 10.C).

Cuando la proteína es expresada en un medio con una cantidad reducida disponible de Zn²⁺ y cristalizada [58], se encontró una forma de la PaSdsA1 que contiene un solo átomo de Zn por monómero (denominada 2Zn). Este descubrimiento sugiere que, en disolución, las formas holo y 2Zn podrían coexistir en equilibrio químico. La Figura 11.A muestra el dominio de dimerización completo, en donde puede observarse que tanto el entrecruzado como la cavidad interna llena de moléculas de agua son idénticos tanto en la forma holo como en la forma 2Zn. La principal

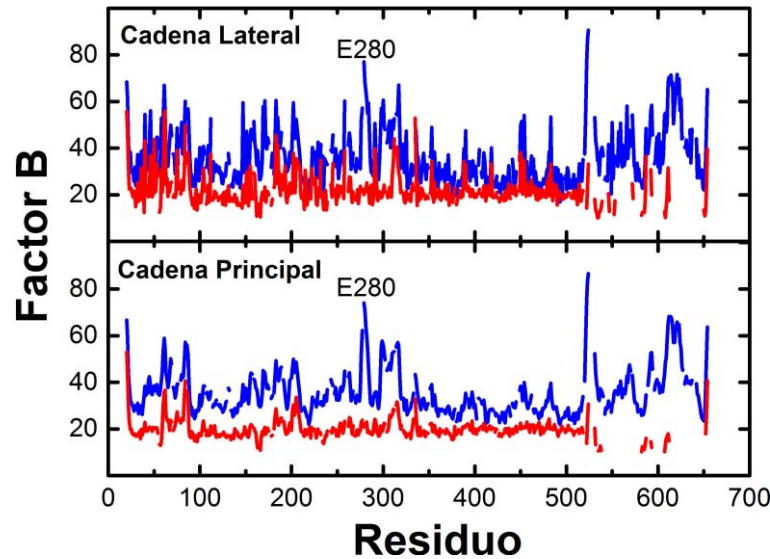


Figura 12. Factores B de temperatura para las formas 2Zn (en azul, PDB 2CFZ, resolución 2.05 Å) y holo (en rojo, PDB 2CG3, resolución 2.6 Å) de PaSdsA1. Puede observarse que la forma 2Zn es mucho más flexible que la forma holo.

diferencia entre las formas radica en la esfera de coordinación de los átomos de Zn del sitio catalítico, donde el asa que contiene al residuo E280, que coordina a uno de los átomos de Zn (ZnB), se encuentra muy desplazado en la forma 2Zn. Esto puede verse en la **Figura 11.B** y C, así como en los valores de los factores B de temperatura de las estructuras cristalinas (**Figura 12**) y en los mapas de contactos para el residuo E280 de ambas formas (**Tabla 6**, en **Apéndice**). Por otro lado, el resto de los residuos de aminoácidos de las esferas de coordinación de los iones metálicos en la forma holo (ZnA y ZnB en **Figura 11.B**) y en la forma 2Zn (ZnA en **Figura 11.C**) se encuentran sutilmente modificados por la ausencia de un átomo de Zn en la forma 2Zn (**Tabla 6**, en **Apéndice**). En general, los valores de los factores B de temperatura (**Figura 12**) muestran que el asa que contiene a E280 de la forma 2Zn tiene una mucho mayor flexibilidad conformacional que la forma holo.

Las proteínas topológicamente entrelazadas son extremadamente raras en la naturaleza, y son muy distintas de las proteínas dimericas con dominios intercambiados (domain-swapping) [118–122] y de las proteínas con nudos topológicos [123–126] (**Figura 13**). Las proteínas con dominios intercambiados se caracterizan por tratarse generalmente de oligómeros en los cuales el dominio globular de intercambio de un monómero (o en ocasiones, sólo algunos elementos de estructura secundaria) se entrelaza con otro dominio idéntico proveniente de otro monómero. De esta forma, el ambiente de elementos estructurales que rodea a cada dominio es esencialmente idéntico a aquél

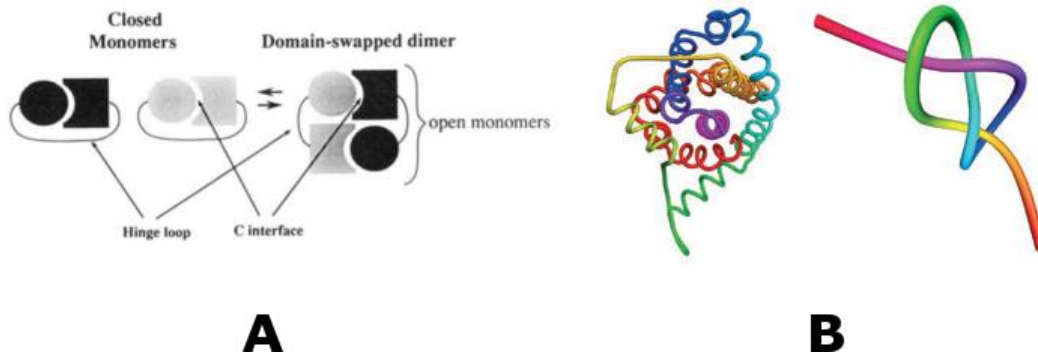


Figura 13. Topologías especiales en proteínas. (A) Representación esquemática de la formación de oligómeros en proteínas con dominios intercambiados, cuyos monómeros aislados han sufrido una perturbación estructural que permite la interacción de los dominios de intercambio con los dominios vecinos equivalentes en el monómero siguiente. El ambiente que rodea a los dominios de intercambio, una vez formado el oligómero, es esencialmente el mismo que en los monómeros iniciales. Tomado de [119]. (B) Representación del esqueleto de aminoácidos y de listón de la acetohidroxi-ácido-isómeror reductasa (1YVE), mostrando un elemento típico de proteína con un nudo topológico. Tomado de [124].

en el que se encontraba como proteína monomérica [119]. Un ejemplo representativo de proteína con dominios intercambiados es la toxina de la difteria DT [118]. En algunos casos, un intercambio consecutivo de dominios entre proteínas puede conducir a agregados de proteínas, o incluso a la formación de fibras amiloides [127,128].

Por otro lado, las proteínas anudadas son proteínas cuyos esqueletos polipeptídicos forman complejos nudos estructurales. Un estiramiento imaginario de los extremos amino y carboxilo terminales eliminaría las interacciones no covalentes presentes a lo largo de la cadena estructurada; sin embargo, en el caso de las proteínas anudadas, este estiramiento no sería capaz de deshacer el nudo de la cadena polipeptídica. Este tipo de nudos proteicos se denominan *nudos topológicos* [123]. Estas proteínas pueden ser tanto monoméricas como oligoméricas. Ejemplos representativos de estas proteínas son la acetohidroxi-ácido-isómerorreductasa de plantas [129,130], la ubiquitina hidrolasa de humano [131] y la tRNA-metiltransferasa de *Haemophilus influenzae* [132]. Existe otro tipo de nudos en los cuales la ruptura o formación de puentes disulfuro o el establecimiento de enlaces puente de coordinación con metales favorece la formación de estas topologías. Estos nudos se denominan *nudos covalentes*, los cuales pueden formarse durante o después del proceso de plegamiento [133,134].

Otros ejemplos notables de topologías poco comunes son la citrato sintasa de *Pyrobaculum aerophilum*, la peroxirredoxina III de bovino y la lisil oxidasa de *Pichia pastoris*, donde las cadenas cicladas constituyentes se encuentran concatenadas (**Figura 14** y **Tabla 2**) [135–137]. Existen

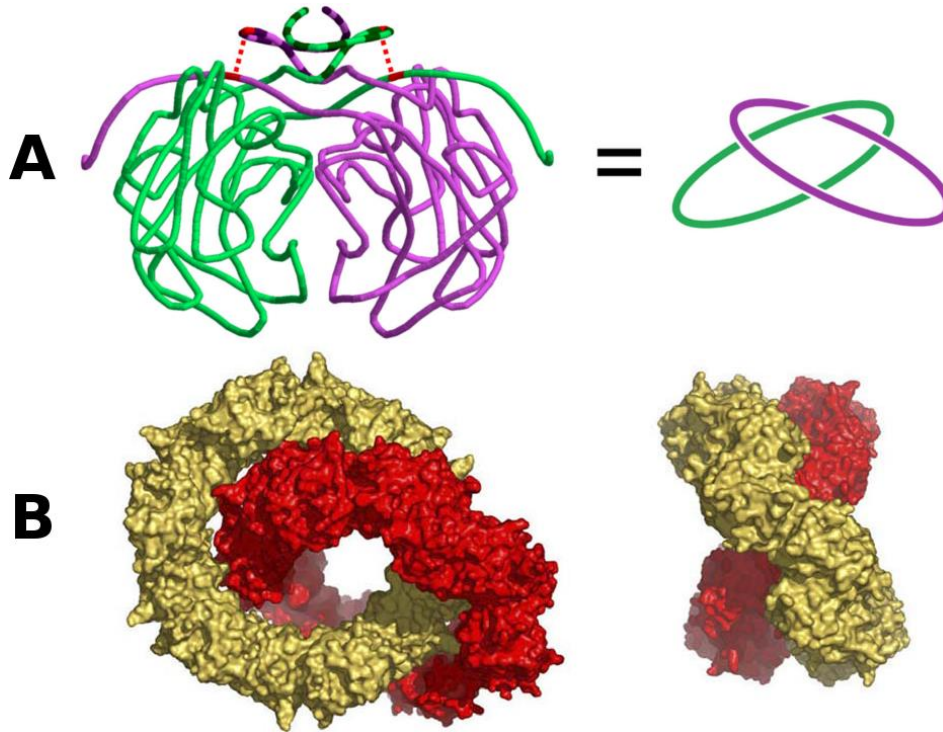


Figura 14. Ejemplos representativos de otras proteínas con cadenas entrelazadas. (A) Citrato sintasa de *Pyrobaculum aerophilum*. Los puentes disulfuro intramoleculares (líneas punteadas en rojo) son los responsables de dirigir el entrecruzamiento o concatenación topológica [135]. (B) Peroxirredoxina III de *Bos Taurus*. Dos vistas de la estructura de catenano que muestran a cada cadena ciclada en rojo y dorado. La estructura entrecruzada muestra que los planos de cada cadena forman un ángulo de 55° [136].

también proteínas donde la unión entre cadenas proteicas de concatámero se produce mediante una modificación química sobre la forma nativa de la proteína [126,136,138–142].

Una vez descritas las características principales de las topologías menos usuales en el plegamiento de proteínas, es necesario enfatizar que la enzima dimérica topológicamente entrelazada PaSdsA1 es distinta de las proteínas con dominios intercambiados y con nudos topológicos simples. En primer lugar, en la PaSdsA1 las cadenas entrelazadas no son parte de un dominio globular ni de elementos de estructura secundaria clásicos, sino que son simplemente risos que separan a las hélices α_{10} y α_{11} de cada monómero. Por otro lado, las proteínas con dominios intercambiados requieren que los monómeros iniciales sean estables en disolución y una perturbación en el plegamiento del estado monomérico nativo origine el intercambio de dominios, ya sea por la presencia de algún agente químico, o bien debido a la mutación de algún residuo relevante; sin embargo, la PaSdsA1 es producida como un dímero una vez que sale de la maquinaria traduccional de *E. coli*. En el caso de PaSdsA1, los monómeros no existen como tales en disolución acuosa. Sólo ha sido posible cristalizarla en forma dimérica [58,143]. Finalmente, la proteína

2. Antecedentes

Tabla 2. Proteínas que forman concatámeros. Se conocen únicamente 6 proteínas que forman concatámeros en la naturaleza. El resto ha sido producido a través de la ingeniería de proteínas, como $p53cat^{dim}$.

Proteína	Residuos por monómero	Cofactor	PDB	Referencia
$p53cat^{dim}$	361	-	No disponible	[141]
Citrato sintasa de <i>P. aerophilum</i>	220	-	1ZYE	[135]
Peroxisredoxina III de <i>Bos Taurus</i>	409	Mg(II)	2IBP	[136]
Ascorbato oxidasa de <i>Cucurbita pepo</i>	552	Cu(II)	1AOZ	[134]
Lisil oxidasa de <i>Pichia pastoris</i>	747	Cu(II)	1W7C	[137]
Proteína de la cápside GP5 del bacteriófago HK97	282	-	1OHG	[144]
Sulfatasa SdsA1 de <i>P. aeruginosa</i>	658	Zn(II)	2CFU, 2CG3, 2CFZ	[58]

tampoco presenta nudos topológicos puesto que si se estirasen los extremos amino y carboxilo de cada monómero simultáneamente, el entrelazado se perdería. Con estos elementos, podemos argumentar que el plegamiento observado en la PaSdsA1 tiene características propias de los concatámeros y no de proteína nudo o con dominios de intercambio.

Por último, es importante remarcar que comprender los mecanismos por los cuales las proteínas con cadenas entrecruzadas se pliegan representa un reto importante en el área de estructura de proteínas. Este conocimiento, además, podría proporcionar beneficios directos en el diseño e ingeniería de proteínas estables para uso terapéutico e industrial.

3 Hipótesis y Objetivos

3.1 Hipótesis

La disminución o eliminación de los iones metálicos del sitio catalítico de la sulfatasa PaSdsA1, producirá especies en equilibrio de la enzima con diferente contenido de cationes (formas holo y apo); será posible aislar estas poblaciones para estudiar la desnaturalización química y térmica, así como las interacciones entre la proteína y el metal con el que se coordina.

3.2 Objetivo General

Llevar a cabo una caracterización detallada de los procesos de desnaturalización y unión proteína-metal de la sulfatasa PaSdsA1.

3.3 Objetivos Particulares

1. Implementar una estrategia experimental que permita eliminar gradualmente el contenido de metales en la sulfatasa PaSdsA1 y aislar cada una de las formas resultantes.
2. Caracterizar el proceso de desnaturalización térmica y química de las formas en equilibrio de la enzima empleando Calorimetría de Barrido Diferencial y Dicroísmo Circular.
3. Caracterizar la interacción entre la sulfatasa en forma apo y el Zn^{2+} empleando Calorimetría de Titulación Isotérmica, Dicroísmo Circular, Espectroscopía UV-Visible y EPR
4. Proponer mecanismos de desnaturalización y de interacción de la PaSdsA1 con iones metálicos.

4 Materiales y métodos

4.1 Materiales

Todos los reactivos utilizados fueron de grado RA y obtenidos tanto de Sigma-Aldrich como de Nacalai Tesque (Kyoto, Japón) sin tratamiento adicional. El agua fue purificada hasta alcanzar un valor de resistividad de $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ utilizando un sistema de desionización Millipore Gradient.

4.2 Preparación y purificación de la proteína

La construcción *pasdsal::tev::his6* en el vector pUC17 fue obtenida de GenScript (Estados Unidos), donde *tev* denota la secuencia de reconocimiento de hidrólisis de la TEV proteasa. Esta construcción fue clonada en el vector de expresión pET41 a(+) (Novagen) utilizando las enzimas de restricción NdeI y BglIII. La proteína de fusión PaSdsA1-TEV-His6 fue expresada en células de *E. coli* BL21 (Novagen), crecidas en medio LB suplementado con $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de kanamicina. Las células fueron crecidas hasta alcanzar un valor de $\text{OD}_{600\text{nm}}$ de 0.75 a 37°C . La expresión de la proteína fue inducida añadiendo 0.5 mM IPTG e incubada toda la noche a 20°C . Las células fueron centrifugadas, resuspendidas y lisadas por sonicación. La purificación fue llevada a cabo utilizando columnas de afinidad NiNTA (GE Healthcare) y de exclusión molecular (Superdex 200 26/600, GE Healthcare). Con la intención de evitar interferencias debidas a la cola de histidinas, la TEV proteasa (TurboTEV, 10 000 unidades, utilizada sin purificación adicional) se agregó a la solución de proteína y la mezcla de reacción se incubó por toda la noche a 30°C . Después, la muestra fue purificada nuevamente utilizando la columna de afinidad NiNTA colectando en esta ocasión las fracciones no retenidas por la columna (**Figura 15.A**). La eliminación de la cola de histidinas también se verificó por espectrometría de masas (ver **Figura 42** **Figura 43** en el **Apéndice**). La concentración de la proteína se determinó por absorción UV-visible (Espectrofotómetro CARY-

4. Materiales y métodos

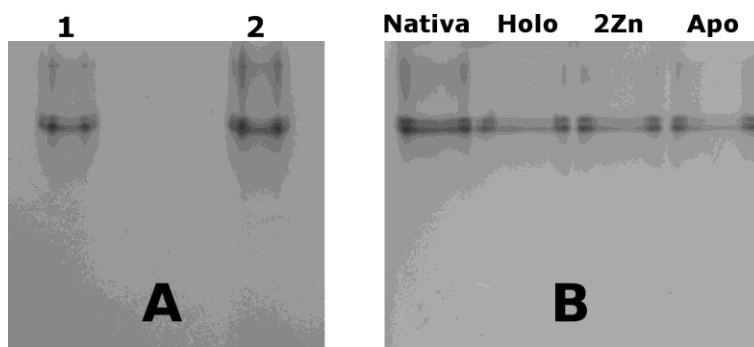


Figura 15. Electroforesis nativa de las fracciones purificadas de la enzima PaSdsA1. (A) Forma dimérica de la proteína PaSdsA1 antes (1) y después (2) de remover la cola de histidinas con la TEV proteasa. (B) Formas holo, 2Zn y apo de PaSdsA1 mostrando que todas estas formas son diméricas. La metodología para obtener separada cada una de las formas con diferente contenido de metales se detalla en la sección 4.1.1.

50, Varian) a 280 nm (coeficiente de extinción molar de $92\,250\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, obtenido de la base de datos BRENDA [145]). El rendimiento fue de 100 mg por litro de cultivo. La proteína fue concentrada hasta un valor de 15 mg mL^{-1} y conservada a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en amortiguador de 20 mM Tris pH 8.0.

Cuando la proteína en forma dimérica se calentó hasta $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ en presencia de 1.5 mM SDS (e inmediatamente enfriada a temperatura ambiente), se separaron monómeros de los remanentes dímeros y agregados amorfos utilizando cromatografía de exclusión molecular. Las fracciones monoméricas, que contenían 1.5 mM SDS, se almacenaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en amortiguador de 10 mM Tris pH 8.0. Este protocolo se estableció a partir de los experimentos que se detallarán en la **Sección 6.1**.

Todas las muestras de proteína se examinaron mediante electroforesis nativa, SDS-PAGE y Mild-SDS. Las electroforesis nativa y SDS-PAGE se llevaron a cabo como se describe en la literatura [146,147]. La electroforesis Mild-SDS se diseñó para hacer posible distinguir entre bandas monoméricas y diméricas sin tener interferencias debidas a la presencia de agregados amorfos sin disociar especies diméricas. Para este fin, se siguió el protocolo de la electroforesis SDS-PAGE, con la salvedad de que las muestras no fueron hervidas y tanto los amortiguadores de carga y de corrida carecían de DTT y de SDS. En el caso de la electroforesis Urea-PAGE, el amortiguador de corrida, el gel y la muestra de proteína contenían la misma concentración de urea (sin SDS). Esta electroforesis se utilizó para estudiar el efecto de la urea en el estado de oligomerización de la sulfatasa PaSdsA1, evitando la dilución de la urea en la muestra de proteína cuando se carga en el gel.

4.3 Dicroísmo circular

Los experimentos de dicroísmo circular (CD) se llevaron a cabo utilizando un espectropolarímetro Jasco J820 a 20 °C. Para los experimentos de CD lejano, la concentración empleada de proteína fue de 0.219 mg mL⁻¹ en amortiguador de 20 mM HEPES a pH 8.0, en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de urea. Se utilizó HEPES en lugar de Tris como amortiguador para evitar interferencias en los espectros por parte del Tris. Para los experimentos de CD cercano, la concentración de proteína fue de 1 mg mL⁻¹. Se utilizaron celdas de cuarzo de 1 mm y 1 cm de longitud de paso óptico para adquirir los espectros de CD lejano y cercano, respectivamente. Los espectros se reportan como elipticidad molar ($[\theta]$, deg cm² dmol⁻¹) después de haber sustraído la línea base.

4.4 Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC)

Los experimentos de calorimetría de barrido diferencial (DSC) se llevaron a cabo utilizando un microcalorímetro Auto-DSC capilar (GE Healthcare) y un microcalorímetro VP-DSC (Microcal). Las disoluciones de proteína se prepararon dializando exhaustivamente contra amortiguador 20 mM Tris pH 8.0 libre de metales (ver más adelante). La concentración de proteína fue de 1 mg mL⁻¹. Para los experimentos de control cinético de la desnaturalización de la PaSdsA1, se utilizaron diferentes velocidades de barrido en el intervalo 0.5-3.5 °C. Los datos obtenidos se ajustaron al modelo de dos estados irreversible descrito en [148–150].

4.5. Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC)

4.5.1 Cinética Enzimática

Los experimentos de actividad catalítica de la sulfatasa PaSdsA1 utilizando Calorimetría de titulación isotérmica (ITC) se llevaron a cabo utilizando un microcalorímetro VP-ITC (Microcal) a 20 °C. Para seguir la reacción por ITC, se preparó una disolución desgasificada de PaSdsA1 en una concentración de 50 nM en amortiguador de 20 mM Tris pH 8.0 y se introdujo en la celda de muestra del calorímetro. La jeringa se cargó con una disolución de SDS, concentración 3.5 mM en el mismo amortiguador, y se realizó una única inyección en la celda de 40 µL en 68.4 s, hasta alcanzar una concentración de sustrato en la celda de 100 µM, con agitación de 550 rpm. La traza calorimétrica se adquirió hasta que la reacción se concretó (una hora y media). En la **Figura 16** se muestra un termograma típico para un experimento de cinética enzimática y el correspondiente

4. Materiales y métodos

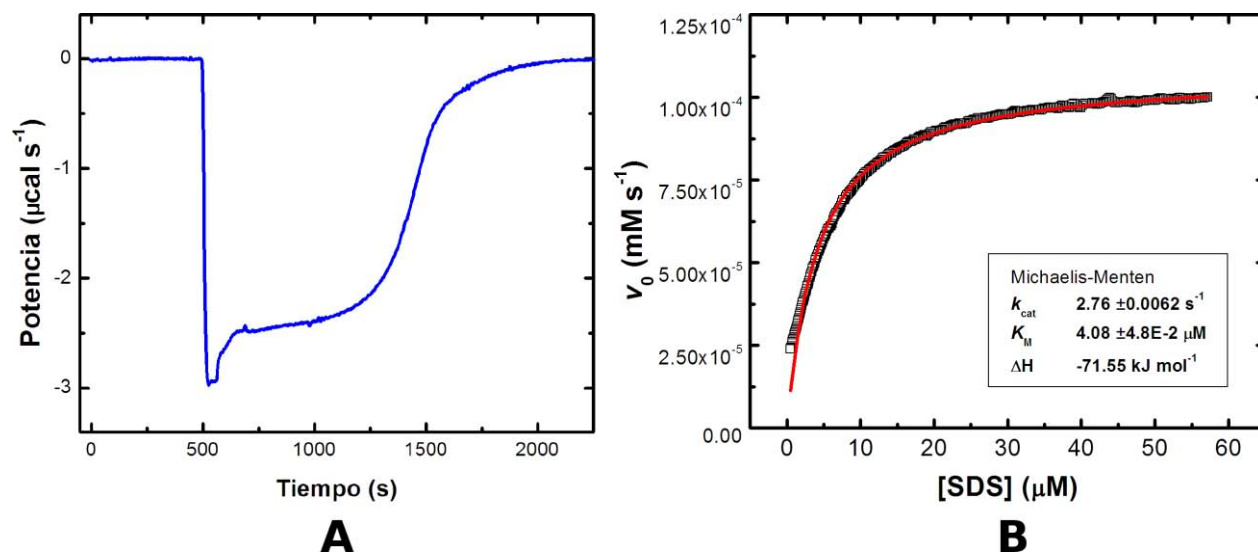


Figura 16. Caracterización cinética de la PaSdsA1 en forma holo por ITC. (A) Termograma clásico obtenido en un experimento de una única inyección de cinética enzimática seguido por ITC. (B) Ajuste al modelo de Michaelis-Menten.

ajuste al modelo de Michaelis-Menten. El tratamiento detallado de datos y ecuaciones se ha reportado ya en trabajos previos [151–153].

3.5.2 Interacción proteína-metales

Los experimentos de titulación se desarrollaron a 20 °C en amortiguador de 50 mM Tris pH 8.0 suplementado con 100 mM NaCl [154]. El amortiguador en este caso se optimizó para evitar interferencias debidas a la precipitación de hidróxidos de Zn^{2+} y Cu^{2+} en ausencia de agentes quelatantes suaves (ver **Figura 17**) [155–159]. La disolución de la forma apo de PaSdsA1 se concentró utilizando tubos Amicon Ultra Centrifugal Filters 30 000 MW hasta alcanzar concentraciones entre 10 y 15 μM . La concentración de proteína se determinó como se indicó en la sección 3.2. Las disoluciones de sales metálicas ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) se prepararon inmediatamente antes de llevar a cabo el experimento. La concentración de las mismas quedó determinada por la concentración alcanzada de la forma apo para cada experimento independiente, encontrándose en el intervalo de 250 a 300 μM . Para cada experimento, se realizó la correspondiente dilución de sal metálica en el amortiguador de titulación. En todos los casos, se realizaron 60 inyecciones, la primera de 1 μL y las 59 restantes de 5 μL , con periodos de 1 500 s entre cada inyección. Después de restar los experimentos de dilución, los datos se ajustaron a los modelos de cuatro reacciones secuenciales, cuatro sitios independientes, y un modelo híbrido de ambos, utilizando el software AFFINImeter, disponible en <http://www.affinimeter.com>.

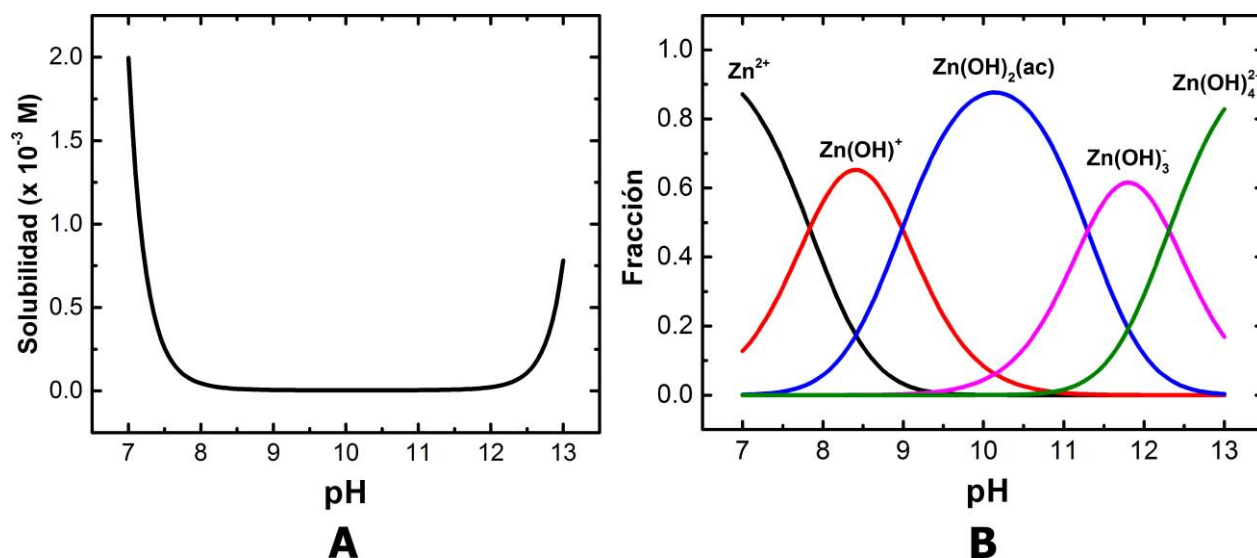


Figura 17. Efecto del pH en la solubilidad del Zn(II). (A) Curva de solubilidad del ZnSO₄ como función del pH, mostrando que, en valores de pH ligeramente básicos (entre 8 y 12), el Zn(II) es muy poco soluble. (B) Gráfica de distribución de especies solubles de Zn(II) como función del pH. Estas gráficas fueron generadas tomando los datos experimentales reportados en [155].

4.6 Cuantificación del contenido de Zn²⁺ en las muestras de proteína

El contenido de Zn²⁺ se determinó utilizando un ensayo colorimétrico [160,161]. En este método, el 4-(2-piridilazo)-resorcinol (PAR) se utilizó para coordinar los metales libres en el medio y seguir el espectro de absorción utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (CARY-50, Varian). Las curvas patrón (en amortiguador de *i*) 20 mM Tris pH 8.0 libre de metales; *ii*) 20 mM Tris pH 8.0 suplementado con 1.5 mM SDS; y *iii*) 20 mM Tris pH 8.0 (suplementado con 8 M urea), se obtuvieron utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de longitud de paso óptico en el intervalo de concentración de Zn²⁺ de 0-10 μM y PAR en concentración de 100 μM (ver **Figura 18**). A diferencia del procedimiento reportado por [160,161], las muestras de proteína desnaturalizada no se obtuvieron incubando en altas concentraciones de Gdn-HCl, sino calentando hasta 85 °C para el caso (*i*) o hasta 93 °C para el caso (*ii*). Para el caso (*iii*), el tiempo de incubación en 8 M urea fue de 5 días. En todos los casos, las muestras fueron centrifugadas y filtradas y determinada la absorción a 500 nm (máxima absorción para el compuesto de coordinación PAR-Zn). Es importante remarcar que utilizando este método permite determinar la cantidad de metales liberada al medio por la proteína cuando ésta es sometida a desnaturalización térmica o química. La correcta aplicación de este método requiere que todo el material empleado sea de plástico tratado previamente para eliminar cantidades traza de otros metales interferentes. El tratamiento consiste

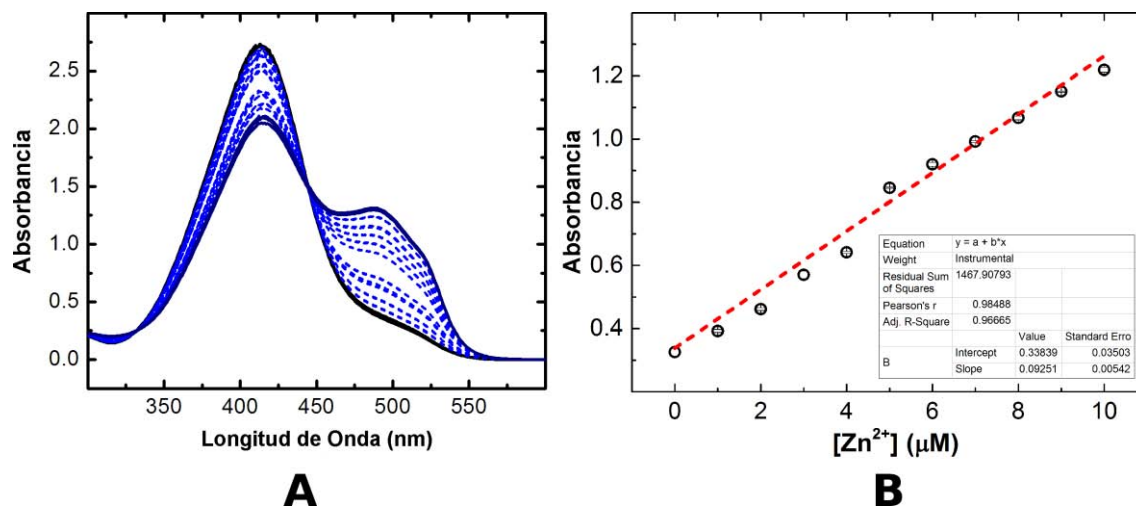


Figura 18. Determinación espectroscópica de metales pesados por el método de PAR [160,161]. (A) Espectros de absorción del 4-(2-Piridilazo)-resorcinol (100 μM) en amortiguador 20 mM Tris pH 8.0 suplementado con 1.5 mM SDS, en presencia de cantidades crecientes de Zn²⁺ (0 μM Zn²⁺ en línea continua negra, 10 μM Zn²⁺ en línea continua azul marino). (B) Curva patrón elaborada con los valores de absorbancia de PAR a 500 nm.

en lavar el material con una disolución de 0.5 M HCl, luego incubar con 4 mM EDTA por dos días con agitación constante, después enjuagar exhaustivamente con agua desionizada y, finalmente, secar cuidadosamente con N₂ de alta pureza.

4.7 Titulación espectroscópica de la forma apo con Cu²⁺

La titulación espectroscópica de la forma apo con Cu²⁺ es posible debido a que este metal es paramagnético, a diferencia del Zn²⁺, lo cual nos permite seguir tanto por espectroscopía UV-Visible como por dicroísmo circular diversas transiciones electrónicas entre los orbitales ligante-metal y metal-metal (ver **Figura 32**). En la sección de **Resultados y discusión** se profundizará con más detalle en los fundamentos teóricos de estas técnicas. La estrategia experimental se diseñó siguiendo protocolos ya reportados [104,162]:

4.7.1 Dicroísmo circular y espectroscopía UV-Visible.

Una disolución de la forma PaSdsA1-apo 100 μM en amortiguador de 20 mM MOPS pH 8.0 [156,159] se tituló con una disolución acuosa de Cu²⁺ hasta alcanzar 8 equivalentes de Cu²⁺ por dímero. Los espectros fueron adquiridos a 20 °C utilizando una celda de cuarzo de longitud de paso óptico de 1 cm para UV-Vis y de 2 cm para CD. Los espectros resultados se sometieron a un ajuste global simultáneo a curvas gaussianas, utilizando el software Origin 8.0.

3.7.2 Espectroscopía EPR

Las muestras para los experimentos de resonancia paramagnética electrónica, concentración de 50 μM de PaSdsA1-apo, se prepararon en amortiguador de 20 mM MOPS pH 8.0 suplementado con 30 % v/v de glicerol. Se añadió Cu^{2+} en disolución acuosa hasta alcanzar 2, 3 y 4 equivalentes de Cu^{2+} por dímero, en experimentos independientes. Los espectros de EPR se colectaron utilizando un equipo EMX Plus Bruker System con ER 049 XG Microwave Bridge. Los experimentos se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones experimentales: Posición del campo 2500 G, Centro del campo 3200 G, Amplitud del barrido 1 400 G, factor g de la muestra 2.0000, modulación de la amplitud 2, tiempo de barrido 41.95, constante del tiempo 40.96 ms, escaneos 50.

4.8 Tensiometría de gota pendiente

Las mediciones fueron desarrolladas utilizando un tensiómetro de gota pendiente (OCA, Dataphysics, Alemania) con una cámara USB de alta resolución (max. 123 imágenes s^{-1}) y una celda casera diseñada y construida con vidrio óptico (Hellma, Alemania). Las imágenes de los perfiles de gota se colectaron cada minuto y fueron almacenadas para su posterior procesado. Las tensiones superficiales se obtuvieron aplicando la ecuación de Young-Laplace.

5 Esquema general de presentación de resultados y discusión

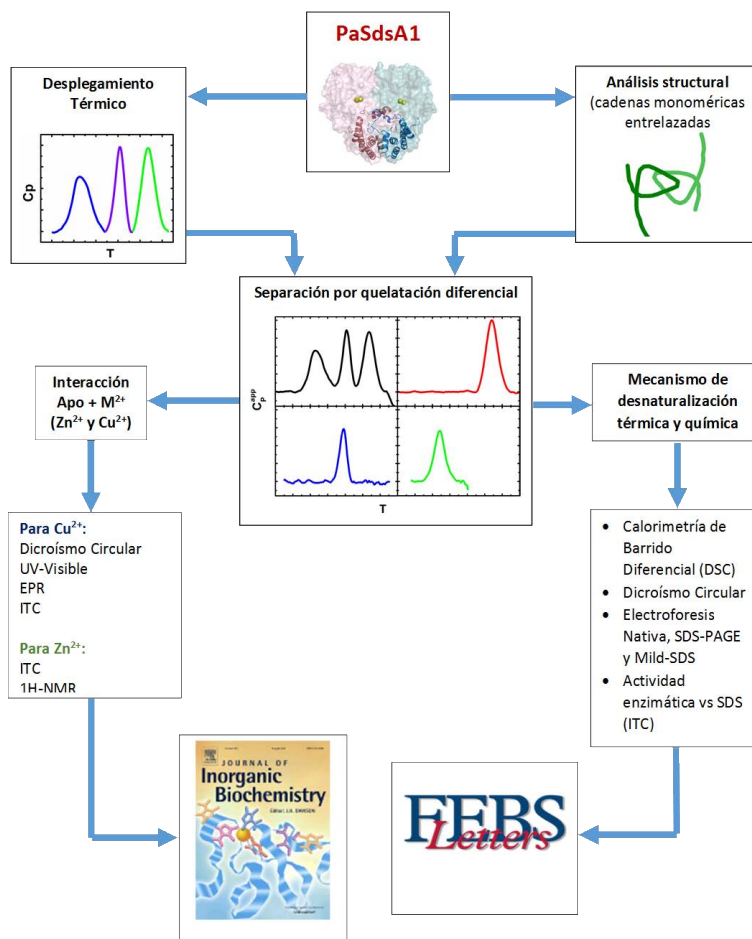


Figura 19. Diagrama general de resultados.

Los resultados globales se han organizado como se ilustra en la **Figura 19**. Por un lado, se presentan los resultados obtenidos desde el punto de vista de las rutas de desplegamiento de la PaSdsA1 utilizando técnicas calorimétricas y espectroscópicas, principalmente. Esto nos permitió proponer un mecanismo de desplegamiento térmico y químico para la forma holo de la proteína. En el caso de la vía térmica, la proteína se desnaturaliza con una separación simultánea de los monómeros formadores y la agregación. La ruta química no implica la disociación en monómeros, sino que permite que el dominio de dimerización se conserve, permitiendo que el desplegamiento en presencia de urea sea un proceso reversible. Por otro lado, habiendo logrado obtener la proteína libre de metales, se estudió el mecanismo de unión de Zn²⁺ a la proteína por ITC. También se

5. Resultados y discusión

realizó la sustitución de Zn^{2+} por Cu^{2+} , con lo cual fue posible seguir la unión de los iones metálicos por espectroscopías UV-Vis, CD y EPR. Los datos en conjunto sugieren un mecanismo de unión secuencial proteína-metal. Los resultados de la primera parte se han publicado en la revista FEBS Letters, mientras que los de la segunda parte están en preparación para enviarse a la revista Journal of Inorganic Biochemistry.

6 Desnaturalización de la PaSdsA1

6.1 Desnaturalización térmica

Los resultados de los experimentos de desnaturalización térmica de la PaSdsA1 seguida por DSC mostró tres picos principales, como se muestra en la **Figura 20**. Para descartar la posibilidad de un mecanismo de desnaturalización disociativo, se realizaron pruebas de desnaturalización térmica con diferentes concentraciones iniciales de proteína; sin embargo, no se observó

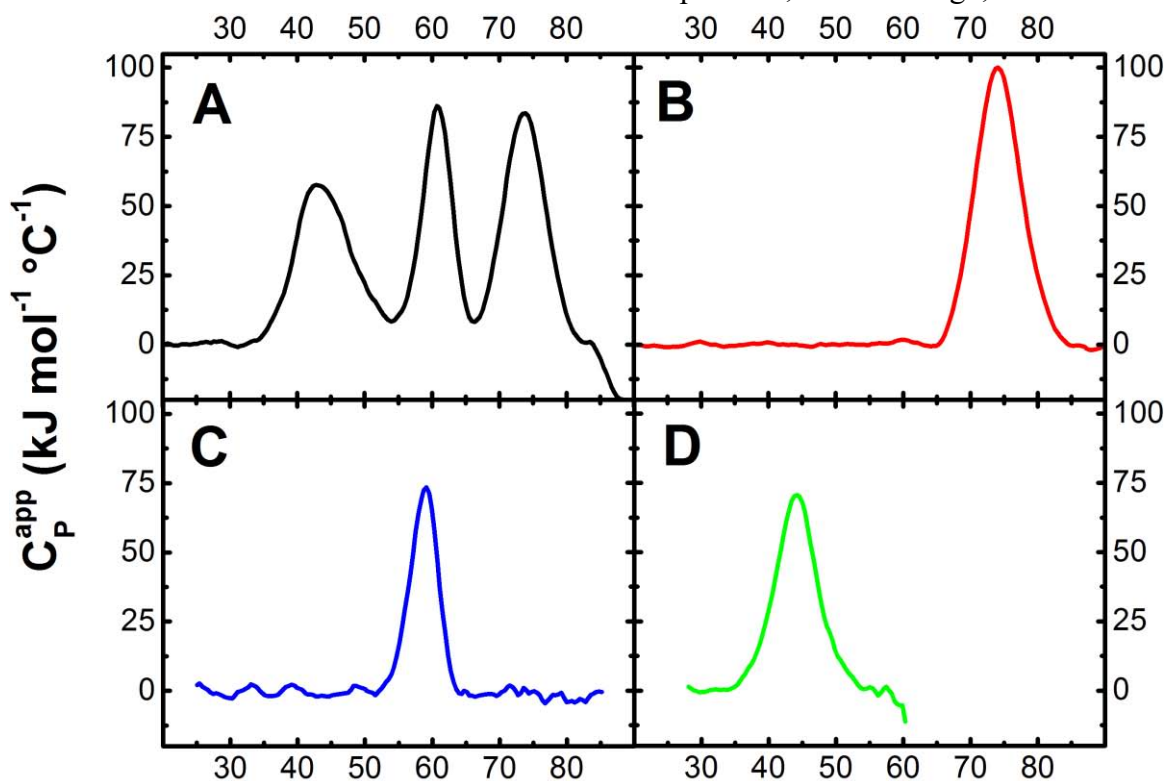


Figura 20. Desnaturalización térmica de la proteína PaSdsA1. (A) Dímero nativo. (B) Forma holo (cuatro átomos de Zn); (C) la forma 2Zn (dos átomos de Zn por dímero) y (D) la forma apo (sin átomos de Zn). Los protocolos para obtener las muestras presentadas en los paneles B, C y D se describen en el texto. La velocidad de barrido fue $1.5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

6. Desnaturalización de la PaSdsA1

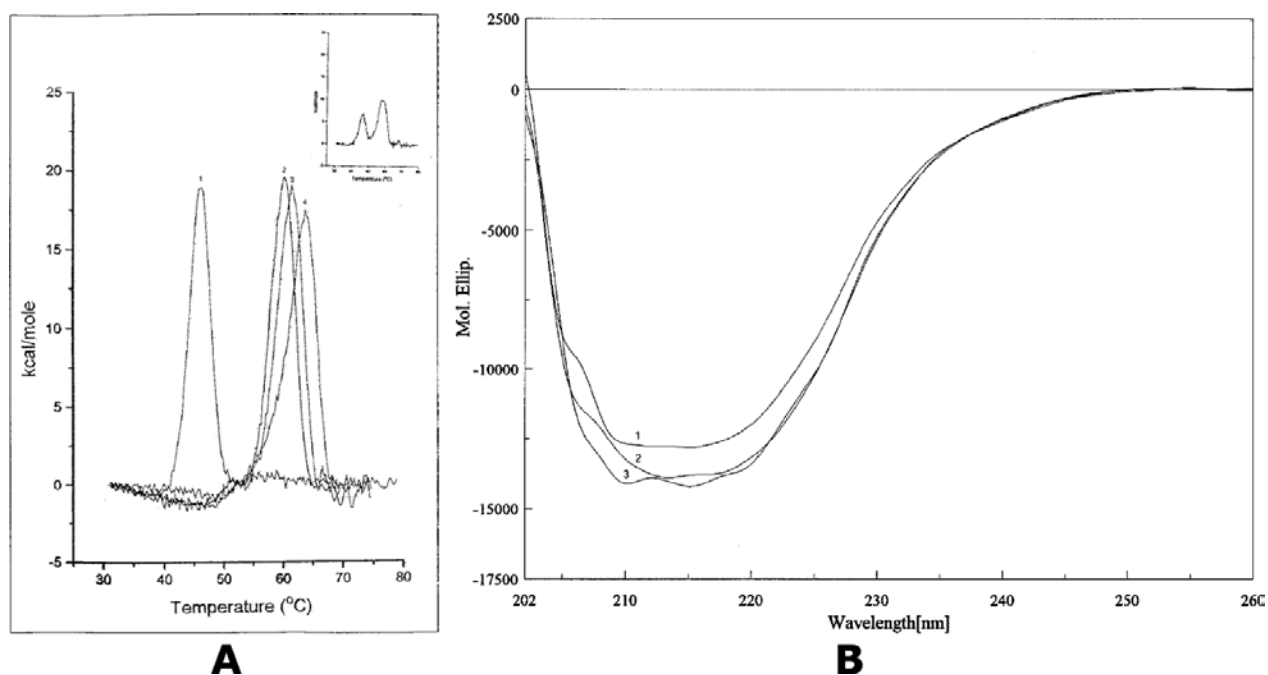


Figura 21. Metalo- β -lactamasa AE036 de *Aeromonas hydrophila*. (A) Experimentos DSC de la metalo- β -lactamasa AE036 de la forma apo (1), y de la proteína purificada en presencia de 0 (2), 1 (2) y 10 (3) equivalentes de Zn^{2+} . El termograma en el recuadro muestra el termograma de la forma apo después de haber añadido 0.67 equivalentes de Zn^{2+} . (B) Espectros de dicroísmo circular de las enzimas apo (1), mono-Zn (2) y di-Zn (3). Tomado de [164].

modificación alguna en los valores de T_m de los picos. Inspirados en algunos reportes previos [92,105,163,164], hemos realizado desmetalaciones de metalo- β -lactamasas utilizando tratamientos quelatantes con EDTA. Para el caso particular de la metalo- β -lactamasa AE036 de *Aeromonas hydrophila*, la eliminación de iones metálicos resultó estar asociada con la aparición de picos con valores inferiores de T_m al estudiarse la desnaturalización por DSC (Figura 21) [164]. Con estos antecedentes, se desarrolló la siguiente estrategia experimental: (a) La proteína se precalentó hasta 70 °C y se enfrió a temperatura ambiente. Después de este tratamiento, se observaron algunos agregados, los cuales se eliminaron centrifugando a 12 000 rpm por 10 minutos y luego filtrando a través de una membrana con 0.22 μm de tamaño de poro. Este procedimiento permitió observar únicamente al pico de alta temperatura (Figura 20.B). (b) Cuando otra muestra de proteína se incubó a temperatura ambiente por 24 horas en presencia de 75 mM EDTA, calentado a 50 °C, centrifugada y filtrada como en (a), se observó solamente al pico con T_m de 60 °C (Figura 20.C). (c) Por último, cuando una muestra de proteína se trató con 200 mM EDTA por 48 horas y en presencia de la resina Chelex (aproximadamente 1g por 100 mg de enzima), centrifugada y filtrada, el experimento de desnaturalización por DSC mostró únicamente la

6. Desnaturalización de la PaSdsA1

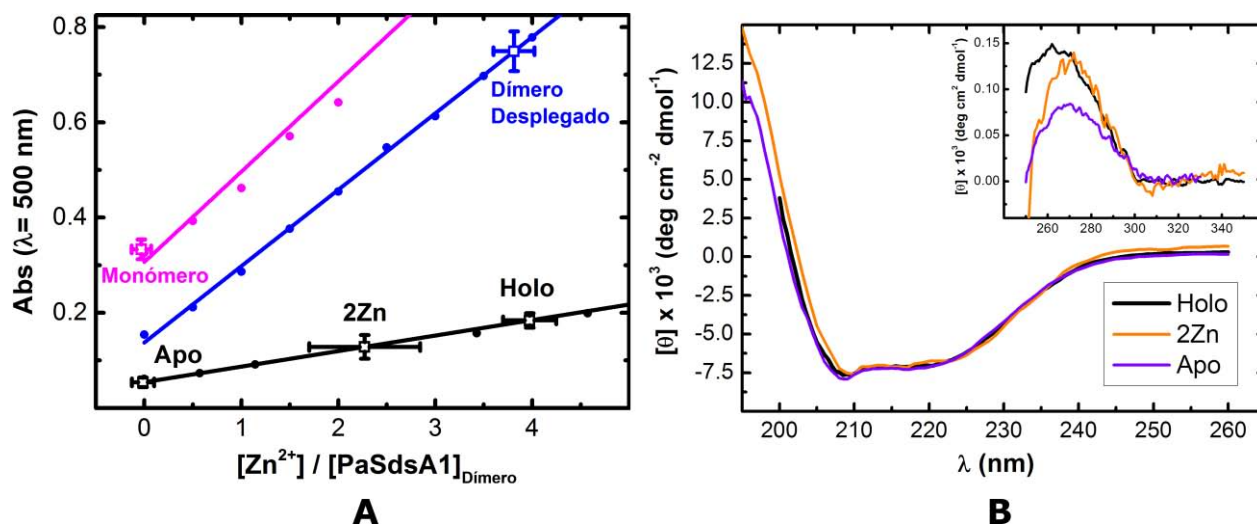


Figura 22. Cuantificación del contenido de metales y espectros CD de las tres formas de PaSdsA1. (A) Determinación del contenido de Zn²⁺ utilizando el método de PAR (sección 3.6). Este método determina la cantidad de metales liberados al medio por la proteína cuando es sometida a desnaturalización. Este método se utilizó para: (1) cada una de las tres formas de la enzima; (2) el dímero desplegado y (3) el monómero plegado. Los medios fueron: 20 mM Tris pH 8.0 con la curva patrón en negro para (1); 8 M, 20 mM Tris pH 8.0 con la curva patrón en azul para (2); y 1.5 mM SDS, 20 mM Tris pH 8.0 con la correspondiente curva patrón en magenta para (3). La desnaturalización de la proteína se llevó a cabo calentando hasta 85 °C para (1) y a 93 °C para (3). **(B)** Espectros CD-lejano para las formas holo, 2Zn y apo de PaSdsA1. El gráfico insertado muestra los espectros CD-cercano para las mismas muestras.

transición de baja temperatura (**Figura 20.D**). Todas las proteínas mostradas en la **Figura 20** son dimericas y su concentración se determinó como se indica en la sección **4.2 Preparación y purificación de la proteína**.

Utilizando el método espectroscópico de PAR [160,161], se determinó el número de iones Zn²⁺ por dímero para cada una de las tres muestras que produjeron las transiciones de la **Figura 20**. Los resultados de esta cuantificación se muestran en la **Figura 22**. La **Figura 22.A** muestra que cada transición en los experimentos de desnaturalización por DSC corresponde con proteínas con diferente contenido de Zn por dímero: cuatro (forma holo, T_m 74 °C), dos (forma 2Zn, T_m 60 °C) y cero (forma apo, T_m 45 °C). Estos datos indican que en la forma nativa de la sulfatasa PaSdsA1 estas tres formas coexisten en equilibrio químico, cada una de ellas con diferente número de átomos de Zn. La coexistencia de estas tres especies no es una consecuencia de la maquinaria postraduccional de *E. coli*, como se verá más adelante. Aun induciendo la síntesis de la proteína en presencia de Zn(II), siguieron observándose proporciones variables de las tres especies del estado nativo. Analizando los espectros de dicroísmo circular (**Figura 22.B**), encontramos que las estructuras secundarias de estas tres formas son casi idénticas. Los espectros de CD-cercano

6. Desnaturalización de la PaSdsA1

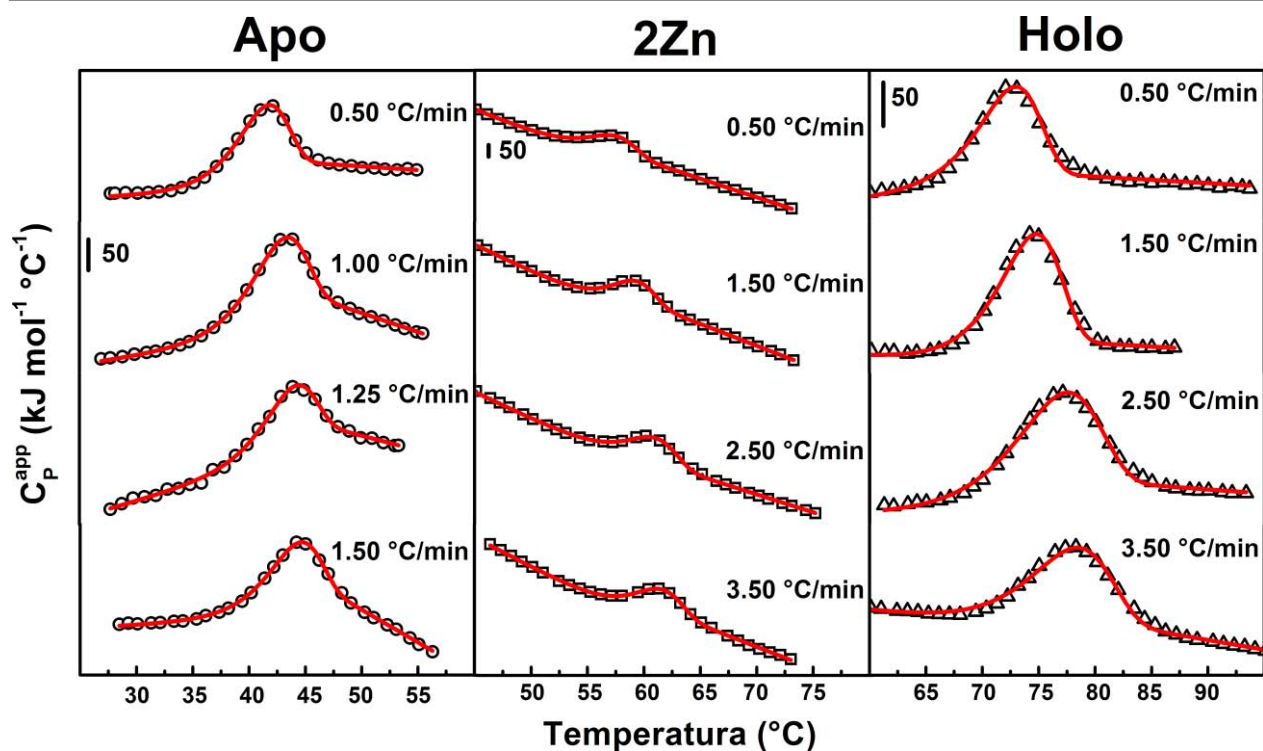


Figura 23. Termogramas DSC para las formas apo, 2Zn y holo de PaSdsA1. Los símbolos representan los datos experimentales de capacidad calorífica aparente, mientras que las líneas continuas son los mejores ajustes utilizando el modelo de dos estados irreversible [148–150]. Notar que, para mayor claridad, los perfiles calorimétricos fueron desplazados en el eje Y.

(gráfica insertada en la **Figura 22.B**) muestran un cambio significativo en intensidad y en longitud de onda máxima, indicando que las estructuras terciarias de las tres formas son diferentes en cierto grado. Claramente, los átomos de Zn juegan un rol crucial en la estabilidad térmica de estas proteínas. Existen grandes diferencias entre sus valores de T_m (con una velocidad de barrido de 1.5 °C min^{-1}): 74.5, 61.1 y 44 °C para las formas holo, 2Zn y apo, respectivamente. Esta misma situación se observó en la metalo- β -lactamasa AE036 de *Aeromonas hydrophila* (**Figura 21**, [164]). La diferencia en los valores de T_m entre las formas holo y 2Zn (13 grados) no pueden atribuirse a cambios en estructura secundaria, la cual no resulta afectada por el desplazamiento del rizo observado en la forma 2Zn (ver **Figura 11.B** y **C**). De hecho, la disminución en la T_m puede atribuirse a la modificación en la esfera de coordinación de los iones metálicos, la cual se acompaña por un gran desplazamiento del rizo que contiene al residuo E280 y, en general, a la mayor flexibilidad conformacional de la proteína entera, como se puede verse en los valores de los factores B de temperatura (ver **Figura 12** y **Tabla 6**). El desplegamiento térmico de las formas holo, 2Zn y apo se estudió utilizando DSC a diferentes velocidades de barrido. La **Figura 23** muestra que las trazas calorimétricas fueron dependientes de la velocidad de barrido, implicando que el mecanismo

6. Desnaturalización de la PaSdsA1

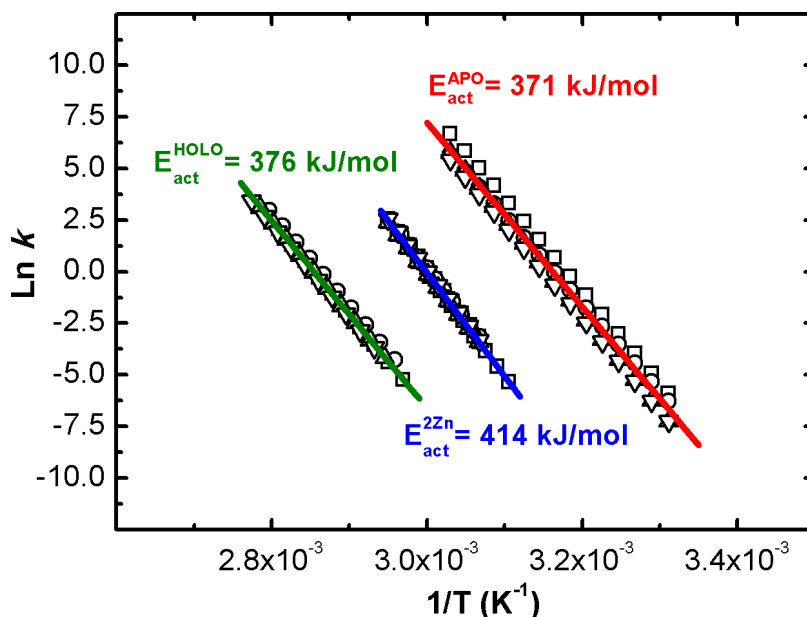


Figura 24. Gráficas de Arrhenius para la desnaturalización térmica irreversible de las formas holo, 2Zn y apo de PaSdsA1. Los símbolos en la gráfica corresponden a diferentes velocidades de barrido utilizadas en los experimentos DSC (ver **Figura 23**). Las líneas representan los mejores ajustes a la ecuación de Arrhenius $k = \exp\left[-\frac{E_{act}}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T^*}\right)\right]$.

de desnaturalización es un proceso controlado cinéticamente [148]. En todos los casos, las corridas de recalentamiento no mostraron transición alguna, lo cual implica que la desnaturalización térmica de las tres formas del estado nativo de la PaSdsA1 es irreversible. De hecho, una examinación visual de las muestras tras el calentamiento descrito reveló la formación de agregados amorfos irreversibles. Las trazas de la **Figura 23** se ajustaron al modelo de dos estados irreversible, el cual ha sido descrito ampliamente en los trabajos publicados en [148–150]. En este modelo, el estado nativo se convierte a un estado final F, incapaz de plegarse nuevamente para regenerar el estado nativo, a través de un proceso de primer orden y, a su vez, caracterizado por una constante de equilibrio K y una energía de activación E_{act} , obtenida de una gráfica tradicional de Arrhenius. La energía de activación corresponde a la barrera energética entre el estado nativo y el estado de transición. Los resultados del ajuste se presentan en la **Figura 24**. En proteínas globulares, los valores de E_{act} oscilan entre 100 y 800 kJ mol⁻¹ [148]. Los valores de E_{act} de las tres formas de PaSdsA1 se encuentran cercanas entre sí: 370.3 ± 5.7 , 415.6 ± 40.6 y 371.4 ± 6.6 kJ mol⁻¹ para las formas holo, 2Zn y apo, respectivamente. Puede verse entonces que el contenido de Zn no es un factor determinante en la estabilidad cinética de las tres formas de la enzima, por lo cual los estados de transición podrían ser estructural y energéticamente similares.

6. Desnaturalización de la PaSdsA1

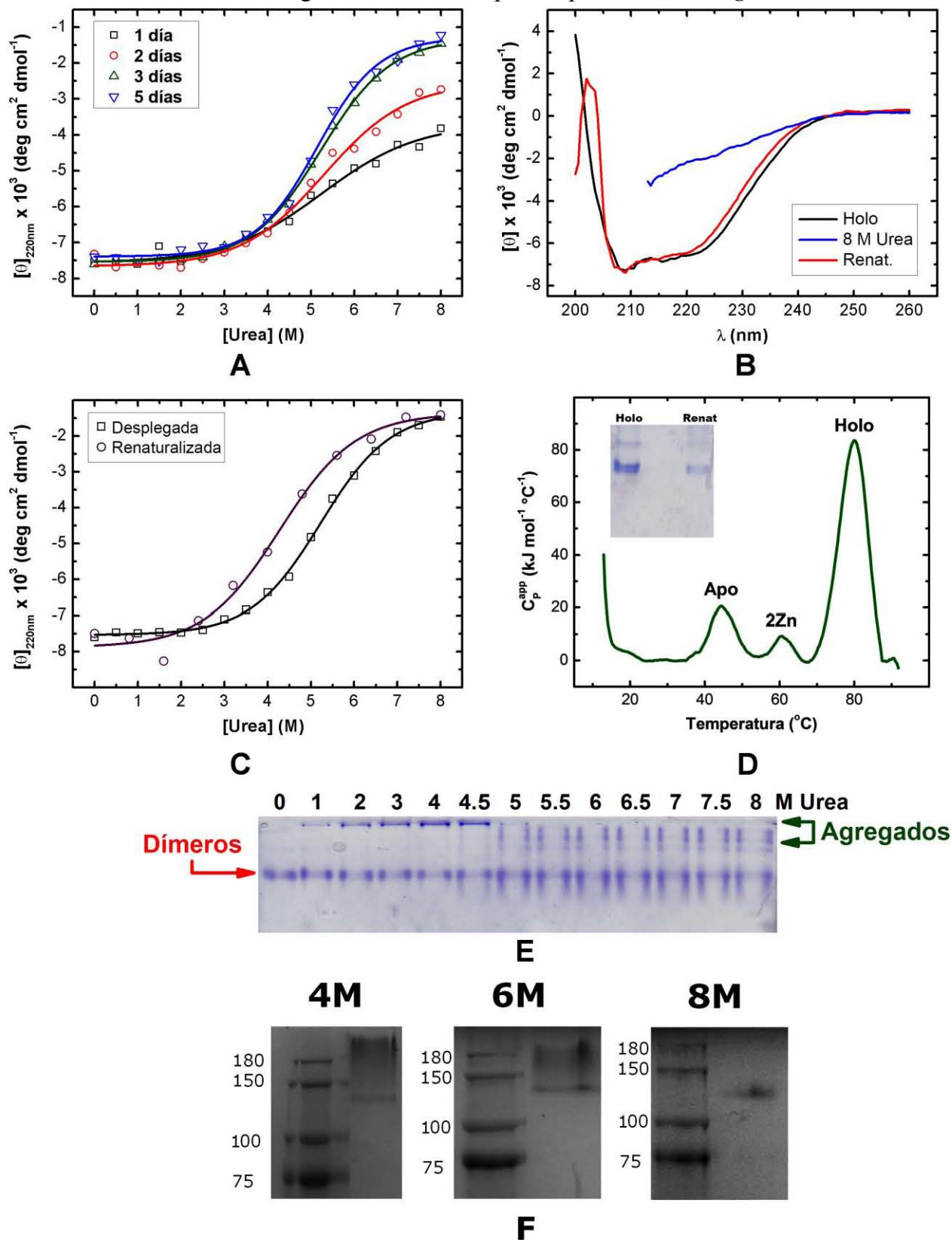
6.2 Desnaturalización química inducida por urea

Distintas muestras de proteína PaSdsA1, en la forma holo, preparadas como se describió anteriormente, fueron incubadas en diferentes concentraciones de urea, desde 0 hasta 8 M, por diferentes periodos de tiempo. Los patrones de desplegamiento seguidos por dicroísmo circular se presentan en la **Figura 25.A**, indicando que el equilibrio se alcanza después de tres días de incubación en el agente desnaturalizante. La **Figura 25.B** muestra los espectros CD de la proteína holo nativa, de una muestra incubada por 5 días en 8 M urea y de una muestra adicional tratada también por 5 días en 8 M urea, pero de la cual el desnaturalizante ha sido removido. Estos espectros indican que el proceso de desplegamiento químico es reversible. Para poder analizar más detalladamente la reversibilidad del proceso, se obtuvieron espectros CD de muestras incubadas en otras concentraciones de urea (ver **Figura 25.C**). Las curvas de desplegamiento y renaturalización no se traslapan debido a que en los experimentos de renaturalización el sistema no había alcanzado aún el equilibrio, esto es, las muestras previamente incubadas por cinco días en 8 M urea fueron diluidas a diferentes concentraciones de urea y se les corrieron los correspondientes espectros CD inmediatamente (en sólo unos cuantos minutos); sin embargo, la semejanza entre la señal observada para las muestras desnaturalizadas y las renaturalizadas a bajas concentraciones de urea indican que el desplegamiento es reversible, a pesar de que el experimento presentado no se encuentre al equilibrio.

La naturaleza de la proteína desnaturalizada fue revelada por electroforesis nativa y se presenta en la **Figura 25.E**, donde es posible observar que aún en altas concentraciones de urea la especie dimérica continúa presente. Esto no es un artefacto producido por la dilución de las muestras cuando son cargadas en el gel nativo, en donde podría observarse una renaturalización a partir de proteínas monoméricas desplegadas, las cuales adoptarían la forma dimérica al diluirse la urea. Para probar que esto último no tiene fundamento, se diseñó un experimento en el cual tanto el gel como los amortiguadores de corrida contenían la misma cantidad de urea que la muestra de proteína a analizarse (ver **Sección 4.2**, Preparación y purificación de la proteína, Urea-PAGE). Los resultados se muestran en la **Figura 25.F**, donde puede observarse que la banda dimérica continúa presente, pero no puede verse ninguna banda monomérica. Con esto se prueba que el estado oligomérico de la proteína desnaturalizada químicamente es el dímero.

6. Desnaturalización de la PaSdsA1

Por otro lado, utilizando nuevamente el método de PAR, se determinó que el dímero desnaturalizado no retiene ningún ion Zn^{2+} , como puede apreciarse en la **Figura 22.B**. Por lo tanto,



6. Desnaturalización de la PaSdsA1

Figura 25. Desnaturalización química de la forma holo de PaSdsA1. La muestra fue preparada como se indicó en la sección 4.1.1. **(A)** Efecto del periodo de incubación seguido por espectroscopia CD. El equilibrio fue alcanzado después de 3 días de incubación. A partir de los datos de equilibrio (periodo de incubación de 5 días), el cambio de energía libre de Gibbs para la desnaturalización de la forma PaSdsA1 dimérica holo al dímero desplegado (D^*), $\Delta G^{H_2O}_{D \rightarrow D^*}$, se estimó y se encontró que tiene un valor de 17.45 kJ mol^{-1} con un valor de m de 3.31 $\text{kJ mol}^{-1} \text{M}^{-1}$. **(B)** Espectros CD de la proteína nativa, de una muestra incubada 5 días en 8 M urea y de esta última muestra habiendo eliminado el agente desnaturalizante (concentración final de urea aproximada de 0.5 M). Los valores de elipticidad molar a 220 nm para los procesos de desnaturalización y renaturalización se muestran en **(C)**; para el desplegamiento, las muestras se incubaron por 5 días en urea mientras que la renaturalización fue estudiada sin tiempo de incubación alguno, diluyendo las muestras de proteína desde 8 M urea hasta las concentraciones finales de urea indicadas. **(D)** Traza calorimétrica DSC de la proteína renaturalizada a partir del estado desplegado en 8 M urea. La figura insertada en el panel es un gel nativo de la forma holo dimérica y de la proteína renaturalizada una vez que se ha eliminado la urea. **(E)** Electroforesis nativa en presencia de las concentraciones indicadas de urea para muestras incubadas por 5 días. En 1 M urea, se observa una pequeña cantidad de agregados; sin embargo, conforme la concentración de urea se incrementa, estos agregados se solubilizan. **(F)** Electroforesis Urea-PAGE (ver **sección 3.2**) para muestras holo diméricas incubadas por 5 días en 4, 6 y 8 M urea. Tanto el amortiguador de corrida como el gel contenían la misma concentración de urea. En cada una de estas concentraciones de urea, el carril izquierdo muestra el marcador de peso molecular, mientras que en el carril derecho fue cargada la muestra de proteína. En los tres geles se observa la banda correspondiente al dímero (peso molecular 146.7 kDa), mientras que la banda de monómeros se encuentra ausente (peso molecular 73.4 kDa).

en términos generales, los resultados presentados en la **Figura 25** sugieren fuertemente que el entrelazamiento de las cadenas presente en el dominio de dimerización se preserva en el estado desplegado, y que éste es el elemento que permite que el proceso de desnaturalización inducida químicamente sea reversible. Después de renaturalizar la muestra tratada previamente en 8 M urea, los formas holo (mayoritariamente), 2Zn y apo fueron producidas nuevamente, como se probó mediante DSC. Las correspondientes trazas calorimétricas se presentan en la **Figura 25.D**. La reaparición de las tres formas del estado nativo ocurre en ausencia de chaperoninas y muy claramente confirma la presencia de las tres especies del estado nativo de la PaSdsA1 no es una consecuencia de la maquinaria traduccional del sistema de sobreexpresión *E. coli*. Más aún, aparentemente la afinidad de la sulfatasa PaSdsA1 es lo suficientemente alta como para que el dímero desplegado, pero que conserva las cadenas entrelazadas del dominio de dimerización, es capaz de reclutar los iones Zn^{2+} presentes en el medio durante el proceso de renaturalización. Una situación similar de recaptación de Zn ha sido observada en el caso de la metalo- β -lactamasa AE036 de *Aeromonas hydrophila* [164].

6. Desnaturalización de la PaSdsA1

6.3 Disociación de dímeros y estabilización de monómeros

Con la intención de evaluar si las cadenas monoméricas producto de la desnaturalización térmica pueden desanudarse sin la producción de agregados amorfos, diversas muestras de la PaSdsA1 en la forma holo se incubaron en presencia de 1.5 mM SDS (la concentración utilizada rutinariamente en los protocolos de electroforesis SDS-PAGE [147]) y se calentaron hasta diferentes temperaturas, después se enfriaron inmediatamente a temperatura ambiente y se analizaron utilizando la electroforesis Mild-SDS (ver sección 3.2, Preparación y purificación de la proteína), con una concentración de SDS en el gel de 1.5 mM. El correspondiente gel se presenta en la **Figura 26.A**. Se puede observar que, para las muestras precalentadas hasta 80 °C, la proteína se conserva como dímero, mientras que cuando se calientan hasta 90 °C comienza a aparecer la banda correspondiente al monómero. A 100 °C ya no se observa señal alguna del dímero,

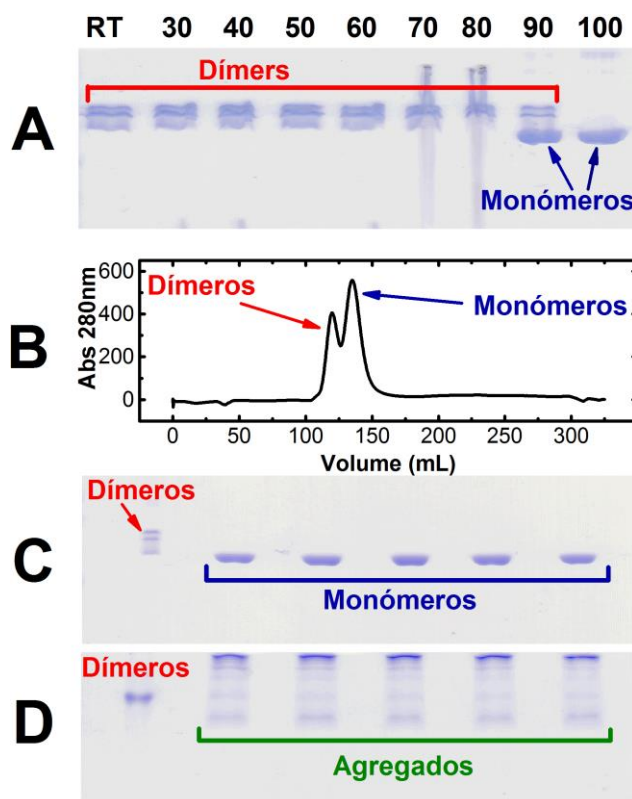


Figura 26. Disociación de dímeros y estabilización de monómeros por el SDS. (A) Gel Mild-SDS de distintas muestras de la forma holo precalentadas a las temperaturas indicadas desde temperatura ambiente (RT) hasta 100 °C, en el amortiguador de trabajo suplementado con 1.5 mM SDS. (B) Cromatografía de exclusión molecular de la muestra precalentada a 90 °C. El amortiguador de elución contiene 1.5 mM SDS. (C) Gel Mild-SDS de las muestras eluidas de la columna de exclusión molecular: una fracción correspondiente al pico de bajo volumen de elución y cinco fracciones del pico de alto volumen de elución. (D) Gel nativo de las muestras descritas en (C). El amortiguador de trabajo es 20 mM Tris pH 8.0.

6. Desnaturalización de la PaSdsA1

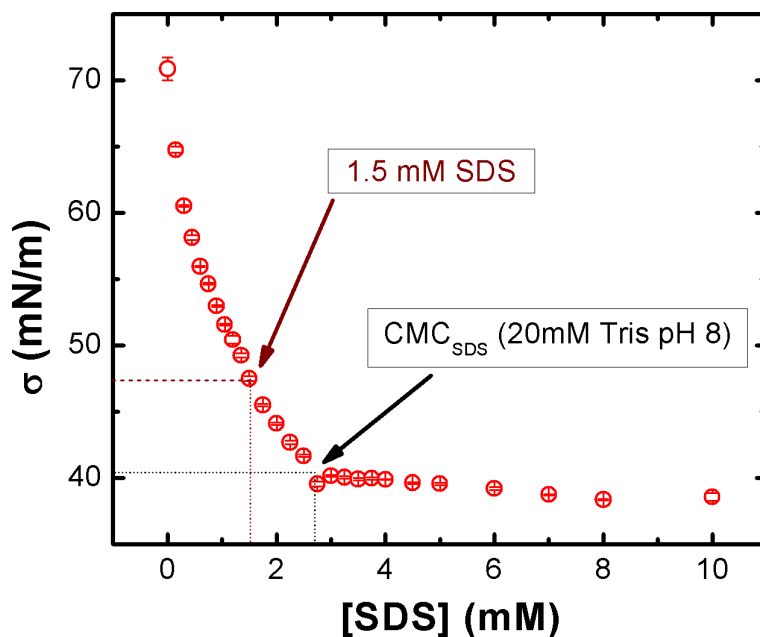


Figura 27. Tensión superficial del dodecilsulfato de sodio (SDS) en el amortiguador empleado. El valor de la concentración micelar crítica (cmc) del SDS en 20 mM Tris pH 8.0 se encontró que es 2.75 mM. La concentración de SDS (1.5 mM) utilizada para estabilizar a los monómeros de PaSdsA1 se encuentra en la región premicelar.

únicamente monómeros. La muestra precalentada hasta 90 °C se sometió a una separación por cromatografía de exclusión molecular, cuyo cromatograma se presenta en la **Figura 26.B**. Esta técnica permitió observar dos picos principales. La naturaleza de las proteínas responsables de estos picos se verificó por electroforesis Mild-SDS (**Figura 26.C**), que mostró que el pico de bajo volumen de elución corresponde a la proteína dimérica, mientras que el pico de alto volumen de elución está asociado con la proteína disociada en monómeros. Si el SDS es removido, como ocurre en una electroforesis nativa al diluir el SDS en el pozo del gel (**Figura 26.D**), los monómeros forman inmediatamente agregados amorfos, mientras que los dímeros se conservan como tales sin agregarse. Sin embargo, hay que mencionar que la presencia del SDS también tiene un efecto estabilizador en la proteína dimérica. En la **Figura 28.A** puede observarse que el SDS produce un incremento en el valor de la T_m de 18 °C con respecto a la proteína sin SDS. Por esta razón, en la **Figura 26.A** los dímeros parecen disociarse por arriba de los 74.5 °C, temperatura de desnaturalización de la proteína holo dimérica sin SDS. Por lo tanto, la completa desnaturalización y la concomitante disociación del dímero en monómeros, en presencia de SDS, sólo es posible si la proteína se calienta por arriba de los 93 °C. También es importante remarcar algunos puntos clave con respecto a las condiciones de SDS en la **Figura 26**: (i) la concentración de trabajo de SDS se encuentra por debajo de la concentración micelar crítica en el amortiguador 20 mM Tris pH 8.0

6. Desnaturalización de la PaSdsA1

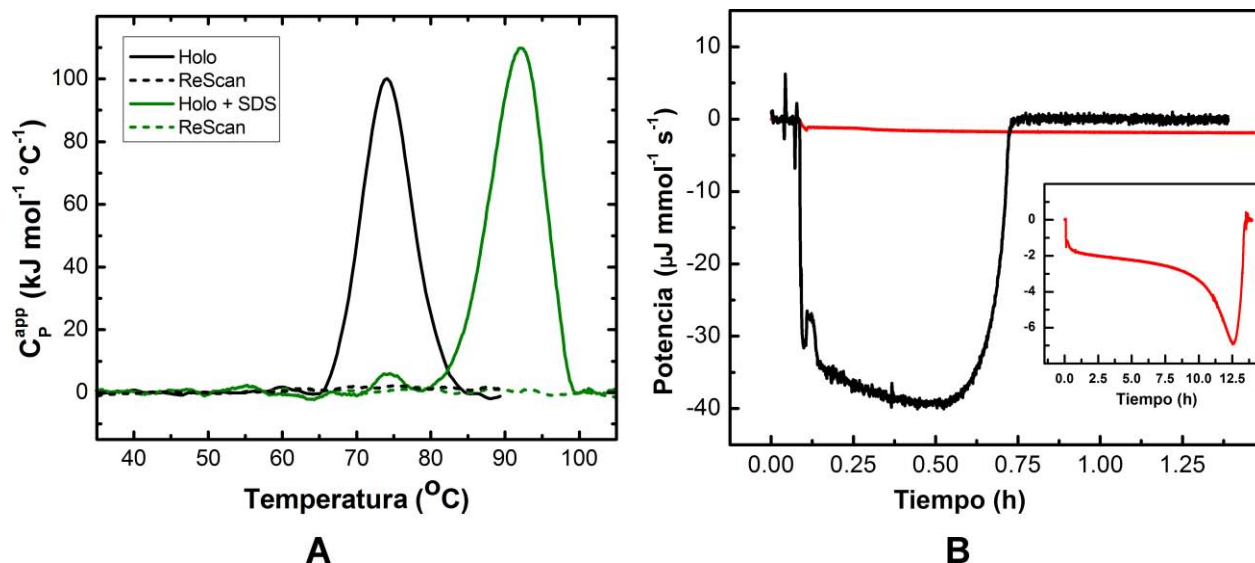


Figura 28. Efecto del SDS sobre el perfil calorimétrico y la actividad enzimática de PaSdsA1 en forma holo. (A) Trazas calorimétricas en presencia y ausencia de 1.5 mM SDS apuntan a una diferencia significativa en los valores de T_m . Los correspondientes rescans no muestran transición alguna, indicando que en ambos casos el proceso de desnaturalización es irreversible. La velocidad de calentamiento fue 1.5 K min^{-1} . El termograma completo de la muestra con SDS presenta un pico agudo a bajas temperaturas, asociado con la temperatura de Krafft del SDS [191–193] en estas condiciones particulares (ver **Figura 30**). (B) Actividad enzimática de la forma PaSdsA1 holo seguida por Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC) a $20 \text{ } ^\circ\text{C}$. A partir de los datos crudos de potencia como función del tiempo, pueden obtenerse gráficos de velocidad de reacción contra concentración de sustrato y, realizando ajustes no lineales a la ecuación de Michaelis-Menten, determinarse los parámetros del estado estacionario (k_{cat} y K_M) [152]. La traza en negro corresponde a un experimento en el cual la proteína PaSdsA1 fue colocada en la celda del calorímetro en concentración de 50 nM, mientras que la jeringa fue llenada con el sustrato (SDS) a 3.5 mM. Una única inyección de $40 \mu\text{L}$ fue realizada. La concentración final de SDS en la celda fue de $100 \mu\text{M}$. Bajo estas condiciones, la reacción concluyó en 45 minutos. La traza en rojo (inset) corresponde a un experimento en donde 1.5 mM SDS se colocó en la celda calorimétrica y la jeringa se llenó con PaSdsA1 a una concentración de $1.75 \mu\text{M}$. Una única inyección de $40 \mu\text{L}$ fue realizada. La concentración final de PaSdsA1 en la celda fue de 50 nM. La traza muestra que en presencia de SDS a 1.5 mM la reacción concluye sólo después de 14 horas.

(2.75 mM). Esto se demostró mediante tensiometría de gota pendiente y los resultados se presentan en la **Figura 27**. (ii) La concentración empleada de SDS también tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad hidrolasa de la sulfatasa PaSdsA1 (hay que recordar que el SDS es el sustrato de esta enzima). A través de experimentos de cinética enzimática utilizando ITC (**Figura 28.B**), se demostró que en el sistema se presenta el fenómeno de inhibición por sustrato, por lo cual la presencia del producto 1-dodecanol es mínima y la hidrólisis completa del SDS se da sólo después de 13 horas de incubación con la enzima. Con estos dos elementos, podemos concluir que la estabilización de los monómeros por el SDS no se produce por la presencia de micelas del tensoactivo ni por la formación del 1-dodecanol. Aparentemente, los monómeros de la PaSdsA1

6. Desnaturalización de la PaSdsA1

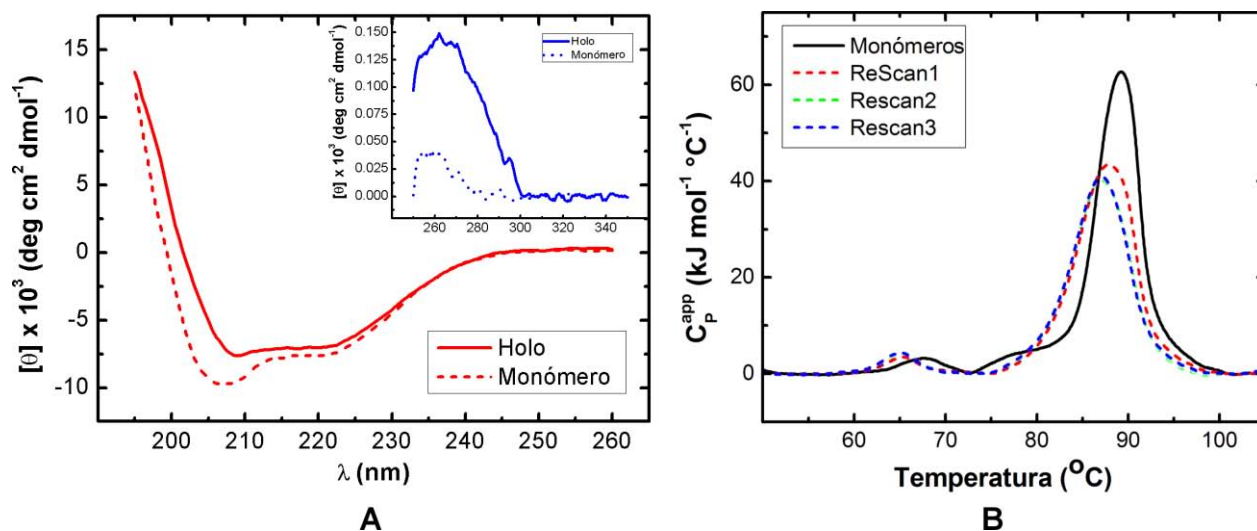


Figura 29. Caracterización estructural y desnaturalización térmica de la forma PaSdsA1 monomérica en presencia de 1.5 mM SDS. (A) Espectros CD-lejano para una muestra de PaSdsA1 monomérica (eluida de la columna de exclusión molecular (ver **Figura 26.B**)) y para dímeros holo. La gráfica insertada muestra los espectros CD-cercano para las mismas muestras. **(B)** Perfiles calorimétricos de muestras monoméricas (eluidas como en la **Figura 26.B**), mostrando también tres rescans. La velocidad de barrido fue de 1.5 K min⁻¹. El termograma completo presenta un pico a bajas temperaturas, asociado con la temperatura de Krafft en estas condiciones particulares **Figura 30**. La forma holo se preparó como se indicó en la **Sección 4.2.1**.

son estables en disolución únicamente en presencia de 1.5 mM SDS, mientras que los dímeros son estables con o sin SDS en el medio. La estabilización de proteínas por el SDS es un fenómeno que ha sido observado anteriormente en proteínas de membrana y en algunas proteínas globulares [165,166]. En resumen, los resultados de la **Figura 26** indican que la desnaturalización térmica favorece la disociación de dímeros, desanudando el entrelazado topológico de las cadenas en el dominio de dimerización, y produciendo monómeros que son estables en disolución gracias a la acción de las moléculas de SDS.

6.4 Características estructurales y desnaturalización térmica de los monómeros

Se estudiaron las características estructurales de los monómeros de la PaSdsA1 por dicroísmo circular en presencia de 1.5 mM de SDS. En la **Figura 29.A** se presentan los espectros CD lejano y cercano. Es posible apreciar que los espectros de los monómeros difiere ligeramente de la correspondiente forma dimérica, particularmente alrededor de los 210 nm. Por otro lado, los espectros de CD-cercano indican que la estructura terciaria del monómero se encuentra más desordenada. Para conocer más detalladamente las características de estos monómeros, se llevó a cabo la cuantificación de Zn²⁺ utilizando el método de PAR, descrito anteriormente, en presencia

6. Desnaturalización de la PaSdsA1

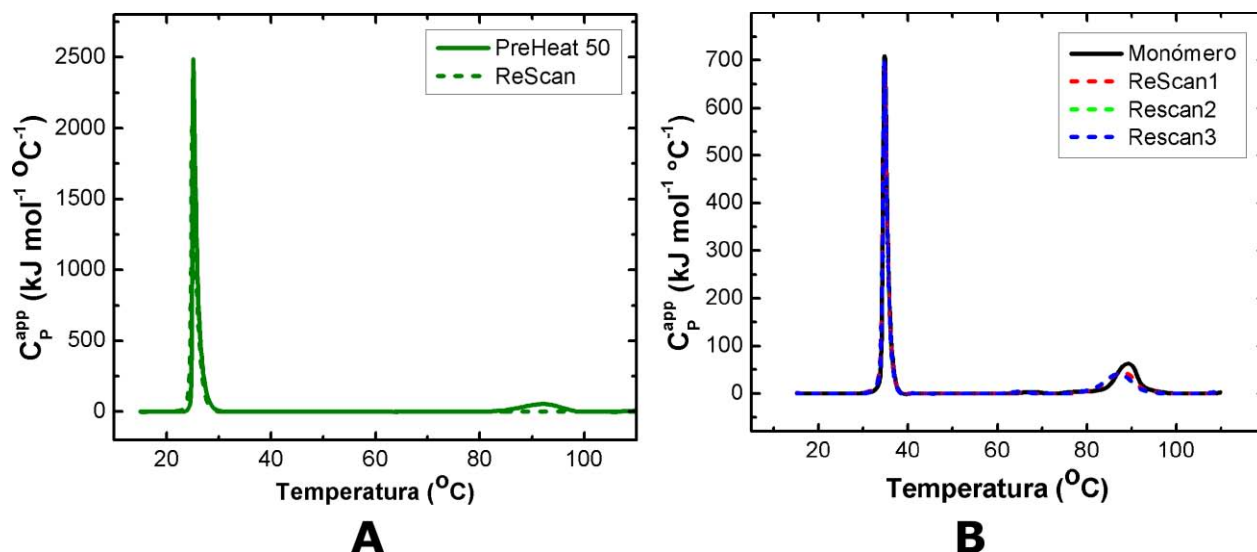


Figura 30. Trazas calorimétricas de la forma holo de la PaSdsA1 precalentada a 50 $^\circ\text{C}$ en presencia de 1.5 mM SDS (A) y de los monómeros eluidos de la columna de exclusión molecular en amortiguador suplementado con 1.5 mM SDS (B). Las transiciones observadas a bajas temperaturas están relacionadas con la temperatura de Krafft del SDS en las condiciones dadas; esto es en amortiguador de 20 mM Tris pH 8.0 en presencia de dímeros de proteína (A) o bien, la forma monomérica (B). Las transiciones de alta temperatura se describen en el texto y en las **Figura 28** y **Figura 29**.

de 1.5 mM SDS (ver **Figura 22.A**), procedimiento en el cual se determinó que los monómeros no retienen cantidad alguna de metales. En comparación con la forma dimérica de la PaSdsA1, los monómeros parecen ser estructuralmente más débiles y pierden la capacidad de unirse con los iones Zn^{2+} ; sin embargo, retienen algunos elementos de la estructura secundaria.

El perfil de desnaturalización térmica de los monómeros seguido por DSC en 1.5 mM SDS se presenta en la **Figura 29.B**. El valor de la T_m es de 89.3 $^\circ\text{C}$, sólo tres grados por debajo de la T_m para la forma dimérica (**Figura 28.A**), lo cual indica que el monómero es una proteína térmicamente muy estable. La muestra se recalentó repetidas veces (**Figura 29.B**) y se observó que el proceso de desnaturalización térmica es reversible (la relación de las áreas de los picos muestra un 90 % de reversibilidad). La diferencia observada muestra claramente que los monómeros desnaturalizados no vuelven a plegarse como dímero con las cadenas entrelazadas. Se añadió un exceso de Zn (100 equivalentes) para corroborar si la presencia del metal favorece la formación del dímero; sin embargo, tras analizar la muestra por DSC y electroforesis Mild-PAGE, encontramos que no había transición alguna en el termograma y sólo se observaron bandas monoméricas en el gel correspondiente. Esto indica que los monómeros no pueden volver a plegarse como dímero en ningún momento. Es difícil determinar a nivel molecular si es el rol del SDS consiste solamente en la estabilización de los monómeros en disolución o si éste compuesto guía la renaturalización

6. Desnaturalización de la PaSdsA1

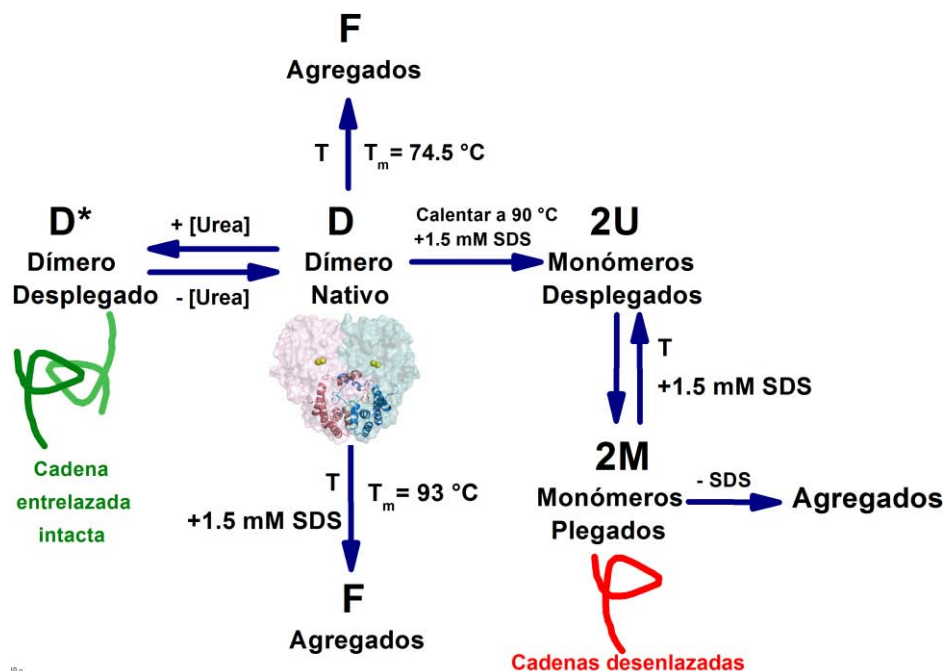


Figura 31. Rutas de desnaturalización térmica y química de la forma holo de los dímeros de PaSdsA1.

permitiendo que el proceso sea reversible. Lo que sí es claro es que el entrelazado de las cadenas que conforman el dominio de dimerización no es un proceso espontáneo y muy probablemente requiere de ayuda externa para poder plegarse correctamente [125,167,168].

6.5 Panorama global de la desnaturalización de la sulfatasa PaSdsA1

Comprender el impacto del entrelazamiento de las cadenas en las rutas de desnaturalización de las proteínas topológicamente entrelazadas representan un reto importante en el área de investigación de estructura y función de las proteínas. La sulfatasa PaSdsA1 ha resultado ser un excelente candidato para desarrollar este tipo de estudios debido a sus cadenas monoméricas profundamente entrelazadas y al gran tamaño que tiene (más de 1300 residuos de aminoácidos como dímero). En el estado nativo coexisten tres formas de la enzima en equilibrio químico, cada una de ellas con un diferente contenido de Zn en el sitio catalítico, el cual no es un resultado no deseado de las proteínas de modificación postraducciona del sistema de sobreexpresión. Los átomos de Zn influyen fuertemente en la estabilidad térmica de las tres formas, aun cuando la estructura secundaria de las tres es casi idéntica; además, estas tres formas pueden ser aisladas y estudiadas de manera independiente. Las rutas de desplegamiento térmico y químico de la forma holo de la PaSdsA1 se resumen en la Figura 31.

6. Desnaturalización de la PaSdsA1

Las conclusiones más importantes de la **Figura 31** son: (i) la desnaturalización térmica de la forma holo es irreversible y controlada cinéticamente, proceso en el cual el estado final se constituye de agregados amorfos; (ii) la desnaturalización química con urea es reversible, lo cual implica que el entrelazamiento de las cadenas en el dominio de dimerización se conserva en el estado desnaturalizado y que permite que este proceso sea reversible; (iii) la afinidad de la proteína por los iones Zn^{2+} es lo suficientemente alta como para que el dímero desplegado químicamente sea capaz de reclutar al Zn necesario del medio durante el proceso de renaturalización, produciendo nuevamente las tres formas del estado nativo de la enzima; (iv) en presencia de SDS, la desnaturalización térmica favorece la disociación de los dímeros, desanudando las cadenas entrelazadas y produciendo monómeros que son estabilizadas por efecto de las moléculas de SDS presentes; y por último, (v) la desnaturalización térmica de los monómeros estabilizados por SDS es reversible pero no produce dímeros, aún en presencia de un exceso estequiométrico de Zn (II), lo cual sugiere fuertemente que la formación del dominio de dimerización con las cadenas entrelazadas no es un proceso espontáneo, sino que requiere de ayuda externa no disponible durante este experimento.

El factor principal que correlaciona todos los descubrimientos mencionados en esta sección del trabajo es la estabilidad del entrelazado entre las cadenas monoméricas en el dominio de dimerización de la forma holo. Al calentar, las interacciones de carácter no covalente que mantienen este entrelazamiento estable se ven severamente afectadas, lo cual lleva a la generación de agregados amorfos irreversibles. Por otro lado, cuando se utiliza urea como agente desnaturalizante, las interacciones entre aminoácidos consigo mismos, o bien, con las moléculas del disolvente, responsables de mantener la estabilidad del entrelazado aún en condiciones fuertemente desnaturalizantes (8 M Urea), deben conservarse o, al menos, no verse afectadas gravemente. De hecho, este entrelazamiento actúa como semilla de plegamiento alrededor de la cual los monómeros desnaturalizados, pero con el dominio de dimerización conservado, tienen la capacidad de volver a plegarse una vez es eliminada la urea, reclutar los iones Zn^{2+} disponibles en disolución y regenerar la proteína dimérica. Debido a que los monómeros separados son incapaces de volver a plegarse como dímeros, aún en presencia de un exceso de Zn (II), la conservación de este dominio es crucial para que la reversibilidad del proceso de desnaturalización química sea posible [169].

7 Interacción PaSdsA1-Apo con Zn^{2+} y Cu^{2+}

7.1 Estudio espectroscópico de las interacciones entre metales de transición y proteínas

En el campo de la Química Bioinorgánica, las espectroscopías UV-Visible, dicroísmo circular y resonancia paramagnética electrónica (EPR), entre otras técnicas, han permitido el estudio exhaustivo y análisis de mecanismos de formación de interacciones entre metales y ligantes de carácter proteico [104,170–173]. Por un lado, la combinación de las espectroscopías de absorción electrónica (UV-Visible) y dicroísmo circular permiten la caracterización de transiciones electrónicas asociadas al complejo metal-enzima, debido a que los complejos metálicos de las metaloenzimas suelen ser centros de baja simetría [103,174,175], lo cual implica que absorben de manera diferencial los componentes izquierdo y derecho de un haz de luz circularmente polarizada. Gracias a este fenómeno, estas técnicas pueden proporcionar información acerca de la geometría y

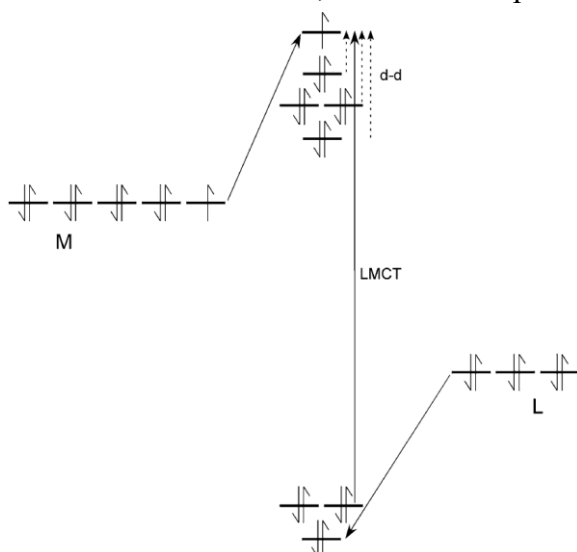


Figura 32. Diagrama de orbitales moleculares para un metal paramagnético unido a una proteína. En la interacción metal-ligante, los orbitales *d* metálicos están desestabilizados y desplegados, mientras que los orbitales de los ligandos se encuentran desplegados y estabilizados energéticamente. Las transiciones posibles del campo del ligante (*d-d*) se representan como flechas punteadas, mientras que las transiciones de transferencia de carga del ligante al metal (LMCT, Ligand to Metal Charge Transfer) se muestran como flechas continuas. Tomado de [104].

7. Interacción PaSdsA1-Apo con Zn^{2+} y Cu^{2+}

naturaleza de las interacciones metal-ligante. Por otro lado, EPR es una poderosa herramienta que aporta información sobre el ambiente químico que rodea a los electrones desapareados, lo cual está íntimamente relacionado con la estructura electrónica y la geometría del complejo enzima-metal. Además, también puede ser útil para corroborar la presencia de interacciones producto de acoplamientos entre espines electrónicos y espines nucleares en la vecindad de los iones metálicos [104]. Sin embargo, un requisito indispensable que deben satisfacer los sistemas de estudio es que haya cuando menos un átomo metálico paramagnético presente que permita la transición de electrones desapareados a los orbitales moleculares de mayor energía.

Cuando una serie de ligantes coordinan a un metal de transición, los orbitales d metálicos se despliegan como resultado de la interacción con los orbitales de los ligantes. En el caso de los orbitales de los ligantes, éstos se verán estabilizados por esta interacción (ver **Figura 32**) [104,176]. La magnitud y características de este efecto de campo ligante depende tanto de la geometría del complejo metálico como de la fuerza de las interacciones entre ligante y metal. Si los orbitales d de un ion metálico no están completamente ocupados (configuración menor a d^{10}), es posible observar transiciones de campo ligante y/o transiciones de transferencia de carga que involucran a los orbitales tanto de los ligantes como del metal. Las transiciones de campo ligante se refieren a aquellas que involucran orbitales metálicos con carácter predominantemente d , transiciones que son también conocidas como bandas $d-d$. Las transiciones de transferencia de carga se refieren a aquellas transiciones electrónicas que involucran tanto a los orbitales predominantemente d como a los orbitales de los ligantes; por ejemplo, una transferencia de ligante a metal (LMCT, por sus siglas en inglés, *Ligand to Metal Charge Transfer*) es una transición electrónica que se origina en los orbitales de los ligantes y termina en los orbitales d metálicos (ver **Figura 32**). Ambas transiciones pueden seguirse por espectroscopía de absorción electrónica (UV-Vis) y dicroísmo circular. Además, si el ion metálico que se une con la proteína de interés es paramagnético, es decir, que contiene uno o más electrones desapareados, el compuesto de coordinación metal-proteína puede estudiarse también por EPR [177,178].

7. Interacción PaSdsA1-Apo con Zn^{2+} y Cu^{2+}

Como se mencionó en la sección 3.7, no es posible seguir espectroscópicamente la titulación de la forma apo de la PaSdsA1 con $Zn(II)$ debido a que la configuración electrónica del Zn^{2+} es d^{10} , ion metálico diamagnético, lo cual implica que todos los orbitales moleculares, una vez formado el compuesto de coordinación en el sitio catalítico de la enzima, están ocupados, lo que impide la observación directa de transiciones de transferencia de carga de los orbitales de los aminoácidos ligantes a los orbitales del Zn (LCMT) y entre orbitales d de los iones metálicos. Sin embargo, diversos estudios han demostrado la utilidad de aplicar la técnica de sustitución de iones diamagnéticos, como el Zn^{2+} , por otros metales más fáciles de seguir espectroscópicamente, como Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , etc., tanto para el estudio cinético como para el estudio estructural de metaloenzimas, de tal forma que sea posible dilucidar las características del compuesto de coordinación presente en el sitio catalítico, esto es, la geometría, los ligantes participantes, interacciones relevantes con el sustrato o producto, así como la identificación y propuesta de mecanismos de catálisis [99–103]. Por estas razones, se decidió entonces eliminar completamente

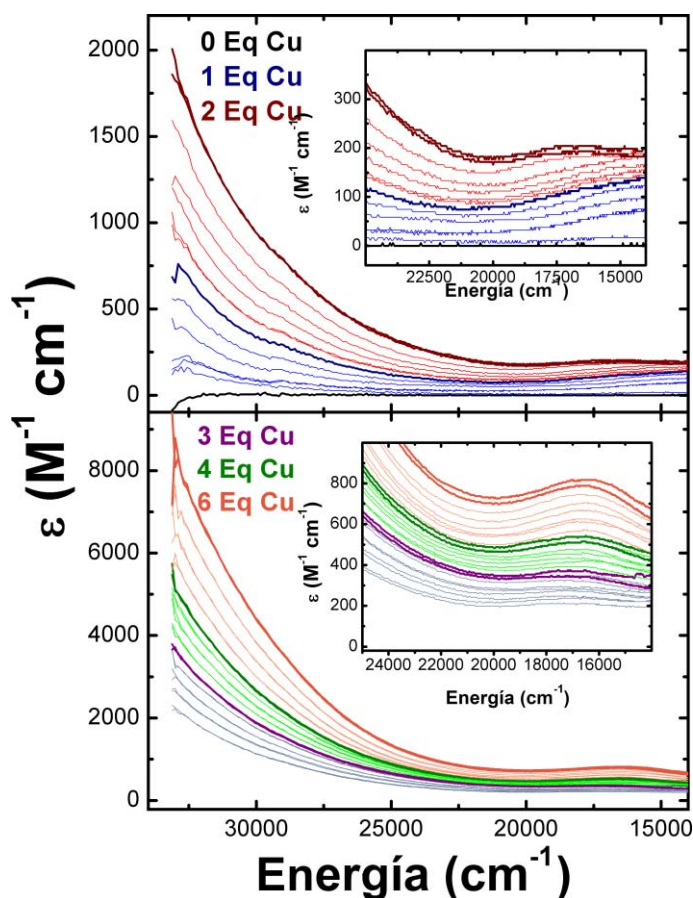


Figura 33. Titulación de la forma PaSdsA1 apo con Cu^{2+} seguida por espectroscopía UV-Visible. Se añadieron hasta 6 equivalentes de Cu^{2+} , donde el color de los espectros se ha cambiado conforme el proceso de titulación progresa. El máximo de absorción en la región de baja energía (transiciones d-d) se alcanza cerca de los $16\,500\text{ cm}^{-1}$. Las transiciones de transferencia de carga, hacia valores altos de energía, se ven interferidas por la absorción de los residuos aromáticos Trp, Tyr y Phe.

7. Interacción PaSdsA1-Apo con Zn²⁺ y Cu²⁺

los metales de la sulfatasa PaSdsA1 con el protocolo descrito en la sección 4.2.1 y, posteriormente, realizar una titulación de la forma apo con Cu²⁺ siguiendo el proceso por espectroscopía UV-Vis (**Figura 33**), dicroísmo circular (**Figura 34**) y EPR (**Figura 38**).

7.1.1 Caracterización de la unión PaSdsA1/Cu²⁺ por espectroscopía de absorción

Experimentalmente, una banda de absorción LMCT o *d-d* se encuentra caracterizada por su coeficiente de extinción molar ϵ ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$), que se relaciona con la intensidad de absorción (A) y la concentración de la molécula que absorbe (C), representada por la Ley de Lambert y Beer:

$$A = \epsilon \times C \times l \quad \text{Ecuación 1}$$

donde l es la longitud de paso óptico. El coeficiente de extinción molar está íntimamente ligado con la energía de las transiciones de las bandas LMCT y *d-d*. La longitud de onda correspondiente al valor máximo alcanzado de ϵ en un espectro de UV-Visible tiene entonces asociada una energía que refleja la diferencia entre los estados basal y excitado de la transición observada [177,178].

En la **Figura 33** se muestra la titulación de una disolución 100 μM de la forma apo de la PaSdsA1, en amortiguador 20 mM MOPS pH 8.0, con una disolución acuosa 1 M de CuCl₂. Se utilizó el amortiguador MOPS (una amina terciaria) en lugar de Tris para evitar cualquier tipo de interferencia debida a las potenciales interacciones quelatantes entre el amortiguador y los iones de Cu(II) [156]. La concentración de la disolución acuosa de Cu(II) fue muy alta, comparada con la de la forma apo, para evitar efectos significativos por dilución de la proteína al momento de añadir el Cu²⁺. Al incrementar la cantidad de Cu(II), se observó la aparición gradual de una señal muy intensa por arriba de los 30 000 cm^{-1} , la cual muy probablemente se trate de una banda de transferencia de carga ligante-metal LMCT; sin embargo, no fue posible adquirir completa esta señal debido a que por debajo de los 300 nm la fuerte contribución debida a la absorción por parte de los más de 25 residuos aromáticos en el dímero interfería con la señal LMCT. Esto se reflejó en valores de absorbancia por arriba de las 3 unidades en esta región. Hacia longitudes de onda menos energéticas (cerca de los 16 500 cm^{-1}) se observó un incremento sutil en la absorbancia conforme se añadía la disolución acuosa de Cu(II) a la muestra proteica. Esta señal muy probablemente corresponde a transferencias de banda *d-d*, como se ha reportado ampliamente en la literatura [104,172,173,179].

7. Interacción PaSdsA1-Apo con Zn²⁺ y Cu²⁺

7.1.2 Caracterización de la unión PaSdsA1/Cu²⁺ por dicroísmo circular

La técnica de dicroísmo circular es una técnica empleada ampliamente para determinar la estructura secundaria de las proteínas [171]. Sin embargo, también puede ser utilizada para estudiar transiciones electrónicas de un complejo metálico que se presenten en la región UV-Visible. La espectroscopía de dicroísmo circular utiliza un haz de luz circularmente polarizada (CP), que tiene dos componentes: izquierdo y derecho. Si una molécula quiral se expone a la luz CP, la interacción que tenga con la parte izquierda y derecha será diferente, por lo cual, la cantidad absorbida del componente izquierdo de luz CP, caracterizada por ε_L , será distinta de la cantidad absorbida del componente derecho de la luz CP, ε_R . En un experimento de CD, la señal observada se caracteriza por la diferencia de absorción de los lados izquierdo y derecho ($\Delta A = A_L - A_R$), que los equipos reportan usualmente como elipticidad en grados, $\theta = 32.98 \cdot \Delta\varepsilon \cdot C \cdot l$. De esta forma, el valor de elipticidad está relacionado con la concentración molar (C) de la molécula quiral que absorbe y con la diferencia de los coeficientes de extinción molar de los componentes izquierdo y derecho de la luz CP ($\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$, en $M^{-1}cm^{-1}$), resumido en la siguiente expresión:

$$\theta = 32.98 \cdot \Delta\varepsilon \cdot C \cdot l \quad \text{Ecuación 2}$$

donde l es la longitud de paso óptico.

Como ya se mencionó, una vez definido el sistema metal-enzima de interés, la espectroscopía CD puede utilizarse para corroborar las mismas transiciones electrónicas que se observan por espectroscopía de absorción UV-Visible. De hecho, es muy conveniente adquirir tanto los espectros de absorción como de dicroísmo circular. Dado que las señales que se observan usualmente en CD pueden ser positivas o negativas, lo cual depende de la diferencia $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$, si dos transiciones se encuentran traslapadas en un espectro normal de UV-Visible, éstas pueden distinguirse y deconvolucionarse más fácilmente en un espectro CD. El cociente de las intensidades de las señales

7. Interacción PaSdsA1-Apo con Zn^{2+} y Cu^{2+}

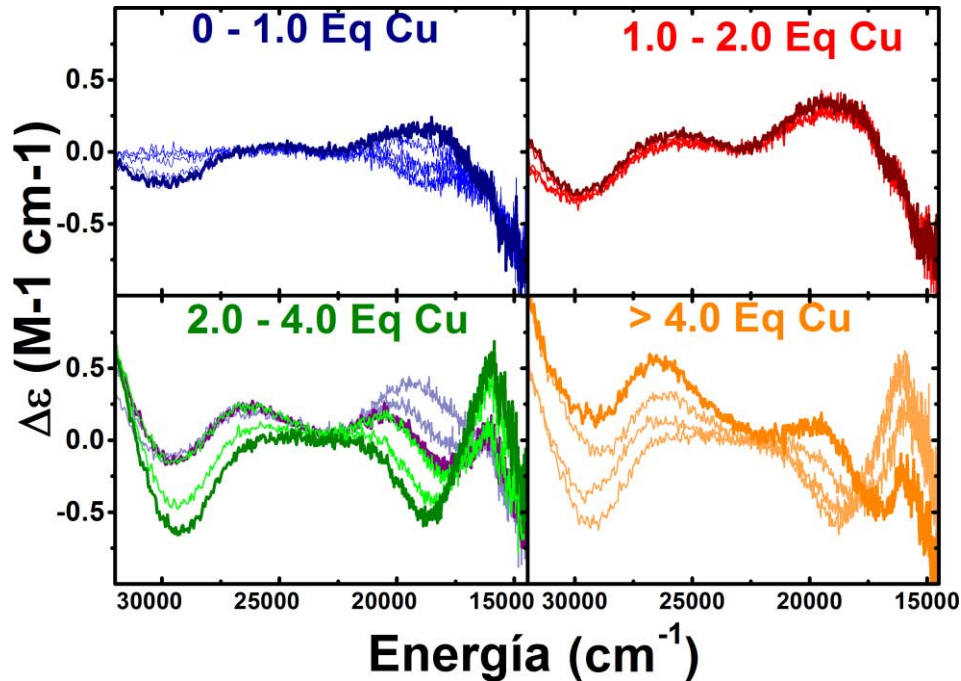


Figura 34. Titulación de la forma PaSdsA1 apo con Cu^{2+} seguida por dicroísmo circular. Al igual que en la **Figura 33**, se añadieron hasta 6 equivalentes de Cu^{2+} , utilizando el mismo código de colores. Dado que en estos espectros se observa también que las transiciones de transferencia de carga, aquellas esperadas hacia valores de $30\ 000\ cm^{-1}$, se ven interferidas por la absorción de los residuos aromáticos Trp, Tyr y Phe, sólo es posible estudiar las transiciones entre los orbitales d-d, esto es, entre $15\ 000$ y $27\ 000\ cm^{-1}$, en la esfera de coordinación en el sitio activo de la proteína. El tipo de señales observadas entre 0 y 2 equivalentes de Cu^{2+} son similares, indicando que los sitios que ocupan estos primeros iones probablemente sean parecidos; mientras que entre 2 y 4 Eq. Cu^{2+} los espectros muestran modificaciones importantes tanto en los valores de longitud de onda de máximos y mínimos, como en el número de bandas observadas. Para cantidades superiores a 4 Eq. Cu^{2+} (el espectro en anaranjado con mayor grosor de línea representa 6 Eq. Cu^{2+}), el número de bandas y los valores de energía vuelven a cambiar, indicando un nuevo modo de unión, probablemente por la formación de hidróxido de Cu(II).

debidas a las transiciones electrónicas en CD y UV-Visible ($\Delta\epsilon/\epsilon$), conocido como el factor de anisotropía de Kuhn, proporciona información sobre el tipo de transición observada: generalmente, las transiciones de campo ligante tienen factores de Kuhn mayores que los correspondientes de las transiciones de transferencia de carga [104,171,176].

En la **Figura 34** se muestra una colección de espectros CD correspondiente a la titulación de $100\ \mu M$ de PaSdsA1-Apo en amortiguador $20\ mM$ MOPS pH 8.0 con una disolución acuosa de Cu(II) $1\ M$. Cada espectro se obtuvo realizando 50 adquisiciones en el intervalo de longitudes de onda de 300 a $650\ nm$ a $20\ ^\circ C$. A diferencia de los espectros UV, por dicroísmo circular se obtuvieron trazas donde la señal cambiaba de signo, debido a la diferencia de absorción por cada flanco de la proteína, particularmente de la región en donde se estaba conformando la esfera de

7. Interacción PaSdsA1-Apo con Zn^{2+} y Cu^{2+}

coordinación del Cu(II) añadido, resultando en picos con elipticidad molar positiva y negativa. De manera similar a los resultados observados por espectroscopía de absorción, por arriba de los 30000 cm^{-1} se manifestó una señal muy intensa (positiva) correspondiente a la absorción de los residuos aromáticos de la enzima que obstaculizó el análisis de esa región. Una de las consecuencias no deseadas de este fenómeno es que, debido a que las transiciones LMCT provenientes de los átomos de N de los residuos de His suelen localizarse en longitudes de onda con energía superior a 30000 cm^{-1} [179], en nuestro sistema de estudio no será posible caracterizar las transiciones cuyos electrones tengan su origen en los orbitales moleculares de este residuo. Sin embargo, alrededor de los 30 000 cm^{-1} puede observarse también una señal negativa que, en términos generales, aumenta su magnitud conforme se añade Cu(II). Este comportamiento continúa hasta haber agregado 4 equivalentes por dímero de PaSdsA1; posteriormente, la señal vuelve a disminuir en intensidad. Las características de esta banda, al menos hasta los 4 equivalentes de Cu(II), concuerdan con las transiciones LMCT que provienen de residuos carboxilados, residuos de Glu y Asp, como se describe en [172]. Es necesario recordar que el sitio catalítico de la enzima (**Figura 7**) se conforma de cuatro residuos de His y tres de Glu, de tal forma que a pesar de que las características del sistema no permiten estudiar las transiciones LMCT His \rightarrow Cu(II), las transiciones LMCT Glu \rightarrow Cu(II) nos serán de gran utilidad para estudiar el mecanismo de ocupación de la enzima apo. Por otro lado, por debajo de los 25 000 cm^{-1} pueden apreciarse algunas señales sutiles que cambian tanto de forma como de magnitud con el avance de la titulación. Estas transiciones, asociadas a longitudes de onda menos energéticas, son probablemente debidas a bandas de tipo *d-d*.

El progreso de la titulación presenta rasgos interesantes. Por ejemplo, resulta claro que la forma de los espectros obtenidos es similar entre 0 y 2 equivalentes añadidos de Cu(II), excepto por la magnitud de las bandas observadas. Esto sugiere que los sitios que se ocupan deben ser muy parecidos. Por otro lado, al alcanzar los 3 equivalente de Cu^{2+} (**Figura 34**, panel inferior izquierdo, espectros en lila y púrpura) comienzan a observarse cambios ligeros en la región de transferencias LMCT, donde la señal en 30 000 cm^{-1} disminuye un poco su magnitud, y algunos un poco más marcados en las bandas *d-d*. Para ambos casos, hay señales tanto positivas como negativas. Al llegar a los 4 equivalentes de Cu(II), la intensidad de la banda cercana a los 30 000 cm^{-1} aumenta nuevamente y las transiciones *d-d* se vuelven muy distintas a las que se habían observado previamente. Finalmente, cuando se continúa añadiendo más cobre a la disolución proteica hasta

7. Interacción PaSdsA1-Apo con Zn^{2+} y Cu^{2+}

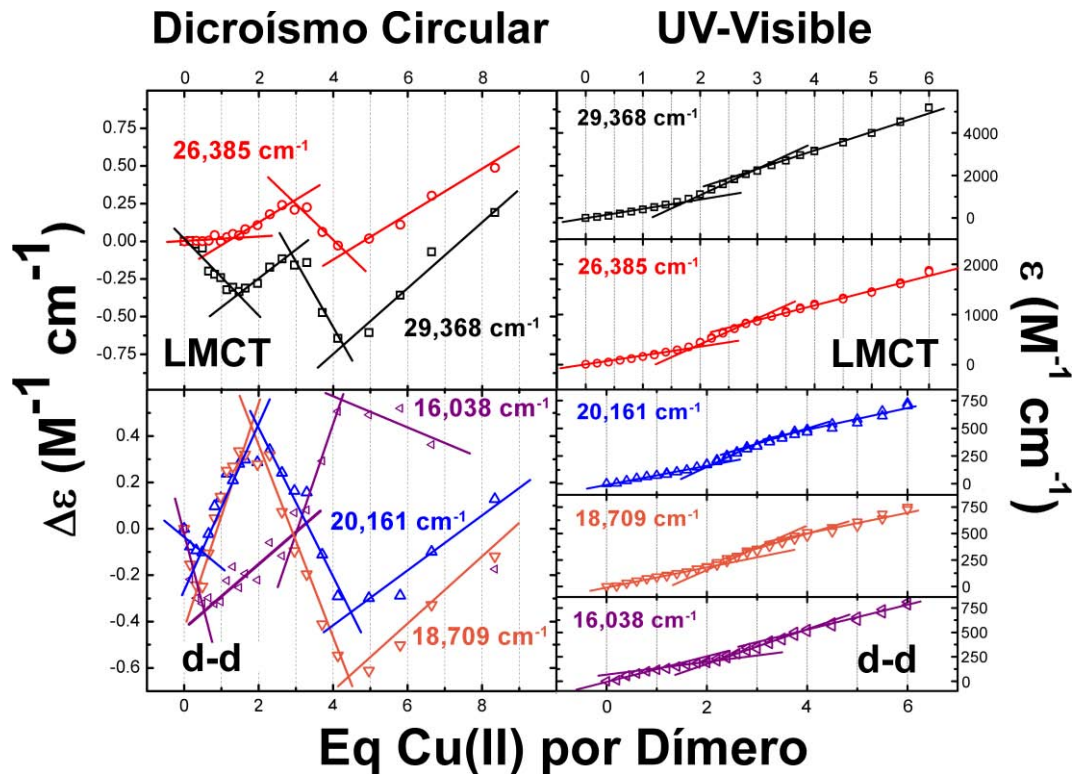


Figura 35. Titulación de la forma PaSdsA1-Apo con Cu^{2+} . En el lado izquierdo, se han tomado los valores de energía donde se observan mayores cambios en los espectros de dicroísmo circular y se han graficado sus correspondientes valores de $\Delta\epsilon$ en función del número de equivalentes de Cu^{2+} añadidos a la enzima. En el lado derecho, utilizando los mismos valores de energía que se encontraron relevantes por dicroísmo circular, se han graficado los correspondientes valores de ϵ como función de la cantidad añadida de Cu^{2+} . En ambos casos, sólo fue posible observar dos señales asociadas a transiciones de transferencia de carga (LMCT: 26 385 y 29 368 cm^{-1}) por la interferencia de los residuos aromáticos presentes en la proteína. En el caso de las débiles transiciones entre orbitales d-d, se observaron tres: 16 038 cm^{-1} , 18 709 cm^{-1} y 20 161 cm^{-1} . Para los espectros de CD, pueden verse cambios de pendiente en 1, 3 y 4 Eq. Cu^{2+} por dímero para transiciones LMCT, y en 2, 3 y 4 Eq. Cu^{2+} por dímero para transiciones d-d. En los espectros de UV-Vis, las transiciones LMCT muestran cambios de pendiente en 2 y 3 Eq. Cu^{2+} , mientras que las transiciones d-d indican cambios en 2, 3 y 4 Eq. Cu^{2+} por dímero.

alcanzar los 6 equivalentes (panel inferior derecho, línea más gruesa), las bandas cambian completamente, desapareciendo la señal que resultaba clara en los 30 000 cm^{-1} . Estas características sugieren que los sitios disponibles después de los 2 equivalentes de Cu^{2+} son diferentes a los ya ocupados. Una vez sobrepasados los 4 equivalentes, los notables cambios en los espectros pueden deberse a que el $Cu(II)$ comienza a interactuar con el agua del medio. Dado que se ha tomado la precaución de utilizar un amortiguador no quelatante como el MOPS, los iones Cu^{2+} , una vez ocupados todos los sitios disponibles en la enzima, comienzan a precipitar como $Cu(OH)_2$, proceso que se ve muy favorecido por las condiciones de pH de estudio. La solubilidad del $Cu(OH)_2$ está caracterizada por una fuerte dependencia con el pH, de modo muy similar al observado para el

7. Interacción PaSdsA1-Apo con Zn²⁺ y Cu²⁺

Zn(II) (ver nuevamente la **Figura 17**), de tal forma que valores cercanos a pH neutro ocasionarán la inmediata precipitación como hidróxido de cobre (II). La inspección visual de la muestra, una vez concluida la titulación, confirmó la presencia del Cu(OH)₂ como un precipitado gelatinoso.

Los resultados que arrojaron las titulaciones seguidas por espectroscopía de absorción y dicroísmo circular por sí mismos son de gran utilidad; sin embargo, ambas técnicas son complementarias y el análisis conjunto de ambas series de espectros permite una mayor comprensión del mecanismo de unión proteína-metal. En los espectros de CD se detectaron los siguientes valores de energía en donde los cambios de intensidad de las bandas a lo largo de la titulación fueron más marcados: 29 368 cm⁻¹, 26 385 cm⁻¹, 20 161 cm⁻¹, 18709 cm⁻¹ y 16038 cm⁻¹. En los espectros de absorción únicamente fue posible detectar el incremento repentino por debajo de los 33 333 cm⁻¹ y un máximo de absorción en los 16 500 cm⁻¹. En la **Figura 35** se muestran los valores de ϵ y $\Delta\epsilon$ como función de la cantidad añadida de Cu(II) correspondientes a las longitudes de onda de mayor cambio en los espectros de CD. Si bien es cierto que en los espectros de absorción electrónica en estos valores de longitud de onda no se muestran cambios tan marcados como los observados por dicroísmo circular, debe recordarse que CD permite observar diferencias mayores debido a que la elipticidad molar puede tomar valores positivos y negativos, mientras que en la espectroscopía UV sólo es posible apreciar señales positivas, donde las contribuciones debidas a las transiciones electrónicas en el compuesto de coordinación que se forma, tan claras por CD, se encuentran traslapadas, impidiendo notar cambios tan sutiles, como los debidos a las bandas *d*. Por estas razones, se representa el comportamiento de ϵ y $\Delta\epsilon$ en estas longitudes de onda. En los paneles superiores se muestran las transferencias de carga LMCT, mientras que en los inferiores las transiciones *d-d*. Para todos los casos, es posible observar cambios de pendiente, que se encuentran asociados a la ocupación de sitios disponibles de unión a metales en la enzima. Por ejemplo, para la longitud de onda con energías 29 368 cm⁻¹ y 26 385 cm⁻¹, hay cambios de pendiente en valores cercanos a 1, 3 y 4 equivalentes de Cu(II) por CD; mientras que por espectroscopía UV, los cambios de pendiente ocurren en 2 y 3 equivalentes de Cu(II). Por el lado de las transiciones de bandas *d-d* (longitudes de onda con energía 20 161 cm⁻¹, 18 709 cm⁻¹ y 16 038 cm⁻¹), los cambios de pendiente se observan cercanos a 1, 2, 3 y 4 equivalentes para el caso de CD, y en 2 y 3 para los espectros UV-Visible. Los resultados de ambas espectroscopías sugieren, hasta este punto, que el mecanismo de unión metal-proteína ocurre de manera secuencial.

7. Interacción PaSdsA1-Apo con Zn²⁺ y Cu²⁺

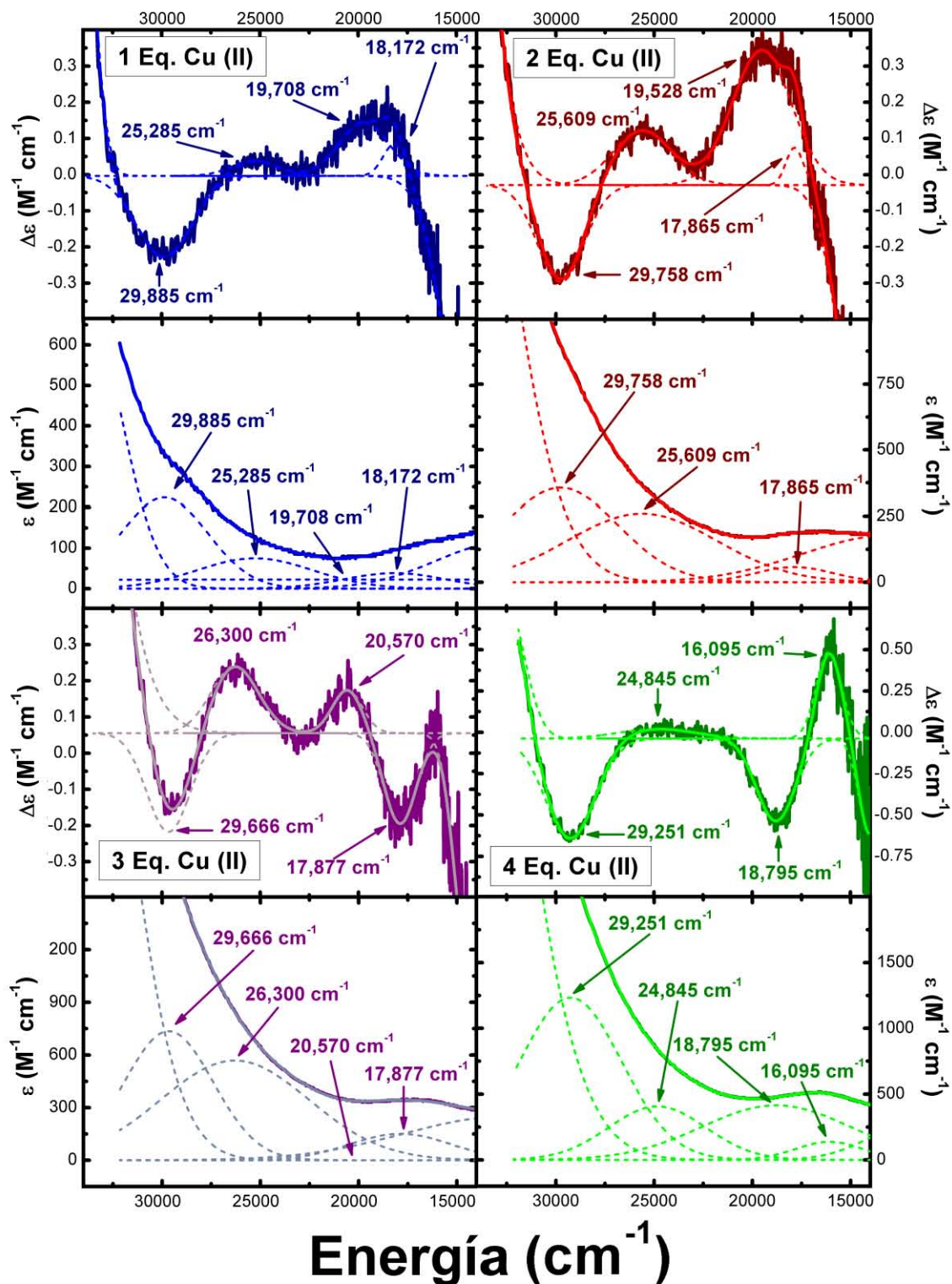


Figura 36. Deconvolución global de los espectros de dicroísmo circular y UV-Visible. Utilizando el programa Origin 8.5, se han deconvolucionado los espectros adquiridos por ambas espectroscopías en funciones gaussianas, estableciendo la restricción de ajuste que el centro de cada función debe coincidir para cada par de espectros. La deconvolución prueba que los espectros de UV-Visible confirman y soportan los resultados observados por dicroísmo circular.

7. Interacción PaSdsA1-Apo con Zn²⁺ y Cu²⁺

Tabla 3. Parámetros de los ajustes globales de funciones gaussianas múltiples a los espectros de absorción electrónica y dicroísmo circular para la formación del complejo PaSdsA1-Cu(II) de la **Figura 36**.

No. Eq. Cu ²⁺	No. Banda	Energía (cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon/\epsilon \times 10^4$
1	1	18 172	38.35	0.08736	22.780
	2	19 708	22.54	0.14731	65.355
	3	25 285	74.79	0.04198	5.613
	4	29 885	223.69	-0.22391	-10.010
2	1	17 865	57.36	0.10318	17.988
	2	19 528	NA*	0.37294	NA*
	3	25 609	260.00	0.15133	5.820
	4	29 758	356.60	-0.26757	-7.503
3	1	17 877	150.51	-0.25041	-16.637
	2	20 570	NA*	0.11930	NA*
	3	26 300	568.06	0.18500	3.257
	4	29 667	735.49	-0.27253	-3.705
4	1	16 095	136.69	0.52477	38.391
	2	18 795	414.50	-0.49873	-12.032
	3	24 845	406.75	0.05791	1.424
	4	29 251	1232.75	-0.60848	-4.936

* No apreciable

El análisis por separado de los espectros nos ha permitido reconocer que hay cuatro sitios de unión en la PaSdsA1; sin embargo, para poder consolidar una imagen global sobre el proceso de ocupación de los sitios de unión a metales, es necesario llevar a cabo un análisis global simultáneo que considere ambas series de espectros de titulación. En la **Figura 36** se muestra la deconvolución conjunta de los espectros correspondientes a 1,2, 3 y 4 equivalente de Cu(II) por dímero, esto es, se han ajustado simultáneamente a funciones gaussianas utilizando el programa Origin 8.5. En todos los casos, las funciones gaussianas representan muy bien los espectros experimentales. Las transiciones LMCT Glu→Cu(II), para 1 y 2 equivalentes de Cu(II), tienen valores de 29 885 cm⁻¹ y 25 285 cm⁻¹, y de 29 251 cm⁻¹ y 25 609 cm⁻¹, respectivamente. Las transiciones *d-d* tienen asociadas las longitudes de onda con energía 19 708 cm⁻¹ y 18172 cm⁻¹, 19 528cm⁻¹ y 17865 cm⁻¹, para los mismos espectros. Puede corroborarse entonces que en los pares de espectros de 1 y 2 equivalentes de Cu(II), tanto los valores de energía obtenidos para las transiciones electrónicas como las formas de los espectros son nuevamente muy similares, reforzando la idea de que los dos sitios de unión que ocupan los primeros átomos entrantes de Cu²⁺ son similares. En el par de espectros correspondientes a 3 equivalentes de Cu(II), se observa ya una ligera diferencia en la energía de una de las transiciones LMCT, de estar en 25 285 cm⁻¹ al inicio, modifica su valor hasta

7. Interacción PaSdsA1-Apo con Zn^{2+} y Cu^{2+}

26 300 cm^{-1} . La LMCT de mayor energía (29 666 cm^{-1}) sigue siendo similar a sus predecesores. Las bandas *d-d* no tienen energías muy diferentes comparadas con los espectros de 1 y 2 equivalentes de Cu, sin embargo, el valor de $\Delta\varepsilon$ es negativo para la transición de 17 787 cm^{-1} , donde resulta evidente que el sitio que se está ocupando ya muestra características que le distinguen de los dos primeros. Por último, los espectros de 4 equivalentes de Cu(II) son claramente diferentes de los espectros previos. La transferencia LMCT de 29 251 cm^{-1} es señal de que la interacción de los iones de Cu^{2+} con los residuos de Glu prevalece; no obstante, las transiciones *d-d* tienen energías asociadas de diferente magnitud (18 795 cm^{-1} y 16 095 cm^{-1}) y el signo de $\Delta\varepsilon$ cambia. Además, se ha encontrado una transición en 24 845 cm^{-1} que resulta ser demasiado energética para considerarse una banda *d-d*, pero no lo suficiente para ser una transferencia LMCT. A pesar de que las diferencias son muy marcadas, no hay que dejar de lado que en este punto comienza a aparecer una contribución debida a la formación de $Cu(OH)_2$, por lo cual las diferencias empezarán a ser muy evidentes a partir de los 4 equivalentes añadidos de Cu(II).

Las cuatro transiciones determinadas mediante la deconvolución simultánea de los espectros se condensan en la **Tabla 3**. Además de los respectivos valores de ε y $\Delta\varepsilon$, se ha añadido una columna que nos muestra el factor de anisotropía de Kuhn ($\Delta\varepsilon/\varepsilon$). Como se mencionó anteriormente, este parámetro proporciona información sobre la naturaleza de la transición observada. Valores absolutos mayores en el factor de anisotropía se relacionan con transiciones LMCT, mientras que valores inferiores se asocian con transiciones *d-d*. En todos los casos, se observa una concordancia entre la asignación realizada en el análisis de los espectros y sus correspondientes valores del factor de anisotropía. La única transición que no podía clasificarse de manera clara (longitud de onda con energía 24 845 cm^{-1} , para el par de espectros a los 4 equivalentes añadidos de Cu^{2+}), tiene un factor de Kuhn de -12.032×10^{-4} , que es más alto que los de transferencias entre orbitales *d* (1.424×10^{-4} y -4.936×10^{-4}) para este mismo par de espectros, lo cual nos permite clasificar esta transición como una transferencia de carga LMCT.

En resumen, el estudio de las interacciones entre la proteína PaSdsA1 y el Cu(II) nos permite identificar cuatro posibles sitios de unión, en los cuales se observa la participación de residuos de Glu, muy probablemente los residuos E173, E280 y E299. Dos de los sitios de unión comparten características espectroscópicas similares, y son los primeros en ser ocupados. Los dos restantes difieren de los primeros, cambiando de manera significativa la evolución de sus correspondientes

7. Interacción PaSdsA1-Apo con Zn^{2+} y Cu^{2+}

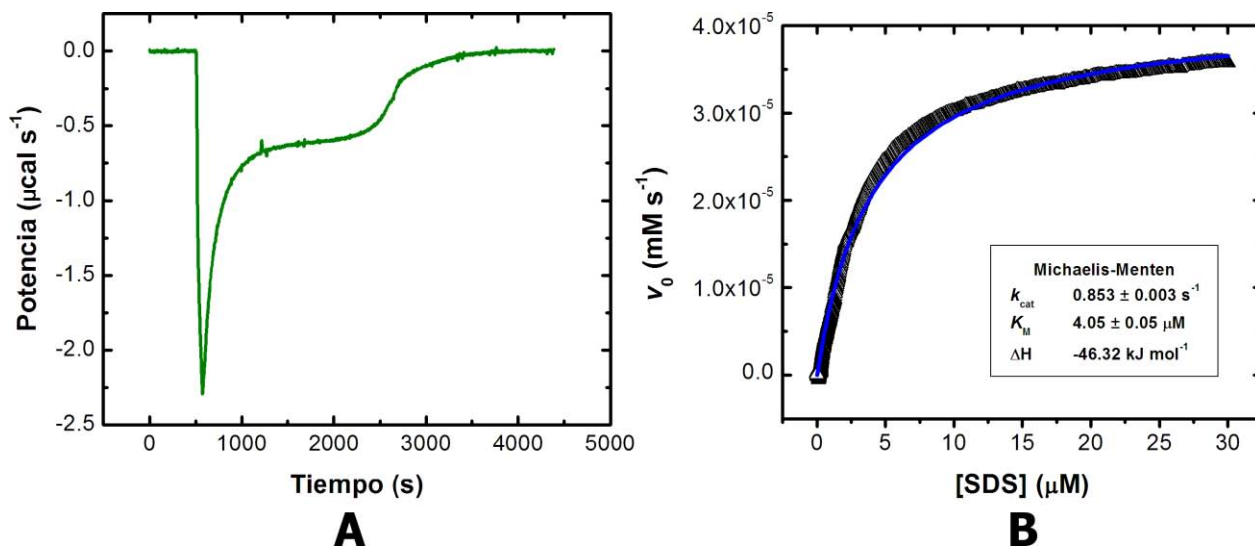


Figura 37. Hidrólisis del SDS catalizada por la PaSdsA1- Cu^{2+} -holo, seguida por ITC. La forma PaSdsA1-apo se generó con el tratamiento quelatante descrito en el capítulo anterior; después, se añadieron 4 equivalentes de $\text{Cu}(\text{II})$ para obtener la forma PaSdsA1- Cu^{2+} -holo. **(A)** Traza calorimétrica obtenida en un experimento de cinética enzimática por ITC de una única inyección, en amortiguador 20 mM Tris pH 8.0 a 20 °C. La concentración de la proteína fue de 50 nM, colocada en la celda. La concentración del SDS, en la jeringa, fue de 3.5 mM. Después de una inyección de 40 μL , la concentración final alcanzada de SDS en la celda fue de 100 μM . **(B)** Ajuste al modelo de Michaelis-Menten. Los parámetros obtenidos son: $k_{cat} = 0.853 \text{ s}^{-1}$ y $K_M = 4.05 \text{ }\mu\text{M}$.

espectros de dicroísmo conforme se sigue añadiendo $\text{Cu}(\text{II})$ a la disolución de la enzima. El mecanismo de unión entonces parece ser secuencial: se ocupan primero dos sitios equivalentes de la proteína apo y, posteriormente, uno a uno, entran dos iones Cu^{2+} , estableciendo interacciones con sus respectivos sitios de unión. De acuerdo con la estructura obtenida por difracción de rayos X para la forma PaSdsA1-2Zn (2CG3, **Figura 11**), cuando la proteína tiene dos átomos de Zn^{2+} por dímero, los residuos que coordinan al único átomo metálico en el sitio catalítico son E173, H174, E299 y H344, mientras que el resto de los residuos H169, H171 y E280 se encuentran libres. Merece una mención especial el residuo E280, que está contenido en un rizo particularmente móvil, por lo que tiene un factor de temperatura muy elevado (ver **Tabla 6**). Anteriormente, se ha reportado que, en algunos casos, la sustitución de metales diamagnéticos, como el Zn^{2+} , por iones paramagnéticos, como el Cu^{2+} , no tiene un efecto significativo ni en los residuos coordinantes ni en el número de átomos metálicos que interactúan con el sitio catalítico [99–103]. Si bien no es posible asegurar que esto ocurrirá siempre, podemos plantear la hipótesis de que la sulfatasa PaSdsA1 se comportará de la misma manera, por lo cual es posible partir de la suposición de que los iones Cu^{2+} se coordinarán con los mismos residuos con que se coordina el Zn^{2+} . De ser cierta

7. Interacción PaSdsA1-Apo con Zn²⁺ y Cu²⁺

Tabla 4. Parámetros cinéticos de Michaelis-Menten de la reacción de hidrólisis catalizada por la PaSdsA1-holo-Zn²⁺ y PaSdsA1-holo-Cu²⁺. Los valores se obtuvieron a partir los ajustes mostrados en las **Figura 16** y **Figura 37**.

Metal en la proteína	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (μM)
Zn(II)	2.760 ± 0.006	4.08 ± 0.05
Cu(II)	0.853 ± 0.003	4.05 ± 0.05

esta idea, la estructura representada en la **Figura 11.C** correspondería con el escenario descrito por los espectros de absorción electrónica y dicroísmo circular cuando se han añadido 2 equivalentes de Cu(II). Esto explicaría los pocos cambios observados entre los espectros CD en presencia de 1 y 2 equivalentes de Cu(II); tienen formas similares porque se estaría ocupando el mismo sitio de unión, pero en diferente monómero. Cuando se añade un tercer equivalente, las señales de las transiciones *d* cambian de forma y signo en los espectros CD. Este repentino cambio podría ser explicado por la interacción que debe establecerse entre el tercer átomo entrante de Cu(II) y el residuo E280, de alta movilidad. La interacción con un cuarto átomo de Cu(II) también involucraría una menor movilidad del rizo que contiene a E280, pero estaría del mismo modo influenciado por la formación del Cu(OH)₂, que tal vez explique por qué los espectros CD con 3 y 4 equivalentes de Cu(II) no son similares.

Para poder confirmar la hipótesis de la coordinación de los átomos de Cu²⁺, es necesario cristalizar la proteína con 1, 2, 3 y 4 equivalentes de Cu(II), lo cual se propone como una perspectiva del trabajo. No obstante, contamos con una evidencia experimental que parece soportar esta hipótesis en cierto grado. Al realizar un ensayo de actividad enzimática por ITC de la PaSdsA1 con 4 átomos de Cu²⁺ por dímero, utilizando SDS como sustrato (**Figura 37** y **Tabla 4**), se encontró que la proteína es capaz de soportar la hidrólisis del SDS, con $k_{cat}^{Cu(II)} = 0.853 \text{ s}^{-1}$ y $K_M^{Cu(II)} = 4.05 \text{ μM}$. Si comparamos estos valores con los reportados para la PaSdsA1-Zn-holo en la **Figura 16**, $k_{cat}^{Zn(II)} = 2.76$ y $K_M^{Zn(II)} = 4.08 \text{ μM}$, se ve claramente que la magnitud de la constante catalítica de la enzima con cobre es la tercera parte de la que contiene Zn. Para el caso de la constante de Michaelis, los valores son prácticamente los mismos. El reconocimiento y posicionamiento del sustrato dentro de la enzima recae directamente en las interacciones del SDS con los residuos del túnel hidrofóbico que ha de atravesar el sustrato para llegar al sitio catalítico, así como de los residuos del sitio catalítico que se encargan de interactuar con el grupo sulfato y la cadena alifática

7. Interacción PaSdsA1-Apo con Zn^{2+} y Cu^{2+}

del SDS, lo cual se refleja usualmente en los valores de K_M . Dado que los residuos del túnel hidrofóbico que reconocen al sustrato no cambian, y tampoco hay diferencias entre la K_M del sistema con Cu y con Zn, los valores de las constantes de Michaelis sugieren que los residuos del sitio catalítico en la proteína con Cu(II) adoptan una conformación espacial muy similar a la observada para el caso de la PaSdsA1 con Zn, lo que indica que tanto la geometría de coordinación como los ligantes involucrados para coordinar a Cu^{2+} y Zn^{2+} tendrían que ser los mismos. Para el caso de la PaSdsA1-Cu-holo, la diferencia en los valores observados de k_{cat} probablemente tenga su origen en la generación de puentes de hidrógeno de menor calidad para la activación de la molécula de agua que realiza el ataque nucleofílico sobre el sustrato, lo cual termina reflejándose en una k_{cat} de menor magnitud comparada con la PaSdsA1-Zn-holo.

7.1.3 Caracterización de la unión PaSdsA1/ Cu^{2+} por EPR

Como se mencionó anteriormente, la espectroscopía paramagnética electrónica (EPR) es una técnica espectroscópica que permite el estudio de moléculas con electrones desapareados. Como resultado de sus espines, los electrones desapareados se comportan como imanes y se alinean de forma paralela o antiparalela en un campo magnético aplicado. Para el caso más simple donde una molécula tiene un solo electrón desapareado, la interacción del espín electrónico con el campo magnético provocará el desplegamiento en dos subniveles de spin con $m_s = \pm 1/2$. Este fenómeno es

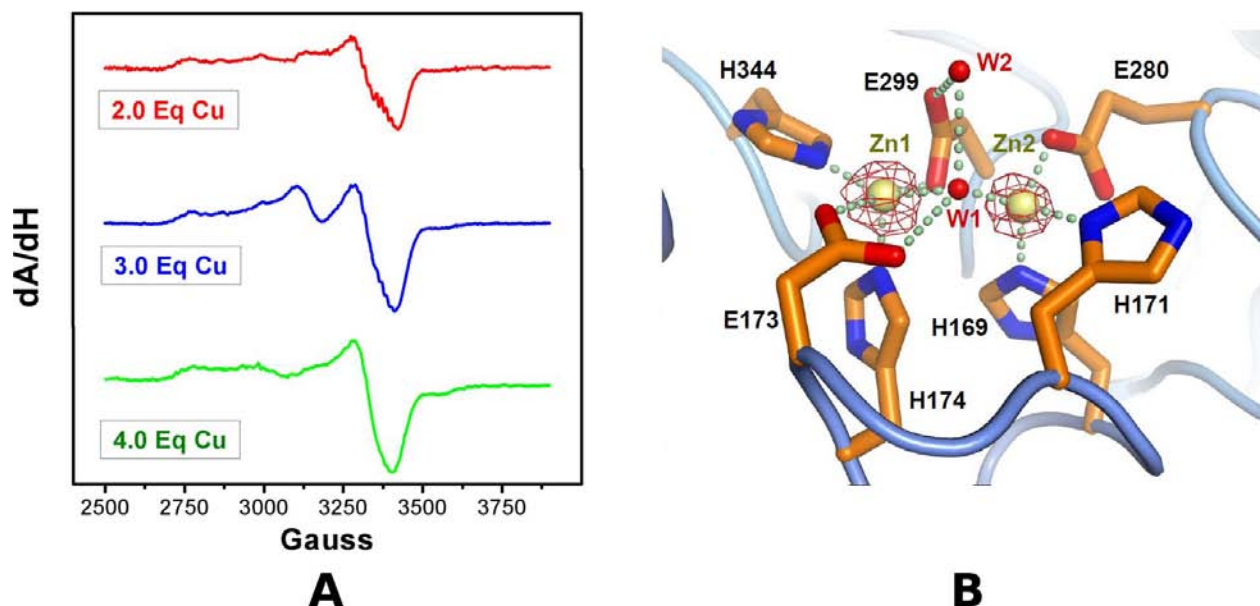


Figura 38. Titulación de la forma apo de la PaSdsA1 con Cu^{2+} utilizando Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR). (A) Espectros EPR de la sulfatasa PaSdsA1-apo titulada con 2, 3 y 4 equivalentes de Cu(II) por dímero. (B) Estructura cristalográfica del sitio catalítico de la PaSdsA1-Zn-holo (PDB 2CG3).

7. Interacción PaSdsA1-Apo con Zn^{2+} y Cu^{2+}

conocido como el efecto Zeeman. Las dos alineaciones de los espines tienen energía ligeramente distinta ($E = m_s g \beta H$, donde g es el factor-g, β es el magnetón de Bohr y H es la magnitud del campo magnético aplicado), y pueden inducirse y detectarse transiciones de uno a otro nivel aplicando energía en forma de microondas ($h\nu$). Cuando la diferencia de energía entre los dos subniveles de espín producida por el desplegamiento de Zeeman es igual a la energía de las microondas irradiadas ($\Delta E = g\beta H = h\nu$), se alcanza la condición de resonancia, momento en el cual ocurre una absorción de las microondas y se detecta una señal en un espectro EPR. En esta técnica entonces, una muestra se coloca en una cavidad y es irradiada con microondas de longitud de onda fija mientras se aplica un campo magnético externo que incrementa su magnitud de manera gradual. Los espectros EPR se reportan como la primera derivada del espectro de absorción de las microondas con respecto al campo magnético aplicado (dA/dH) para conseguir una mayor resolución. Un electrón desapareado que no esté sometido a interacciones con otros electrones desapareados o con núcleos magnéticos, presentará una sola absorción para esta transición. Los espectros EPR de diversos complejos, no obstante, muestran patrones de desplegamiento hiperfino que se deben a la interacción de electrones metálicos no apareados con núcleos magnéticos en los ligantes [104,178,180–183]. Para el caso particular del Cu(II), los ligantes con núcleos que tienen espines diferentes de cero (como el nitrógeno) ocasionan divisiones hiperfinas proporcionales al número de este tipo de átomos enlazados con el ion Cu(II). El estudio de la división hiperfina, que se debe en parte a que el spin nuclear del átomo de Cu es diferente de cero, proporciona información geométrica relevante [173,180,184,185].

En la **Figura 38** se muestran los espectros EPR de la forma apo de la PaSdsA1 titulada con 2, 3 y 4 equivalentes de Cu(II) por dímero. En los experimentos realizados por espectroscopía de absorción electrónica y dicroísmo circular, no fue posible detectar las transiciones de carácter LMCT provenientes de los residuos de His presentes en el sitio catalítico debido a las interferencias ocasionadas por los diversos residuos aromáticos de la enzima; sin embargo, una examinación cuidadosa del espectro EPR con 2 equivalentes de Cu(II) nos permite observar un desplegamiento hiperfino a 3350 G, debido a la interacción del espín de los electrones desapareados de los átomos metálicos con los espines nucleares de los átomos de N de las histidinas. Esto es una evidencia experimental que muestra claramente que cuando la proteína comienza a llenar sus sitios de interacción con metales en el sitio catalítico, participan tanto los residuos de Glu, observados previamente por CD, como los residuos de His. La participación de estos aminoácidos está en

7. Interacción PaSdsA1-Apo con Zn^{2+} y Cu^{2+}

concordancia con la estructura cristalina de la PaSdsA1-Zn-holo, presentada nuevamente en la **Figura 38.B**. Esto es otra prueba indirecta de que los átomos de Cu(II) parecen unirse de la misma manera que los átomos de Zn(II). Cuando la cantidad de Cu aumenta, estos sitios de coordinación comienzan a ser eclipsados por la siguiente interacción, caracterizada por un alto grado de interacciones de coordinación con residuos oxigenados, los cuales pueden ser los átomos de O de los residuos de Glu, pero también del H_2O , que podría producir el indeseable precipitado gelatinoso característico del $Cu(OH)_2$. De esta forma, tomando en conjunto la serie de experimentos de titulación, resulta claro que el mecanismo de coordinación parece ser secuencial, ocupando primero un sitio de coordinación en cada monómero antes de comenzar las interacciones con el segundo grupo de residuos de la esfera de coordinación. Es esperado entonces que el mecanismo de interacción con Zn sea muy similar al que se ha estudiado con Cu(II) por las siguientes razones: (i) la carga y el tamaño de los iones Zn^{2+} y Cu^{2+} son similares (radios iónicos: 0.74 y 0.69 Å, respectivamente); (ii) algunos reportes indican que no hay afectación en la esfera de coordinación al intercambiar Zn(II) por Cu(II); y (iii) la sulfatasa PaSdsA1-Cu-holo también soporta la hidrólisis catalizada del SDS.

7.2 Estudio calorimétrico del mecanismo de unión PaSdsA1- Zn^{2+}/Cu^{2+}

La calorimetría de titulación isotérmica (ITC) es una técnica que ha sido utilizada ampliamente y de manera constante en el área de interacciones de proteínas con metales. Además de proporcionar una medida directa de la energética de la unión entre macromoléculas y ligantes, también puede proporcionar parámetros de gran interés, como la constante de equilibrio, la estequiometría, la entalpía, entropía y energía libre de Gibbs del proceso [154,157,158,186]. A diferencia de las técnicas espectroscópicas, en donde es necesario contar con un átomo metálico paramagnético para caracterizar las transferencias electrónicas LMCT y bandas d-d, la calorimetría de titulación isotérmica no precisa de este tipo de metales y permite, por tanto, estudiar directamente la titulación de la enzima PaSdsA1 en su forma apo con Zn^{2+} . Sin embargo, esto sólo es posible si se cuenta con un mecanismo de reacción apropiado que describa la interacción entre la macromolécula y el ligante.

Durante las secciones previas de este capítulo, se han considerado diversos resultados experimentales espectroscópicos titulando Cu(II) sobre la enzima PaSdsA1 apo. Esto nos ha permitido visualizar cuáles son los posibles pasos involucrados en la ocupación de los sitios

7. Interacción PaSdsA1-Apo con Zn²⁺ y Cu²⁺

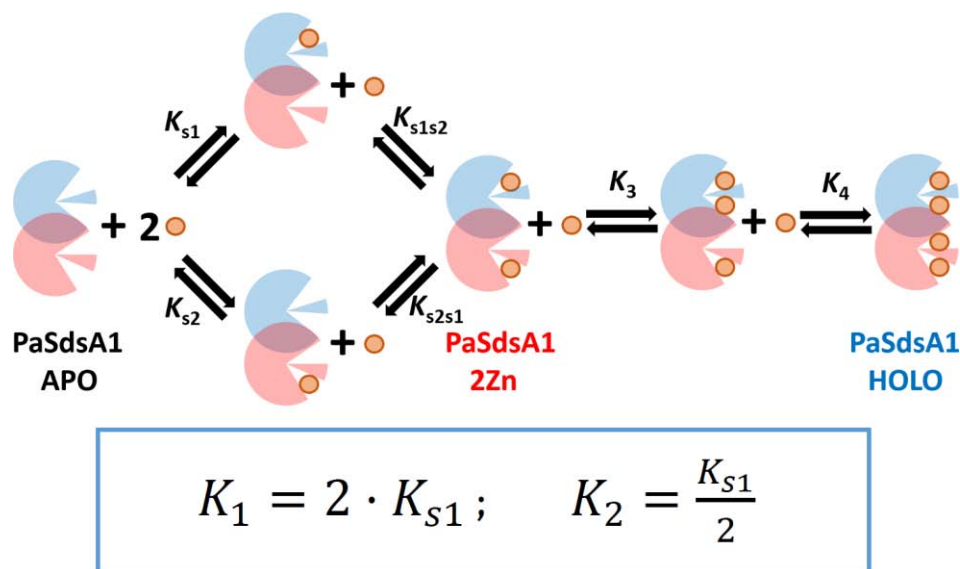


Figura 39. Mecanismo de unión de la PaSdsA1 con M²⁺, propuesto a partir de los resultados de titulación espectroscópica de PaSdsA1-apo con Cu²⁺. El metal puede ser Zn(II) o Cu(II). Este mecanismo involucra un modelo híbrido de interacción, donde al inicio se ocupan dos sitios equivalentes, uno en cada monómero, pero independientes entre sí. Posteriormente, la unión del tercero y cuarto ion M²⁺ procedería de manera secuencial. Se muestra también la relación matemática entre las constantes estequiométricas K₁ y K₂ y las constantes específicas de sitio de unión. Ver el análisis más adelante en este capítulo.

disponibles de unión de la sulfatasa por parte del Cu(II). La deconvolución global simultánea de los espectros de absorción electrónica y de dicroísmo circular había sugerido ya la posibilidad de que la unión de los primeros dos equivalentes de Cu(II) se caracterizara por la interacción de estos iones metálicos con sitios de unión equivalentes, lo cual podría explicarse si cada uno de estos átomos de Cu(II) ocupara el mismo sitio de unión, pero en cada uno, y por separado, de los dos monómeros que conforma a la proteína PaSdsA1. Una vez ocupados estos primeros sitios, la unión dejaría de comportarse como un modelo de sitios independientes para convertirse en un mecanismo de unión secuencial. En otras palabras, antes de que el cuarto sitio de unión de Cu²⁺ comience a llenarse, debe estar completamente ocupado el tercero. Esto implica que habría cierta influencia en la afinidad de unión de metales entre los sitios tercero y cuarto. Los espectros EPR confirmaron también la participación de residuos de His en la esfera de coordinación del Cu(II), mientras que los resultados de actividad enzimática por ITC de la proteína PaSdsA1-holo-Cu²⁺, corroborando que soporta la catálisis, y los reportes previos sobre el casi nulo efecto sobre la geometría y estequiometría en los complejos formados por algunas metaloenzimas de Zn(II) sustituidas con Cu(II) y Cd(II), sugieren que el mecanismo de unión sería muy similar para la interacción con Cu²⁺ y con Zn²⁺. De esta forma, de manera condensada, el mecanismo de unión, híbrido entre el mecanismo de sitios independientes y uno secuencial, y válido, en teoría, tanto para la interacción

7. Interacción PaSdsA1-Apo con Zn^{2+} y Cu^{2+}

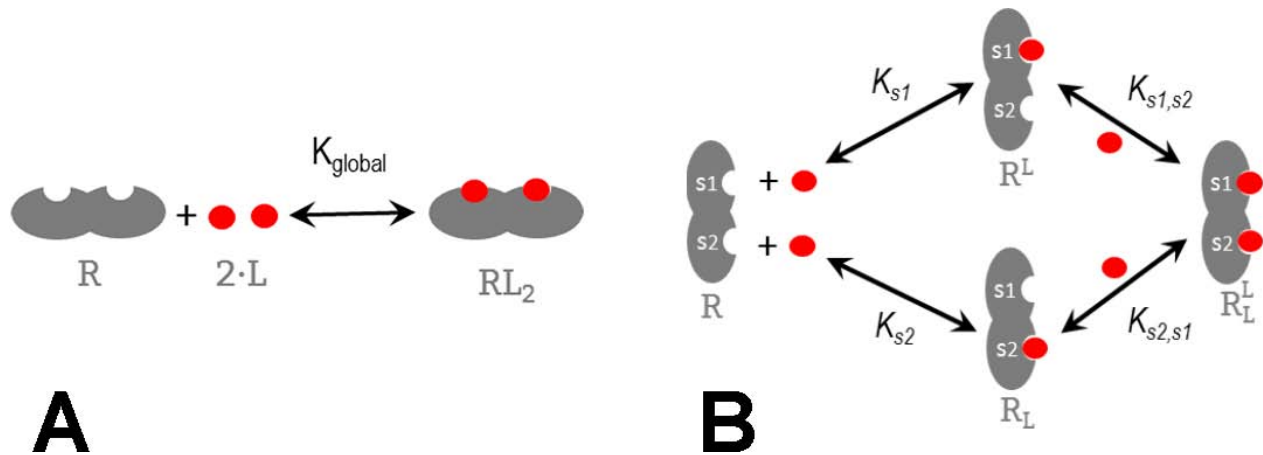


Figura 40. Diagrama de los equilibrios de unión posibles en una molécula receptora con dos sitios disponibles de interacción. (A) Modelo de unión estequiométrico. La constante global del proceso queda definida por $K_{global} = K_1 \cdot K_2$. (B) Este modelo considera que el ligante L (en esferas rojas) puede unirse a cualquiera de los sitios s1 y s2 y, posteriormente, ocuparse el sitio restante para saturar por completo la macromolécula [189].

con Zn^{2+} como como Cu^{2+} , sería el descrito en la **Figura 39**. Este mecanismo ha de ser comprobado calorimétricamente para ambos iones metálicos.

El análisis algebraico del mecanismo propuesto para asegurar una buena calidad de ajuste de los resultados de titulación calorimétrica, puede tratarse como sigue: de manera general, la interacción entre un ligante L y una molécula receptora R involucra la presencia de varias especies, incluyendo el complejo que se forma cuando R es completamente saturado con cierto número de ligandos, así como de intermediarios de R parcialmente ocupados. Este escenario puede ser descrito en términos de esquemas de reacción basados en equilibrios entre las especies estequiométricas existentes (**Figura 40.A**), y equilibrios entre la interacción de L con sitios específicos de R (**Figura 40.B**) [187,188]. Para el primer caso, el esquema de reacción involucra un primer equilibrio entre las especies libres y el intermediario RL, y después un equilibrio entre las especies RL + L y RL₂. Las constantes de unión asociadas a este modelo se denominan constantes estequiométricas y quedan descritas por:

7. Interacción PaSdsA1-Apo con Zn²⁺ y Cu²⁺

$$K_1 = \frac{[RL]}{[R] \cdot [L]} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$K_2 = \frac{[RL_2]}{[RL] \cdot [L]} \quad \text{Ecuación 4}$$

$$K_{global} = K_1 \cdot K_2 \quad \text{Ecuación 5}$$

La constante K_{global} describe el proceso completo en términos de K_1 y K_2 .

Para el caso en el cual L puede unirse a dos sitios de unión de la molécula hipotética R. En este caso, el esquema de reacción toma en cuenta la presencia de dos sitios de interacción en el receptor y dos intermediarios (R^L y R_L), que se forman cuando los ligantes se unen al sitio s_1 o s_2 ; posteriormente, se une una molécula del ligante al sitio de unión restante, hasta saturar los sitios disponibles [188]. Este modelo involucra la existencia de cuatro equilibrios, caracterizados por las constantes de unión K_{s1} , K_{s2} , K_{s1s2} y K_{s2s1} :

$$K_{s1} = \frac{[R^L]}{[R] \cdot [L]} \quad \text{Ecuación 6}$$

$$K_{s2} = \frac{[R_L]}{[R] \cdot [L]} \quad \text{Ecuación 7}$$

$$K_{s1s2} = \frac{[R^L]}{[R^L] \cdot [L]} \quad \text{Ecuación 8}$$

$$K_{s1s2} = \frac{[R_L]}{[R_L] \cdot [L]} \quad \text{Ecuación 9}$$

Debe enfatizarse el hecho de que las constantes estequiométricas y las constantes de sitio específico describen globalmente la unión R-L, pero representan diferentes tipos de equilibrio. Las constantes de unión estequiométricas no realizan distinción alguna entre los sitios específicos de unión. El intermediario estequiométrico RL comprime la contribución de los intermediarios de unión específica R^L y R_L , por lo cual, la constante K_1 contiene la información asociada con K_{s1} y K_{s2} . Lo mismo ocurre con K_2 y K_{s1s2} y K_{s2s1} . Empleando un balance de materia, es fácil demostrar que $[RL] = [R^L] + [R_L]$. Rearreglando los términos, se encuentra que las constantes estequiométricas y las de sitio específico de interacción se relacionan matemáticamente de la siguiente forma:

7. Interacción PaSdsA1-Apo con Zn^{2+} y Cu^{2+}

$$K_1 = K_{s_1} + K_{s_2} \quad \text{Ecuación 10}$$

$$K_2 = \frac{K_{s_1 s_2} \cdot K_{s_2 s_1}}{K_{s_1 s_2} + K_{s_2 s_1}} \quad \text{Ecuación 11}$$

En el caso particular de que los sitios de unión sean independientes, esto es, cuando la interacción del ligante L con el sitio s_1 no influye en la interacción de L con s_2 y viceversa, se tiene que $K_{s_1} = K_{s_2 s_1}$, dado que ambas describen el mismo equilibrio. De forma análoga, se puede demostrar que $K_{s_2} = K_{s_1 s_2}$. En esta situación, la **Ecuación 10** se mantendría igual, mientras que la **Ecuación 11** se convertiría en:

$$K_2 = \frac{K_{s_1} \cdot K_{s_2}}{K_{s_1} + K_{s_2}} \quad \text{Ecuación 12}$$

Por último, si los sitios son además equivalentes, esto es $s_1 = s_2$, las constantes estequiométricas y de sitio específico presentarían las siguientes relaciones:

$$K_1 = 2K_{s_1} \quad \text{Ecuación 13}$$

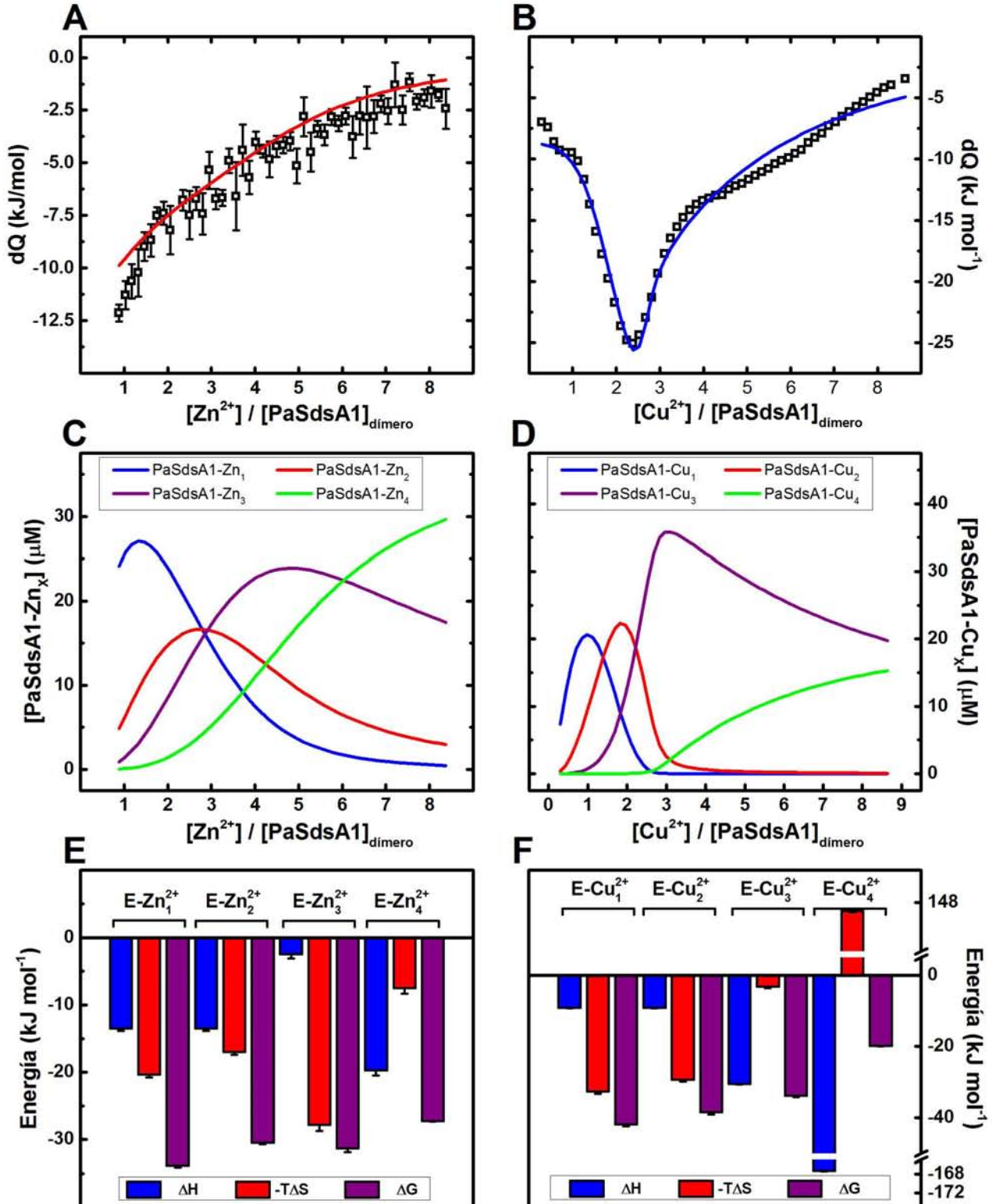
$$K_2 = \frac{1}{2} K_{s_1} \quad \text{Ecuación 14}$$

$$K_2 = \frac{1}{4} K_1 \quad \text{Ecuación 15}$$

Esta última suposición es especialmente acertada para el sistema PaSdsA1-holo- Cu^{2+} , en donde se comprobó espectroscópicamente que los primeros sitios de unión del dímero se comportan como sitios independientes. El resto de los sitios de interacción pueden ser tratados y descritos como constantes estequiométricas, esto es K_3 para la unión del tercer átomo de Cu^{2+} y K_4 para el cuarto.

7. Interacción PaSdsA1-Apo con Zn^{2+} y Cu^{2+}

El software proporcionado por el fabricante del calorímetro ITC empleado (Origin 7.0) no es capaz de brindar resultados aceptables cuando se intenta ajustar las curvas calorimétricas de titulación a los modelos tradicionales, esto es, modelo secuencial, de uno y dos sitios



7. Interacción PaSdsA1-Apo con Zn^{2+} y Cu^{2+}

Figura 41. Ajuste al modelo híbrido de la **Figura 39**, utilizando el servidor AFFINImeter [189,190], de los experimentos de titulación por ITC de la PaSdsA1-apo con Zn^{2+} (A, C y E) y con Cu^{2+} (B, D y F). (A) y (B), integración de los picos de titulación utilizando el algoritmo de reconocimiento de línea base reportado en [190] y ajuste al modelo híbrido 1:4. Puede observarse que, para el caso del Zn^{2+} , las barras de error asociadas a la integración son más grandes que para el Cu^{2+} , que casi no se distinguen. Los ajustes resultaron muy buenos, con incertidumbres no mayores al 20 % y con gráficos de residuales de calidad aceptable. Los parámetros obtenidos por el ajuste, y sus incertidumbres, se resumen en la **Tabla 4**. (C) y (D), diagramas de variación de especies, que muestran que el Zn^{2+} se une a la proteína con una menor afinidad que el Cu^{2+} al inicio de la titulación. Mientras se continúa añadiendo Zn(II), se observa la formación del PaSdsA1- Zn_4 , que alcanza valores importantes de concentración hacia el final del experimento. Por otro lado, la unión del Cu(II) a la proteína es fuerte y se establece el complejo PaSdsA1- Cu_3 fácilmente; sin embargo, la formación del complejo saturado de cobre no se encuentra muy favorecido. De hecho, aún por arriba de los 8 equivalentes de Cu^{2+} por dímero, la concentración de la proteína PaSdsA1-holo- Cu^{2+} apenas es la mitad de la concentración alcanzada para su contraparte PaSdsA1-holo- Zn^{2+} . (E) y (F), firmas calorimétricas de las uniones PaSdsA1 con Zn^{2+} y Cu^{2+} , respectivamente.

independientes y de interacción competitiva; además, las características de Origin 7.0 no permiten una programación sencilla para el mecanismo presentado en la **Figura 39**. Para esto, se ha empleado el servidor AFFINImeter (<https://www.affinimeter.com/>, [189]), en el cual, entre muchas otras ventajas, se han implementado algoritmos especiales para llevar a cabo un proceso optimizado de integración de los picos de la curva de titulación, realizando ajustes de mínimos cuadrados no lineales y detectando la zona en la cual el pico ha regresado a la línea base [190]. Por otro lado, el ajuste al modelo de la **Figura 39** resulta un procedimiento relativamente simple y rápido.

En la **Figura 41** se presentan los resultados de la titulación de PaSdsA1 con Zn^{2+} y Cu^{2+} por ITC, utilizando el algoritmo de integración de picos de AFFINImeter y el ajuste al modelo híbrido de la **Figura 39**. En A y B se muestran las barras de error asociadas a cada pico de la titulación, donde puede observarse que el experimento con Zn^{2+} tiene mayores incertidumbres que el de Cu^{2+} . El ajuste al modelo híbrido (línea roja para el Zn^{2+} y azul para el Cu^{2+}) se llevó a cabo considerando la relación entre las constantes estequiométricas y las constantes de unión a sitio específico de las Ecuaciones 13-15. Esto significa que el ajuste se realizó restringiendo a K_2 y ΔH_2 para que tuvieran los valores $K_2 = \frac{1}{4} K_1$ y $\Delta H_2 = \Delta H_1$, dado que ambos equilibrios estequiométricos modelan la unión de sitios equivalentes con los metales correspondientes. De esta forma, se ajustaron solamente los parámetros K_1 , K_3 , K_4 , ΔH_1 , ΔH_3 y ΔH_4 . En la **Tabla 5** se resumen todos los parámetros obtenidos.

7. Interacción PaSdsA1-Apo con Zn²⁺ y Cu²⁺

Tabla 5. Parámetros de ajuste al modelo híbrido 1:4 para los sistemas PaSdsA1-Zn²⁺ y PaSdsA1-Cu²⁺.

Reacción*	Parámetro	M= Zn ²⁺	M= Cu ²⁺
E + M → E-M	K_1 (M ⁻¹)	(1.062 ± 0.108) x 10 ⁶	(2.839 ± 0.671) x 10 ⁷
	ΔH_1 (kJ mol ⁻¹)	-13.48 ± 0.35	-9.19 ± 0.15
	-T ΔS_1 (kJ mol ⁻¹)	-20.34 ± 0.43	-32.64 ± 0.60
	ΔG_1 (kJ mol ⁻¹)	-33.82 ± 0.25	-41.83 ± 0.58
E-M + M → E-M₂	K_2 (M ⁻¹)	(2.655 ± 0.270) x 10 ⁵	(7.098 ± 1.678) x 10 ⁶
	ΔH_2 (kJ mol ⁻¹)	-13.48 ± 0.35	-9.19 ± 0.15
	-T ΔS_2 (kJ mol ⁻¹)	-16.96 ± 0.43	-29.26 ± 0.60
	ΔG_2 (kJ mol ⁻¹)	-30.44 ± 0.25	-38.45 ± 0.58
E-M₂ + M → E-M₃	K_3 (M ⁻¹)	(2.484 ± 0.589) x 10 ⁵	(1.038 ± 0.173) x 10 ⁶
	ΔH_3 (kJ mol ⁻¹)	-2.44 ± 0.64	-30.51 ± 0.07
	-T ΔS_3 (kJ mol ⁻¹)	-27.84 ± 0.85	-3.25 ± 0.41
	ΔG_3 (kJ mol ⁻¹)	-31.28 ± 0.56	-33.76 ± 0.40
E-M₃ + M → E-M₄	K_4 (M ⁻¹)	(7.122 ± 0.219) x 10 ⁴	(3.480 ± 0.082) x 10 ³
	ΔH_4 (kJ mol ⁻¹)	-19.70 ± 0.79	-167.36 ± 0.07
	-T ΔS_4 (kJ mol ⁻¹)	-7.52 ± 0.79	147.48 ± 0.09
	ΔG_4 (kJ mol ⁻¹)	-27.23 ± 0.08	-19.88 ± 0.06

***E** y **M** representan a la enzima PaSdsA1 y al átomo metálico con el que se une, respectivamente.

La energía libre de Gibbs se determinó a partir de la constante de equilibrio, con la ecuación $\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq}$; mientras que la contribución entrópica se obtuvo despejando de $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$. Analizando los valores de la tabla, puede apreciarse que la afinidad de la enzima por el ion Cu²⁺, reflejada en las constantes de equilibrio, es más alta que por Zn²⁺, al menos la ocupación de los primeros tres sitios de unión del dímero. En ambos sistemas se observa que para la unión desde

7. Interacción PaSdsA1-Apo con Zn²⁺ y Cu²⁺

uno hasta tres equivalentes de M²⁺ por dímero, el proceso se encuentra favorecido entrópicamente y entálpicamente, llevando a valores de energía libre que fácilmente superan los -30 kJ mol⁻¹ (**Figura 41.E y F**). No obstante, la diferencia se encuentra en la ocupación del último sitio de unión, donde para Zn²⁺, el proceso continúa siendo favorable entrópicamente y entálpicamente, pero no para el caso del Cu²⁺, donde se observa una fuerte penalización entrópica que es superada por la contribución entálpica. Existen algunos informes en donde se ha reportado que, en general, diversas enzimas tienen predilección por unir a Cu²⁺ que a Zn²⁺ [174]; sin embargo, la razón por la cual muy probablemente la presión evolutiva no ha eliminado al Zn de la PaSdsA1 es que el Cu tiende a participar en reacciones redox con residuos vulnerables en la proteína, como la Met (hay que recordar que esta sulfatasa no contiene un solo residuo de Cys, por lo que carece de puentes disulfuro), lo cual podría comprometer seriamente la estabilidad cinética y/o termodinámica de la misma. Además, se observó por el ensayo de actividad enzimática de la enzima PaSdsA1-holo-Cu²⁺ que tiene una constante K_M de la misma magnitud que PaSdsA1-holo-Zn²⁺, pero su valor de k_{cat} es claramente inferior (ver **Figura 37 y Tabla 4**). Respecto a los parámetros termodinámicos de unión, puede decirse que, para casi todos los casos, se trata de procesos que están favorecidos entrópicamente y entálpicamente. La única excepción resultó ser la unión del cuarto átomo de Cu²⁺, que tiene contribuciones entrópica y entálpica muy grandes. Esto probablemente sea debido a que haya en realidad dos fenómenos ocurriendo al mismo tiempo: primero, la afinidad de la enzima por el último Cu²⁺ es muy baja, lo cual favorece que exista cantidad considerable de Cu²⁺ libre; segundo, el Cu²⁺ no se mantiene en disolución a pH 8.0, lo cual probablemente lleve a la formación de una cantidad pequeña, indetectable a simple vista, de Cu(OH)₂. De ser así, el último equilibrio no estaría completamente caracterizado; sin embargo, la precipitación de hidróxidos es una reacción secundaria no deseada difícil de eliminar, debido a que la solubilidad del Cu(II) es incluso menor que la del Zn(II) en estas condiciones de pH. Una posibilidad es trabajar con otro amortiguador, pero debe tomarse en cuenta que encontrar el amortiguador óptimo que cumpla con las características requeridas, esto es, buena capacidad amortiguadora a pH 8.0 y una afinidad lo suficientemente baja para que no interfiera con la unión con la proteína, pero no tan baja como para que el Cu(II) precipite, implica una larga búsqueda, que nos llevó, en este trabajo, a considerar al Tris como el amortiguador más cercano a cumplir con estos requisitos.

Las gráficas de variación de especies (**Figura 41.C y D**) muestran una evidente tendencia a formar, con ambos metales, la especie PaSdsA1-M₃, pero la forma holo nunca llega a alcanzar el

7. Interacción PaSdsA1-Apo con Zn^{2+} y Cu^{2+}

100 % de las especies en disolución. Esto está en concordancia con el hecho de que, durante la titulación, nunca se alcanzó la línea base, ni siquiera restando los correspondientes experimentos de dilución de los iones metálicos. Esto también parece explicar por qué razón, durante la expresión de la proteína, nunca se alcanzaron lotes donde el 100 % de la población de la enzima fuera la forma PaSdsA1-holo (ver **sección 6.1**). La especie PaSdsA1-holo sólo fue posible conseguirla al calentar hasta 70 °C y luego eliminar los precipitados generados por centrifugación a 14 000 rpm y filtración.

En resumen, el mecanismo híbrido planteado en la **Figura 39** representa el comportamiento experimental observado durante la titulación de la enzima tanto con Zn^{2+} como con Cu^{2+} . Además, confirma los resultados observados por espectroscopía de absorción electrónica, dicroísmo circular y EPR, para el caso del Cu(II).

8 Conclusiones

1. La desnaturalización térmica de la forma holo es irreversible y está controlada cinéticamente.
2. La desnaturalización química con urea de la forma holo es reversible, lo cual implica que el entrelazamiento de las cadenas en el dominio de dimerización se conserva en el estado desnaturalizado.
3. La afinidad de la proteína por los iones Zn^{2+} es lo suficientemente alta como para que el dímero desplegado químicamente sea capaz de reclutar al Zn necesario del medio durante el proceso de renaturalización, produciendo nuevamente las tres formas del estado nativo de la enzima.
4. En presencia de SDS, la desnaturalización térmica favorece la disociación de los dímeros.
5. La desnaturalización térmica de los monómeros estabilizados por SDS es reversible pero no produce dímeros, aún en presencia de un exceso estequiométrico de Zn (II).
6. El mecanismo de unión de la forma PaSdsA1-apo con Cu^{2+} , a partir de los resultados espectroscópicos, involucra la interacción entre dos equivalentes de Cu(II) y un sitio de unión independiente presente en ambos monómeros de la sulfatasa y, posteriormente, la unión secuencial y estequiométrica de dos equivalentes de Cu(II) al segundo sitio disponible de cada monómero.
7. Los mecanismos de unión PaSdsA1- Cu^{2+} y PaSdsA1- Zn^{2+} son esencialmente el mismo.
8. La hidrólisis de la molécula de SDS puede ser catalizada tanto por PaSdsA1- Zn^{2+} como por PaSdsA1- Cu^{2+} , pero la k_{cat} de la enzima con Cu(II) es la tercera parte del valor de la k_{cat} para la sulfatasa con Zn(II). Los valores de K_M son iguales.

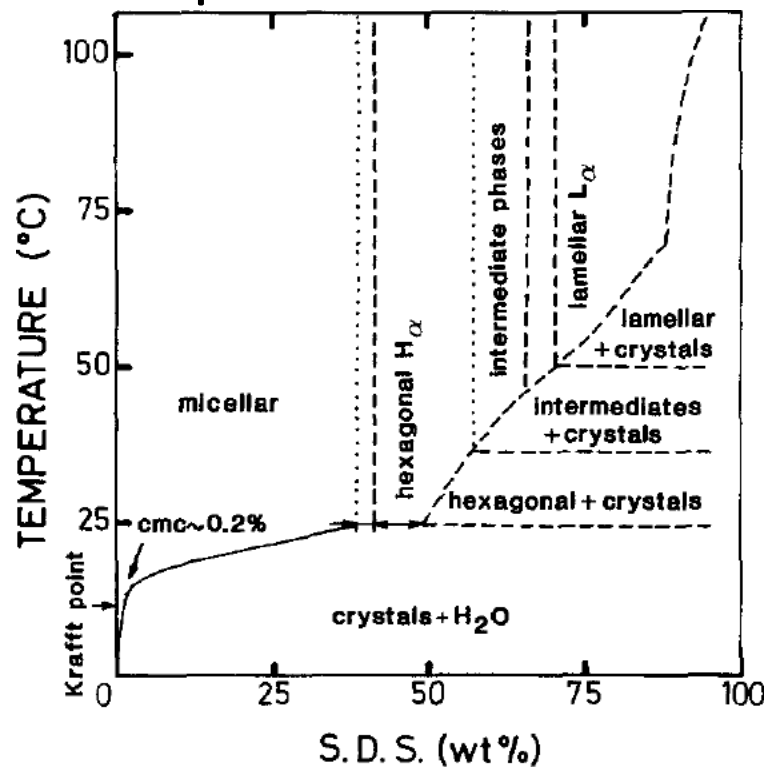
9 Perspectivas

En el área de la caracterización de los mecanismos de desnaturalización térmica y química de la PaSdsA1, se sugiere considerar mutaciones puntuales en el dominio de dimerización para llegar a una comprensión y corroboración, a nivel molecular, de la importancia de este dominio y su papel en la reversibilidad de la desnaturalización. Una posibilidad es introducir residuos de cisteína en el lazo entre las hélices $\alpha 10$ y $\alpha 11$ (ver **Figura 10**), que es la región clave del dominio de dimerización. Modulando el ambiente redox de la disolución de proteína, se podría controlar la formación del entrelazado de este dominio mediante el establecimiento de puentes disulfuro, una interacción covalente que permitiría estudiar el desplegamiento de la enzima impidiendo que el dímero se disocie en los procesos de desnaturalización térmica y química. Favoreciendo la ruptura del puente disulfuro entre estos residuos hipotéticos de Cys con ambientes reductores, podría también estudiarse a detalle la desnaturalización en una proteína que, en principio, debería comportarse como la PaSdsA1 silvestre. No obstante, una posibilidad interesante sería estudiar la formación de monómeros por incremento de la temperatura en presencia de SDS, y después someterlos a un ambiente oxidante que favorezca la formación del puente disulfuro, restableciendo el entrelazado del dominio de dimerización y permitiendo, en teoría, regenerar el dímero plegado a partir de monómeros. Esta mutación podría controlar la reversibilidad del proceso de desnaturalización. Por otra parte, no debe dejarse de lado analizar el efecto de los iones metálicos en la reversibilidad del desplegamiento de la proteína. Se sabe que la eliminación de los átomos metálicos tiene un efecto directo en la T_m de las tres formas del estado nativo de la PaSdsA1; sin embargo, a pesar de que los estados finales de la desnaturalización térmica (en presencia de SDS) y química no contienen metales, se ignora el momento en que la enzima pierde sus metales y si el mecanismo de

desplegamiento será el mismo en ausencia de Zn^{2+} . Los resultados globales que se obtengan permitirían un análisis más profundo y a nivel molecular del proceso general de desplegamiento.

Respecto al mecanismo de interacción entre la PaSdsA1 y los metales, se sugiere realizar la simulación de los espectros de EPR con la intención de obtener información acerca de la geometría de los residuos que coordinan a los iones Cu^{2+} en la proteína PaSdsA1-Cu(II). También sería de importancia lograr cristalizar la proteína sustituida con Cu(II), lo cual generaría evidencias sobre las similitudes y las diferencias entre las esferas de coordinación de la enzima con Cu(II) y con Zn(II). Igualmente, sería importante contar con la estructura cristalográfica de la forma apo de la PaSdsA1 que, junto con los ya disponibles para las formas holo y 2Zn [58]), serían de utilidad para comprender el papel de los iones Zn(II) como elementos vitales en la estabilidad estructural de la proteína. Finalmente, se sugiere concluir el estudio cinético de la PaSdsA1 tanto en sus formas holo-Zn y 2Zn, como la de sus análogos holo-Cu y 2Cu, con la intención de contribuir a la comprensión del mecanismo de catálisis. En este trabajo, únicamente se reportaron las constantes de Michaelis-Menten a 20 °C para la proteína coordinada con alguno de los metales utilizados (formas holo), por lo cual es preciso realizar un estudio completo que incluya la determinación de las constantes de rapidez y las energías de activación considerando el mecanismo mostrado en la **Figura 8**. Esto es especialmente importante para explicar la capacidad del Cu(II) y de la forma 2Zn para realizar la catálisis.

10 Apéndice



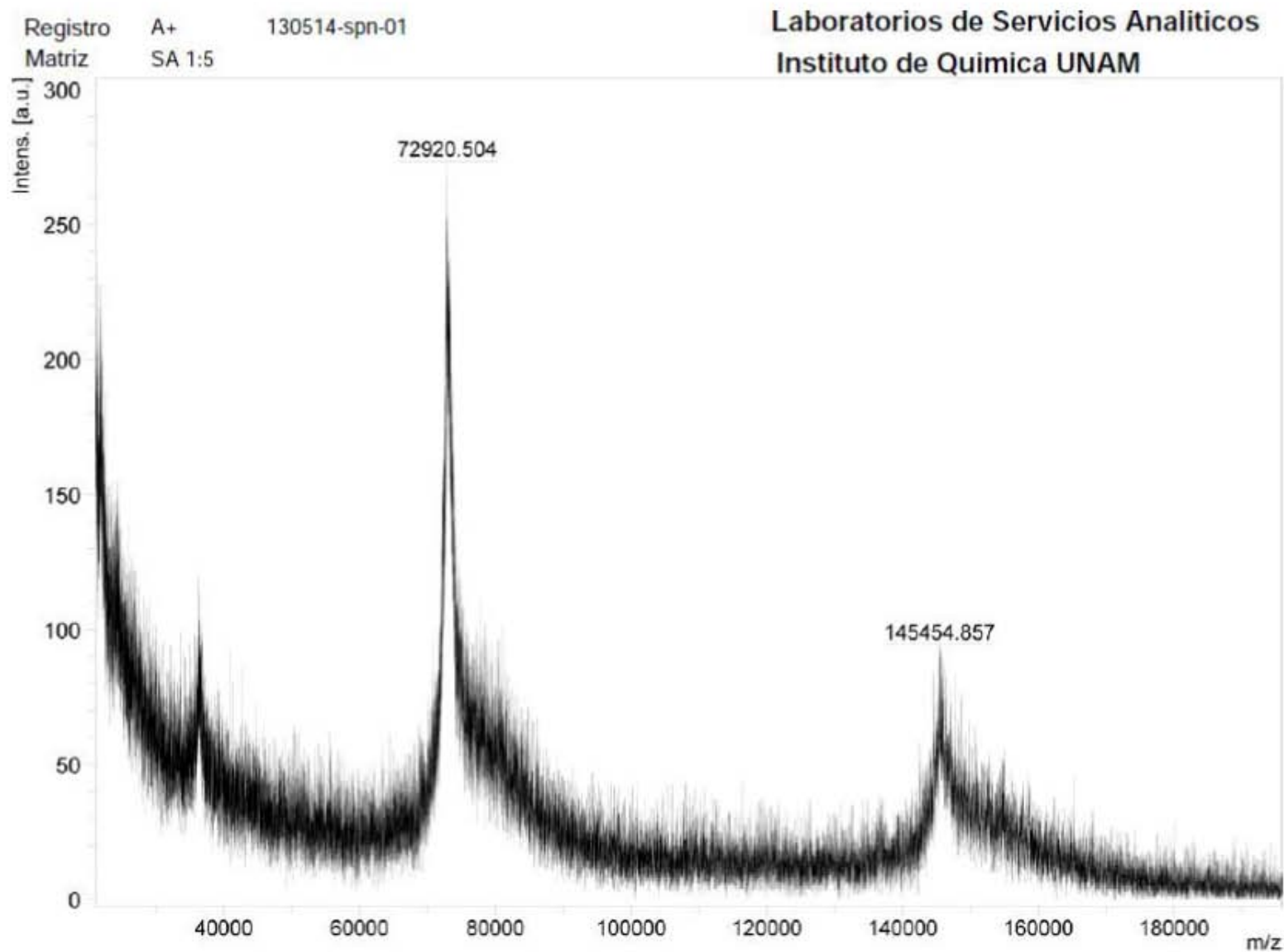


Figura 42. Espectro de masas de la proteína PaSdsA1 en forma holo dimérica con cola de histidinas. Puede apreciarse el pico correspondiente al ion molecular (145.5 kDa).

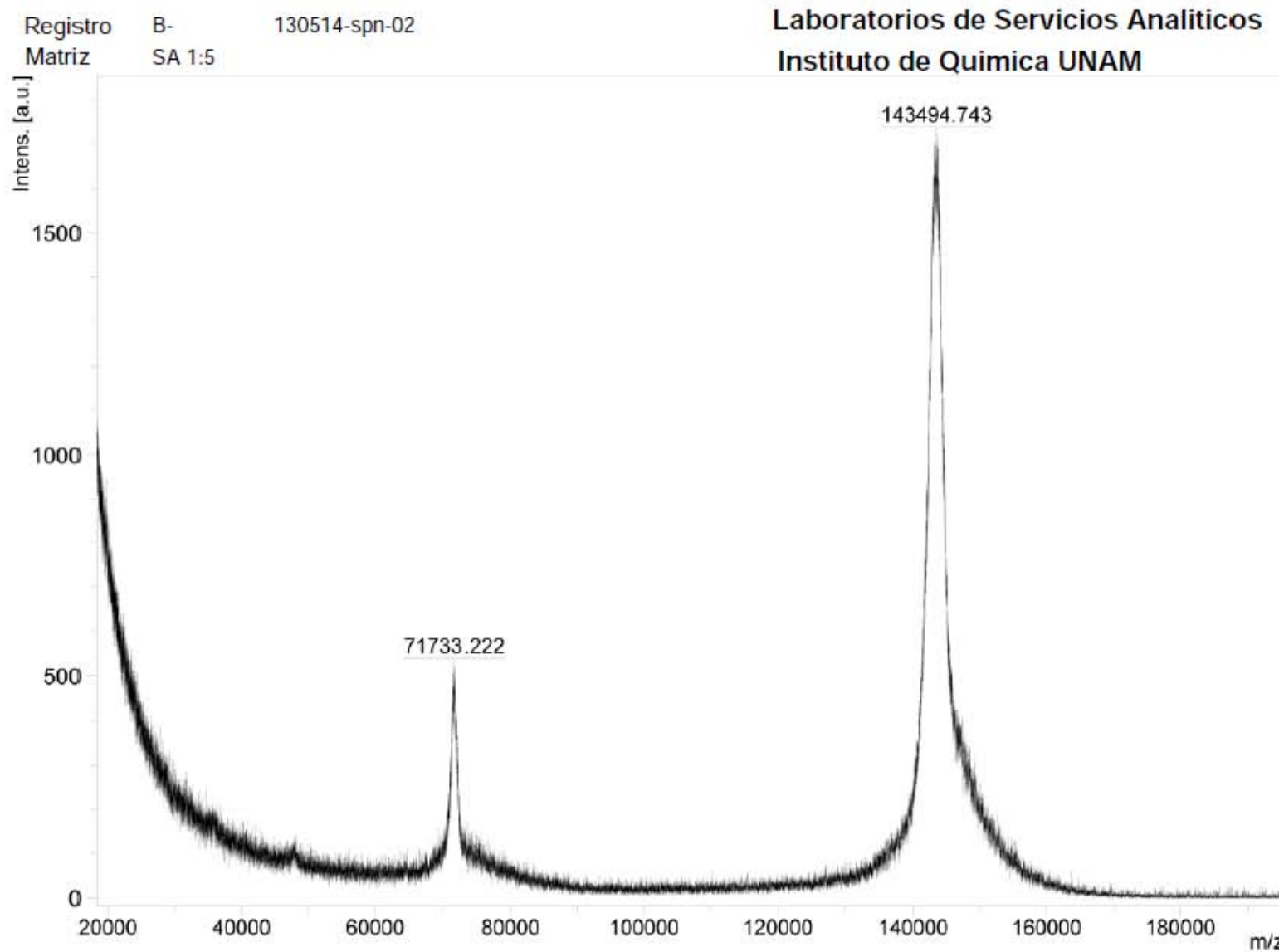


Figura 43. Espectro de masas de la proteína PaSdsA1 en forma holo dimérica después del corte de la cola de histidinas. El pico correspondiente al ion molecular ha disminuido a 143.5 kDa. La diferencia en peso observada corresponde a 1.1 veces la secuencia GHHHHHH por monómero.

10. Apéndice

Tabla 6. Vecinos del residuo E280, los iones ZnA y ZnB determinados a partir de las estructuras de las formas holo y 2Zn.

Las distancias fueron obtenidas utilizando el programa Ligand-Protein Contacts & Contacts of Structural Units, disponible en <http://bip.weizmann.ac.is/oca-bin/lpcsu/>
 Sobolev V., Sorokine A., Prilusky J., Abola E. E. and Edelman M. (1999) Automated analysis of interatomic contacts in proteins. *Bioinformatics*, 15, 327-332
 Códigos PDB: 2CFU (PaSdsA1-holo) y 2CG3 (PaSdsA1-2Zn)
 Cutoff: 5 Å

PaSdsA1-2Zn			PaSdsA1-Holo			PaSdsA1-2Zn			PaSdsA1-Holo		
NEIGHBOURS OF E280			NEIGHBOURS OF E280			NEIGHBOURS OF ZnA			NEIGHBOURS OF ZnA and ZnB		
Atom	Atom	Dist. (Å)	Atom	Atom	Dist. (Å)	Atom	Atom	Dist. (Å)	Atom	Atom	Dist. (Å)
N GLU 280	C THR 279	1.3	N GLU 280	C THR 279	1.3	ZnA 1001	NE2 HIS 169	4.2	ZnA 1001	NE2 HIS 169	4.1
N GLU 280	CA THR 279	2.4	N GLU 280	CA THR 279	2.5	ZnA 1001	CE1 HIS 169	4.2	ZnA 1001	CE1 HIS 169	4.2
N GLU 280	N SER 281	2.6	N GLU 280	OG1 THR 279	2.7	ZnA 1001	OD2 ASP 173	2.4	ZnA 1001	OD1 ASP 173	3.3
N GLU 280	OG1 THR 279	3.1	N GLU 280	N SER 281	2.7	ZnA 1001	OD1 ASP 173	3.4	ZnA 1001	OD2 ASP 173	2.2
N GLU 280	O GLY 278	3.9	N GLU 280	CB THR 279	2.8	ZnA 1001	CG ASP 173	3.2	ZnA 1001	CG ASP 173	3.1
C GLU 280	N SER 281	1.3	N GLU 280	CZ3 TRP 322	3.9	ZnA 1001	CB ASP 173	4.6	ZnA 1001	CB ASP 173	4.4
C GLU 280	CA SER 281	2.5	C GLU 280	N SER 281	1.3	ZnA 1001	NE2 HIS 174	2.3	ZnA 1001	CE1 HIS 174	3.0
C GLU 280	C THR 279	3.2	C GLU 280	CA SER 281	2.5	ZnA 1001	CE1 HIS 174	3.2	ZnA 1001	NE2 HIS 174	2.0
C GLU 280	CD PRO 282	3.3	C GLU 280	C THR 279	3.1	ZnA 1001	CD2 HIS 174	3.3	ZnA 1001	ND1 HIS 174	4.1
C GLU 280	CB SER 281	3.6	C GLU 280	O THR 279	3.2	ZnA 1001	CG HIS 174	4.4	ZnA 1001	CD2 HIS 174	3.0
C GLU 280	OG SER 281	3.9	C GLU 280	NE ARG 317	4.0	ZnA 1001	ND1 HIS 174	2.9	ZnA 1001	CG HIS 174	4.2
O GLU 280	N SER 281	2.3	O GLU 280	N SER 281	2.3	ZnA 1001	OE1 GLU 299	2.0	ZnA 1001	OE1 GLU 280	4.4
O GLU 280	CA SER 281	3.0	O GLU 280	CA SER 281	2.8	ZnA 1001	OE2 GLU 299	2.8	ZnA 1001	OE2 GLU 280	4.4
O GLU 280	CD PRO 282	3.3	O GLU 280	CZ ARG 317	3.1	ZnA 1001	CD GLU 299	2.7	ZnA 1001	OE1 GLU 299	2.1
O GLU 280	CB ALA 198	4.2	O GLU 280	NE ARG 317	3.2	ZnA 1001	CG GLU 299	4.2	ZnA 1001	OE2 GLU 299	3.0
O GLU 280	OG SER 281	4.3	O GLU 280	NH2 ARG 317	3.2	ZnA 1001	CB GLU 299	4.7	ZnA 1001	CD GLU 299	2.9
CA GLU 280	C THR 279	2.5	O GLU 280	CE1 HIS 171	3.2	ZnA 1001	NE2 HIS 344	2.1	ZnA 1001	CG GLU 299	4.3
CA GLU 280	O THR 279	2.9	O GLU 280	NE2 HIS 171	3.8	ZnA 1001	CE1 HIS 344	3.0	ZnA 1001	CB GLU 299	4.9
CA GLU 280	O GLY 278	4.8	CA GLU 280	C THR 279	2.5	ZnA 1001	ND1 HIS 344	4.2	ZnA 1001	CG HIS 344	4.2
CB GLU 280	N SER 281	3.3	CA GLU 280	O THR 279	2.8	ZnA 1001	CG HIS 344	4.3	ZnA 1001	ND1 HIS 344	4.1
CB GLU 280	OG SER 281	4.9	CA GLU 280	CH2 TRP 322	3.7	ZnA 1001	CD2 HIS 344	3.1	ZnA 1001	NE2 HIS 344	2.0
CB GLU 280	CB SER 281	4.9	CA GLU 280	CZ3 TRP 322	3.8	ZnA 1001	CB ALA 123	4.1	ZnA 1001	CD2 HIS 344	3.0
			CA GLU 280	CD ARG 317	4.3	ZnA 1001	CD1 ISO 239	4.4	ZnA 1001	CE1 HIS 344	3.0
			CB GLU 280	N SER 281	3.4	ZnA 1001	CB VAL 343	4.9	ZnA 1001	O 1002	2.1
			CB GLU 280	OE1 GLU 284	3.5				ZnA 1001	Zn 1002	3.3
			CB GLU 280	CH2 TRP 322	3.6				ZnA 1001	CB ALA 123	4.6
			CB GLU 280	O GLU 299	3.7				ZnA 1001	CD1 ISO 239	4.5
			CB GLU 280	CZ2 TRP 322	3.8				ZnB 1002	NE2 HIS 169	2.1
			CB GLU 280	OE2 GLU 284	3.9				ZnB 1002	CE1 HIS 169	3.2
			CB GLU 280	OG1 THR 279	4.3				ZnB 1002	ND1 HIS 169	4.3

10. Apéndice

Tabla 5. Vecinos del residuo E280, los iones ZnA y ZnB determinados a partir de las estructuras de las formas holo y 2Zn. (Cont.)

PaSdsA1-2Zn			PaSdsA1-Holo			PaSdsA1-2Zn			PaSdsA1-Holo		
NEIGHBOURS OF E280			NEIGHBOURS OF E280			NEIGHBOURS OF ZnA			NEIGHBOURS OF ZnA and ZnB		
Atom	Atom	Dist. (Å)	Atom	Atom	Dist. (Å)	Atom	Atom	Dist. (Å)	Atom	Atom	Dist. (Å)
			CB GLU 280	C GLU 299	4.3				ZnB 1002	CD2 HIS 169	2.9
			CG GLU 280	CE1 HIS 306	3.6				ZnB 1002	CG HIS 169	4.2
			CG GLU 280	O GLU 299	3.6				ZnB 1002	ND1 HIS 171	2.1
			CG GLU 280	NE2 HIS 306	3.7				ZnB 1002	CE1 HIS 171	3.0
			CG GLU 280	CH2 TRP 322	3.9				ZnB 1002	CG HIS 171	3.1
			CG GLU 280	NH1 ARG 317	4.2				ZnB 1002	NE2 HIS 171	4.2
			CD GLU 280	Zn1002	2.8				ZnB 1002	CD2 HIS 171	4.2
			CD GLU 280	CE1 HIS 171	3.5				ZnB 1002	CB HIS 171	3.4
			CD GLU 280	CB GLU 299	3.5				ZnB 1002	CA HIS 171	4.9
			OE1 GLU 280	OE1 GLU 284	2.6				ZnB 1002	OD1 ASP 173	4.3
			OE1 GLU 280	CD2 HIS 169	2.9				ZnB 1002	OD2 ASP 173	4.9
			OE1 GLU 280	NE2 HIS 169	3.1				ZnB 1002	CD2 HIS 174	4.0
			OE1 GLU 280	CD GLU 284	3.4				ZnB 1002	NE2 HIS 174	3.9
			OE2 GLU 280	Zn1002	2.0				ZnB 1002	CE1 HIS 174	5.0
			OE2 GLU 280	CD GLU 299	2.9				ZnB 1002	OE2 GLU 280	2.0
			OE2 GLU 280	OE2 GLU 299	3.1				ZnB 1002	CD GLU 280	2.8
			OE2 GLU 280	ND1 HIS 171	3.2				ZnB 1002	OE1 GLU 280	3.0
			OE2 GLU 280	CE1 HIS 171	3.3				ZnB 1002	CG GLU 280	4.3
									ZnB 1002	OE1 GLU 299	2.8
									ZnB 1002	OE2 GLU 299	3.6
									ZnB 1002	CD GLU 299	3.3
									ZnB 1002	CG GLU 299	4.3
									ZnB 1002	CB GLU 299	4.3
									ZnB 1002	Zn 1001	3.3
									ZnB 1002	O 1002	1.9
									ZnB 1002	O 2532	3.7
									ZnB 1002	O 2530	3.5

11 Artículo FEBS Letters

Autores: Aguirre C, Goto Y & Costas M

Año: 2016

Título: Thermal and chemical unfolding pathways of PaSdsA1 sulfatase, a homo-dimer with topologically interlinked chains

Revista: FEBS Letters

Volumen: 590

Páginas: 202–214

doi: 10.1002/1873-3468.12041

Thermal and chemical unfolding pathways of PaSdsA1 sulfatase, a homo-dimer with topologically interlinked chains

César Aguirre¹, Yuji Goto² and Miguel Costas¹

¹ Laboratorio de Biofísicoquímica, Departamento de Físicoquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F., México

² Protein Folding Laboratory, Institute for Protein Research, Osaka University, Japan

Correspondence

Y. Goto, Protein Folding Laboratory,
Institute for Protein Research, Osaka
University, Yamadaoka 3-2, Osaka
565-0871, Japan
Fax: + 81 6 6879 8616
Tel: + 81 6 6879 8614
E-mail: gtyj8126@protein.osaka-u.ac.jp
and

M. Costas, Laboratorio de Biofísicoquímica,
Departamento de Físicoquímica, Facultad de
Química, Universidad Nacional Autónoma de
México, México D.F. 04510 México
Tel: 52 55 5622 3169
E-mail: costasmi@unam.mx

Dedications: *In memoriam* of Prof. Armando
Gómez-Puyou

(Received 27 July 2015, revised 17
November 2015, accepted 7 December
2015)

doi:10.1002/1873-3468.12041

Edited by Miguel De la Rosa

Understanding the mechanisms as to how interlinked proteins entangle and fold is a challenge. PaSdsA1 sulfatase is a homo-dimer containing two zinc atoms per monomer. The monomer chains are interlinked in a dimerization domain. To study the unfolding pathways denaturation experiments were performed. In the native protein three forms coexist in chemical equilibrium, each with a different number of zinc atoms. In the chemical unfolding of the holo-dimers the entanglement of the chains is preserved and acts as a ‘folding seed’, allowing the unfolding process to be reversible. Thermal irreversible unfolding of the holo-dimers favours dissociation, producing monomers that are SDS-stabilized. The thermal unfolding of these monomers is reversible. However, it is not possible to form dimers from unfolded monomers.

Keywords: entangled chains; interlinked chains; PaSdsA1 sulfatase; stabilization with SDS; unfolding pathways

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative bacillus which belongs to *Pseudomonas* genus [1]. This bacterium is an opportunistic pathogen that usually infects individuals whose immunological system has been weakened [2–4]. It has been found growing in wastewater, sewages and other places where sodium dodecyl sulfate (SDS) and other surfactants used in cleaning

products are present [5,6]. Several studies have shown that the *Pseudomonas* enzyme PaSdsA1 sulfatase is capable of hydrolyzing SDS to yield 1-dodecanol and SO_4^{2-} as its sources of carbon and sulfur respectively [7–10]. PaSdsA1 structure has been solved by X-ray diffraction (Fig. 1A) and it was found that it defines the first member of class III sulfatase [8]. These proteins

Abbreviations

DSC, differential scanning calorimetry; DTT, dithiothreitol; E_{act} , activation energy; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; IPTG, isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside; ITC, isothermal titration calorimetry; k , first order rate constant; Ni-NTA, Ni^{2+} -nitrilotriacetic acid; OD, optical density; PAR, 4-(2-pyridylazo)-resorcinol; PaSdsA1, *Pseudomonas aeruginosa* SdsA1 sulfatase; TEV, tobacco etch virus; T_m , melting temperature; Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane.

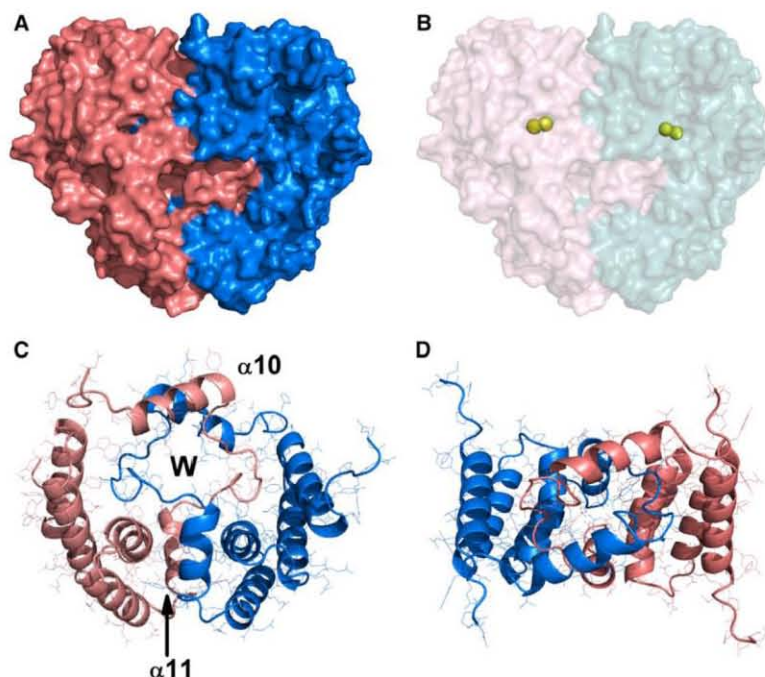


Fig. 1. Crystal structure of PaSdsA1 (PDB 2CFZ). (A) Crystal structure of the homo-dimeric sulfatase showing the two monomers. (B) Position of the two zinc atoms in each monomer and the dimerization domain. Panels (C) and (D) are two views of the dimerization domain. The entanglement between both chains involves the loops separating the $\alpha 10$ and $\alpha 11$ helices. W in (C) denotes a cavity occupied by 30 water molecules.

have in their catalytic site two zinc atoms [11] per monomer (hereon denoted as the holo form) and a folding motif similar to that present in the metallo- β -lactamases family [12,13]. From the structural characteristics, a catalytic mechanism has been proposed. This involves a nucleophilic attack to the sulfur atom of SDS by one water molecule which is activated through specific interactions with an OH^- -bridge group that coordinates both zinc atoms in the catalytic site [8,11,14].

PaSdsA1 is a large homo-dimeric protein (146.7 kDa) that contains 658 amino acid residues per monomer. These subunits are bound together by a dimerization domain, composed by 140 amino acids, where the two chains are entangled (Fig. 1B,C,D) [8]. The entanglement or linking between both chains involves the loops separating the $\alpha 10$ and $\alpha 11$ helices, and contains 14 amino acids (GYDGNPATLDPLS). This loop deeply penetrates the adjacent subunit as shown in Fig. 1B,C,D. There are no intermolecular disulfide bonds leading to this topological linkage since the sequence of PaSdsA1 does not contain any single cysteine residue. The entanglement possesses a cavity where 30 water molecules are located (Fig. 1C).

When the protein is expressed in a media with a reduced amount of zinc and crystallized [8], a form of PaSdsA1 which contains one zinc atom per monomer (hereon denoted as the 2Zn form) was found. This suggests that in solution the holo and 2Zn forms might coexist in chemical equilibrium. Figure 2A shows that

the whole dimerization domain, and hence the entanglement and the cavity filled with water, are identical in the holo and 2Zn forms. The main difference between them is found in the coordination sphere of the catalytic zinc atoms, where a loop containing the amino acid E280 -that coordinates with a zinc atom- is greatly displaced, as can be observed in Fig. 2B,C, the B-factor values (Fig. S1) and the E280 contact maps (Table S1). On the other hand, the coordination spheres of the metal ions in the holo form (ZnA and ZnB in Fig. 2B) and the 2Zn form (ZnA in Fig. 2C) are much less changed by the absence of a zinc atom in 2Zn (Table S1). In general, the B-factor values (Fig. S1) shows that the 2Zn form has a higher conformational flexibility than the holo form.

Topologically interlinked protein chains are extremely rare among natural proteins, and differ from domain-swapped dimers [15–19] and knotted proteins [20–23]. Two notable examples are the *Pyrobaculum aerophilum* citrate synthase and the *Pichia pastoris* lysyl oxidase, where two cyclized chains are linked together [24,25]. There are also other examples where the interlinkage between protein chains is produced by a chemical modification over the native form [23,26–31]. Understanding the mechanisms as to how interlinked proteins entangle and fold is an important challenge. In addition, it could prove beneficial in engineering stable proteins and enzymes for therapeutic and industrial applications. In this con-

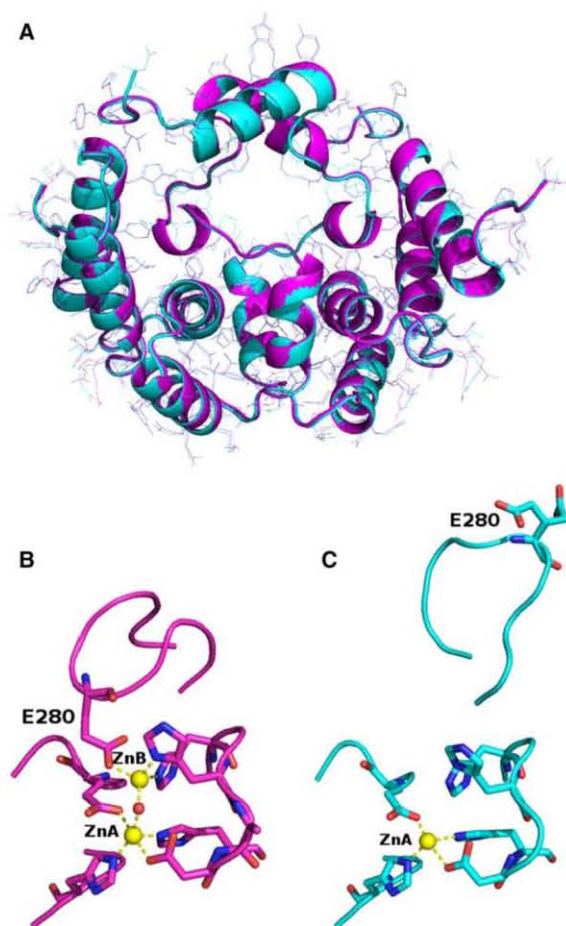


Fig. 2. (A) Superposition of the dimerization domain of PaSdsA1 for the holo (in magenta, PDB 2CFU) and for the 2Zn (in cyan, PDB 2CG3) forms. Catalytic site for the holo (B) and 2Zn (C) forms. The zinc atoms (ZnA and ZnB) are shown as yellow spheres. The red sphere between the two zinc atoms in the holo form is a water molecule bridging the two metal ions. The loop containing the amino acid E280, that coordinates a zinc atom in the holo form, is greatly displaced in the 2Zn form.

text, in this work the unfolding pathways of PaSdsA1 have been examined with chemical and thermal denaturation experiments, using spectroscopic and calorimetric techniques.

Materials and methods

Materials

All chemicals were reagent grade and purchased from either Sigma-Aldrich or Nacalai Tesque (Kyoto, Japan). They were used without further purification. Water was purified to a resistivity of $18 \text{ M}\Omega\text{-cm}^{-1}$ using a Millipore Gradient deionizing system.

Protein preparation and purification

The *pasdsA1::tev::his6* construction in vector pUC17 was purchased from GenScript (USA), where *tev* denotes the cleavage recognition sequence of TEV protease. This construction was cloned into the expression vector pET41 a(+) (Novagen, Cambridge, MA, USA) by using the restriction enzymes *NdeI* and *Bg/II*. PaSdsA1-TEV-His6 fusion protein was expressed in *E. coli* BL21 (Novagen), grown in LB medium supplemented with $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ kanamycin. Cells were grown to an $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ value of 0.75 at 37°C and protein expression was induced by adding 0.5 mM IPTG and incubated overnight at 20°C . Cells were centrifuged, re-suspended and lysed by sonication. Purification was achieved using Ni-NTA affinity (GE Healthcare) and molecular exclusion (Superdex 200 26/600; GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA) columns. In order to avoid interferences due to the HisTag, TEV Protease (TurboTEV, 10 000 units, used without further purification) was added to protein solution and the mixture was incubated overnight at 30°C . Then, the sample was purified again using Ni-NTA chromatography collecting the fractions not retained by the column (Fig. S2). Protein concentration was determined by UV-Vis absorption (CARY-50; Varian, Mulgrave, Vic., Australia) at 280 nm (extinction coefficient $92\,250 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ from BRENDA Database [32]). The yield was 100 mg per liter of culture. Protein was concentrated to $15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and stored in 20 mM Tris pH 8.0 at 4°C .

When the dimeric protein was heated to 90°C in the presence of 1.5 mM SDS (and immediately cooled down to room temperature), it was possible to separate monomers from remaining dimers and amorphous aggregates using molecular exclusion chromatography. Monomeric fractions, containing 1.5 mM SDS, were stored at 4°C in 20 mM Tris.

All protein samples were examined by Native-PAGE, SDS/PAGE, Mild-SDS and Urea-PAGE electrophoresis. Native- and SDS/PAGE were performed as described in the literature [33,34]. Mild-SDS electrophoresis was used to be able to distinguish between monomeric and dimeric bands without having interferences due to the presence of aggregates. To this end, the SDS/PAGE protocol was followed except that samples were not boiled and both running and loading buffers did not contain SDS or DTT. In the Urea-PAGE electrophoresis the running buffer, the gel and the protein sample contained urea at the same concentration (without SDS). This electrophoresis was used to avoid diluting the urea concentration in the protein sample when it is charged in the gel.

Circular dichroism measurements

Circular Dichroism (CD) measurements were performed using a Jasco J820 Spectropolarimeter (Tokyo, Japan) at 20°C . For far-CD experiments, the employed protein con-

centration was $0.219 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in 20 mM HEPES buffer pH 8.0, without and with urea at various concentrations. HEPES instead of Tris was used for these measurements to have a better signal to noise ratio. For near-CD assays, the protein concentration was $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Quartz cuvettes of 1-mm and 1-cm path lengths were used for far and near-CD spectra respectively. The spectra are reported as molar ellipticity ($[\theta]$, $\text{deg cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) after subtracting baseline.

Differential scanning calorimetry measurements

Differential Scanning Calorimetry (DSC) measurements were developed using a VP-DSC capillary (GE Healthcare) and a VP-DSC (Microcal, Northampton, MA, USA) calorimeters. Protein solutions were prepared by exhaustive dialysis against 20 mM Tris at pH 8.0. The employed protein concentration was $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Several scan rates were used, within the $0.5\text{--}3.5 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ range. Data were fitted to the two-state irreversible model previously described [35–37].

Isothermal titration calorimetry measurements

Isothermal Titration Calorimetry (ITC) measurements were performed using a VP-ITC microcalorimeter (Microcal) at $20 \text{ }^\circ\text{C}$. The ITC equipment was used in order to assess PaSdsA1 enzyme activity, following a methodology previously described [38].

Quantification of zinc content (PAR method)

The Zn content was measured employing a colorimetric metal ion assay [39,40]. In this method, 4-(2-pyridylazo)-resorcinol (PAR) is used to coordinate the free metal ions, that is, those in the solvent media, and its absorption followed with a UV-Vis spectrophotometer (CARY-50, Varian). We used quartz cuvettes of 1-cm path length. The standard curves (the buffer was 20 mM Tris at pH 8.0) were determined in the $0\text{--}10 \text{ } \mu\text{M}$ Zn^{2+} concentration range using (a) buffer, (b) buffer containing 1.5 mM SDS and (c) buffer containing 8 M urea. Instead of denaturing the protein samples with guanidine-HCl to liberate the Zn atoms, we heated to $85 \text{ }^\circ\text{C}$ (case (a)) or to $93 \text{ }^\circ\text{C}$ (case (b)). For case (c) the incubation time was 5 days. In all cases, samples were centrifuged and their absorption measured at 500 nm. It is important to emphasize that this method measures the amount of metal released to the media by a protein when subject to denaturation that, in the present case, was achieved heating or incubating in urea. The application of this method requires that all the employed plastic ware is free of metal traces. For this, the recommended procedure is as follows: wash with 0.5 M HCl, incubate in 4 mM

EDTA for 2 days, rinse exhaustively with deionized water and dry carefully.

Results and Discussion

Thermal unfolding

The DSC trace of PaSdsA1 displayed three transitions as shown in Fig. 3A. In order to find out the species responsible for each of these three peaks, and inspired in some reported methodologies to eliminate metal atoms from metalloenzymes [41,42], the following approach was developed here: (a) when a native protein sample was preheated to $70 \text{ }^\circ\text{C}$ and cooled down to room temperature, aggregates were visible. After centrifugation and filtration (using a $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ membrane) the DSC trace only showed the high temperature peak (Fig. 3B); (b) when another sample was incubated at room temperature for 24 h in the presence of 75 mM EDTA, heated to $50 \text{ }^\circ\text{C}$, centrifuged and filtered, only the middle temperature transition was visible (Fig. 3C); (c) finally, when a native sample was treated with 200 mM EDTA for 48 h and in the presence of Chelex resin (approximately 1 g per 100 mg of enzyme), centrifuged and filtered, the DSC trace only displayed the low temperature transition (Fig. 3D). The proteins producing all the transitions in Fig. 3 are dimers (Fig. S3), whose concentration was determined as indicated in Materials and methods section.

Using the PAR spectroscopic method [39,40], the number of zinc atoms per dimer was determined for each of the three samples that produced the transitions in Fig. 3B,C,D. The results in Fig. 4A showed that each transition corresponds to proteins containing different number of zinc atoms per dimer: four (holo form), two (2Zn) and none (apo form). It appears that in the native PaSdsA1 three forms coexist in chemical equilibrium,¹ each with a different number of zinc atoms. The coexistence of these species is not a consequence of the *E. coli* post-translational machinery (see below). Analysing the CD spectra, we found that the secondary structures of these three forms are almost identical (Fig. 4B). The near-CD spectra (inset Fig. 4B) show a noticeable change in intensity as well as the wavelength of maximal signal, indicating that their tertiary structures are different to some extent. Clearly, the zinc atoms play a crucial role in the thermal stability of these proteins. There are large differences between their T_m values (at a scan rate of $1.5 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$): 74.5, 61.1 and $44 \text{ }^\circ\text{C}$ for the holo, 2Zn

¹This has been confirmed by isothermal titration calorimetry (ITC) measurements at 293 K in our laboratory, providing the equilibrium constants linking the three forms. Unpublished results.

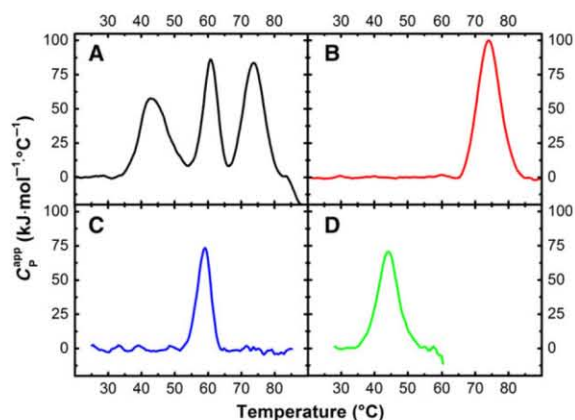


Fig. 3. Thermal-induced unfolding of PaSdsA1. (A) Native dimer, (B) the holo form (four zinc atoms), (C) the 2Zn form (two zinc atoms in the dimer) and (D) the apo form (no zinc atoms). The procedures to obtain samples in B, C and D are described in the text. The scan rate was $1.5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

and apo forms respectively. A similar situation was found for AE036 metallo- β -lactamase of *Aeromonas hydrophila* [43]. The difference in T_m values for the holo and 2Zn forms (13 degrees) cannot be attributed to changes in secondary structure which is not affected by the loop displacement observed in the 2Zn form (Fig. 2B,C). Instead, the decrease in T_m can be ascribed to the modification of the coordination sphere of the metal ions which is accompanied by a large loop displacement and, in general, to the higher conformational flexibility of the whole protein structure indicated by the B-factor values (Fig. S1).

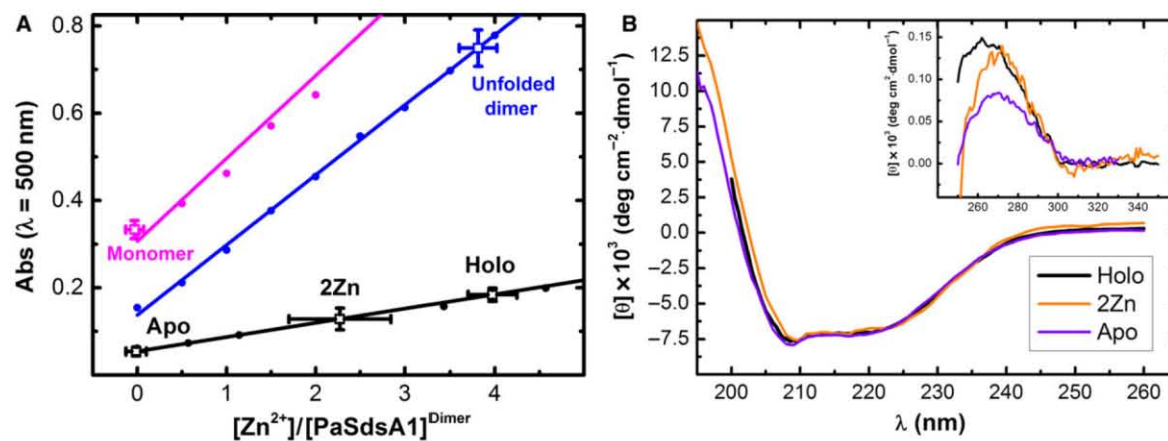


Fig. 4. Metal quantification and CD Spectra of the three forms of PaSdsA1. (A) Quantification of Zn^{2+} content using the PAR method. This method determines the amount of metal released to the media by a protein when subject to denaturation and was used for (1) each of the three forms of PaSdsA1, (2) the unfolded dimer and (3) the folded monomer. The media were: 20 mM Tris pH 8 with the standard curve in black for (1); 8 M urea, 20 mM Tris pH 8 with the standard curve in blue for (2); 1.5 mM SDS, 20 mM Tris pH 8 with the standard curve in magenta for (3). Protein denaturation was achieved heating to $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ for (1) and to $93\text{ }^{\circ}\text{C}$ for (3). (B) Far-CD spectra for the holo, 2Zn and apo forms of PaSdsA1. The inset shows the near-CD spectra for the same samples.

The thermal unfolding of the holo, 2Zn and apo forms was studied using DSC at several scan rates. Fig. 5 shows that the calorimetric traces were scan rate dependent, implying that the unfolding process is kinetically controlled [35]. In all cases, reheating scans did not show any transition. Hence, the thermal unfolding of the three forms present in native PaSdsA1 are irreversible. Furthermore, visual examination of the samples showed aggregation. The calorimetric traces in Fig. 5 were fitted to the two-state irreversible model as described previously [35–37]. In this model, the native state converts to a final state (unable to fold back to the native protein) following a first order process characterized by a rate constant k and an activation energy E_{act} obtained from a $\ln k$ vs. $1/T$ Arrhenius plot (Fig. S4). This activation energy corresponds to the barrier between the native state and the transition state. For globular proteins, the values for E_{act} range between 100 and $800\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ [35]. The E_{act} values obtained for the three PaSdsA1 forms are close: 370.3 ± 5.7 , 415.5 ± 40.6 and $371.4 \pm 6.6\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ for the holo, 2Zn and apo forms respectively. Thus, the zinc content is not a determinant of the kinetic stability of these PaSdsA1 forms, and their transition states seem to be structurally and energetically similar.

Chemically induced unfolding

PaSdsA1 samples in its holo form, prepared as described above, were incubated at several concentrations in the 0–8 M urea range for different periods of

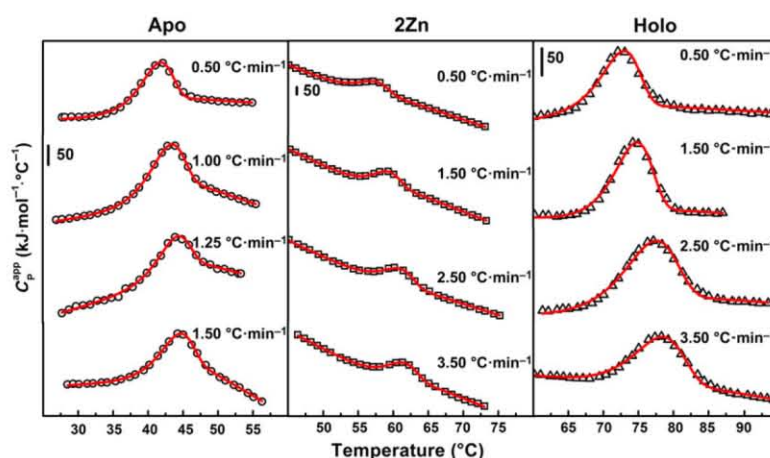


Fig. 5. Experimental DSC thermograms for the apo, 2Zn and holo forms of PaSdsA1. Symbols represent experimental apparent heat capacity data, and continuous lines are the best fits of the two-state irreversible model [35–37]. Note that, for clarity, the profiles have been shifted in the y-axis.

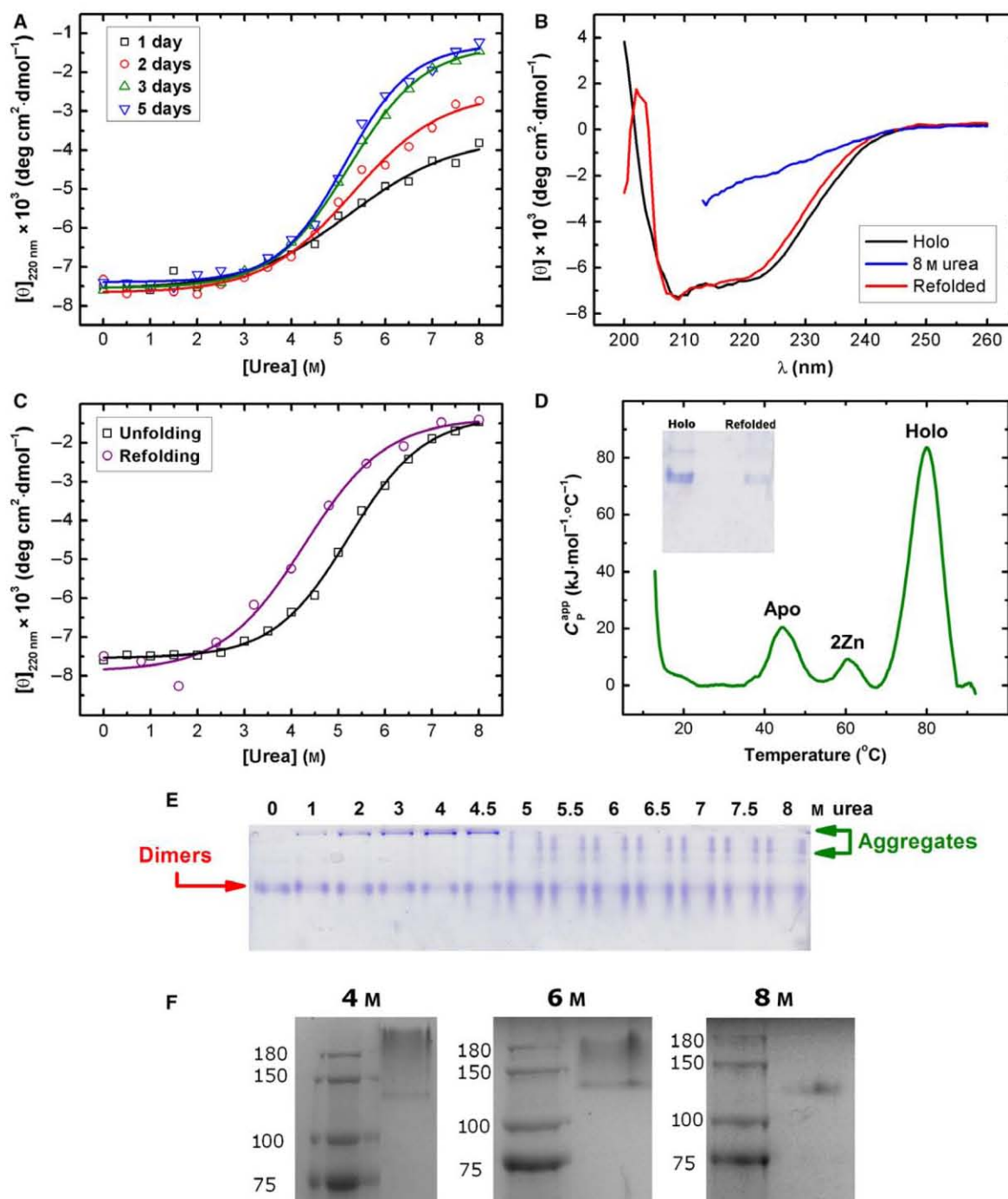
time. The unfolding patterns followed by CD spectroscopy at 220 nm are displayed in Fig. 6A, showing that equilibrium is reached after 3 days of incubation. Figure 6B shows the CD spectra for the native protein, for a 5-day-incubated sample with 8 M urea and for the later when the denaturant had been removed. The results indicate the unfolding process is reversible. The CD spectra were also recorded at other urea concentrations (Fig. 6C). The unfolding and refolding curves do not overlay because in these experiments the system was not allowed to reach equilibrium, that is, samples of the protein at 8 M (incubated in this condition for 5 days) were diluted to different urea concentrations and measured immediately (in only a few minutes).

The nature of the unfolded protein was revealed by Native-PAGE electrophoresis in Fig. 6E, where it is seen that at high urea concentrations the dimeric species continue to be present. This is not an effect of the dilution of the sample in the native-page gel since when the running buffer contained the same amount of urea as the sample (Urea-PAGE, see Protein preparation and purification), the dimeric band is present and the monomeric band is absent (Fig. 6F). Moreover, using the PAR method, it was determined that the dimer in 8 M urea do not retain any zinc ions (Fig. 4A). Hence, the results in Fig. 6 strongly suggest that the entanglement of the chains in the dimerization domain is preserved and this allows the chemically induced unfolding process to be reversible. After refolding the sample previously unfolded in 8 M urea, the original holo, 2Zn and apo forms were produced as shown by the DSC trace in Fig. 6D. This occurs in the absence of any chaperonins and clearly confirms the presence of the three native state forms of the protein is not the result of the *E. coli* overexpression system. Furthermore, it appears that the affinity of PaSdsA1 for Zn atoms is high enough for

the unfolded dimer with entangled chains to be able to recruit Zn from the media during the refolding process. This Zn uptake was also previously observed for AE036 metallo- β -lactamase of *Aeromonas hydrophila* [43].

Dissociation of dimers and monomer stabilization

In order to evaluate if the monomer chains can untangle without producing aggregation, holo PaSdsA1 samples in the presence of 1.5 mM of SDS (the concentration used in standard SDS/PAGE gels) were heated to different temperatures, immediately cooled to room temperature and analysed using a Mild-SDS electrophoresis (see Protein preparation and purification) with a gel SDS concentration of 1.5 mM. The resulting gel is shown in Fig. 7A where it can be observed that for preheating temperatures up to 80 °C the protein remained as a dimer, while for 90 °C and 100 °C monomeric species appear. When the sample preheated to 90 °C was subject to a molecular exclusion chromatography (Fig. 7B), two main peaks were found. The nature of the proteins producing these peaks was verified using Mild-SDS electrophoresis (Fig. 7C), which indicated that the low exclusion volume peak is a dimer and the high volume peak is a monomer. When the SDS was eliminated via Native-PAGE electrophoresis (Fig. 7D), the monomers were seen to aggregate while dimers remained as such (first lane). However, these dimers in the presence of SDS were also thermally stabilized as shown by its T_m value increasing by eighteen degrees respect to the sample without the surfactant (Fig. 8A). For this reason, in Fig. 7A dimers were seen to dissociate above 74.5 °C, that is, above its T_m without SDS, as in the absence of SDS the unfolding of the dimers was an irreversible



process. It is worth mentioning that the employed SDS concentration in the experiments in Fig. 7 (a) was below the critical micelle concentration (2.75 mM) in the working buffer (Fig. S5) and (b) inhibited the enzyme activity (hydrolysis of SDS) as shown by ITC

experiments (Fig. 8B). Hence, stabilization of the monomers by SDS was neither produced by the presence of surfactant micelles or by 1-dodecanol. It appears that PaSdsA1 monomers are stabilized by SDS at a concentration of 1.5 mM, while dimers are

Fig. 6. Chemically induced unfolding of the holo form of PaSdsA1. The sample was prepared as described in the Thermal unfolding section. (A) Effect of incubation time on denaturation followed by CD Spectroscopy. After 3 days of incubation, the equilibrium has been reached. From the equilibrium CD data (5 days incubation), the change in Gibbs free energy for the unfolding of the holo PaSdsA1 dimer to the unfolded dimer (D*), $\Delta G_{D-D^*}^{H_2O}$, is estimated to be $17.45 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ with a m value of $3.31 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ (B) CD spectra for the native protein, for a 5-day-incubated sample with 8 M urea and for the later when the denaturant had been removed (final urea concentration was approximately 0.5 M). (C) The molar ellipticities at 220 nm for the unfolding and refolding processes at several urea concentrations are shown; for unfolding, samples were incubated 5 days while refolding was assayed without any incubation time, diluting protein samples from 8 M urea to the final urea concentrations shown in the figure. (D) DSC trace of the refolded PaSdsA1 protein from the denatured state at 8 M urea. The inset is a Native-PAGE gel of the holo PaSdsA1 dimer and of the refolded protein after removal of urea. (E) Native-PAGE electrophoresis in the presence of the indicated urea concentrations, for samples incubated for 5 days. At 1 M urea a small amount of aggregates is visible; however, as urea concentration increases, these aggregates appear to solubilize. (F) Urea-Page electrophoresis (see Protein preparation and purification) for holo PaSdsA1 samples incubated for 5 days at 4, 6 and 8 M urea. The running buffer and the gel contained the same amounts of urea. At each urea concentration, the left lane is a molecular weight marker and the right lane is the protein sample. At the three urea concentrations, a band corresponding to the dimer (molecular weight of 146.7 kDa) is visible, while no band appears for the monomer (molecular weight of 73.4 kDa).

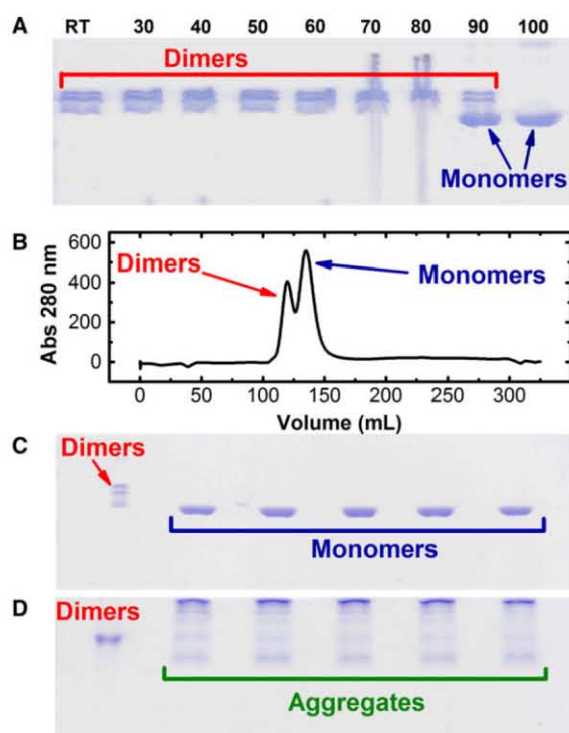


Fig. 7. Dissociation of dimers and monomer stabilization by SDS. (A) Mild-SDS gel of holo PaSdsA1 samples that were preheated at the indicated temperatures from room temperature (RT) to 100 °C, in the working buffer with 1.5 mM SDS. (B) Molecular exclusion chromatography of the sample preheated at 90 °C. The elution buffer contained 1.5 mM SDS. (C) Mild-SDS gel of the samples eluted from the molecular exclusion column: one fraction from the low exclusion volume peak and five fractions of the high volume elution peak. (D) Native-PAGE gel of the same samples described in (C). Working buffer was 20 mM Tris at pH 8. The holo form was prepared as described in the Thermal unfolding section.

stable with and without SDS. Protein stabilization by SDS has been previously observed for membrane and globular proteins [44,45]. The results in Fig. 7 indicate that thermal unfolding favoured dimer dissociation, untangling the topologically interlinked chains in the dimerization domain and producing monomers that are stabilized by the SDS molecules.

Structural features and thermal unfolding of monomers

The structural features of PaSdsA1 monomers were investigated by CD spectroscopy in the presence of 1.5 mM SDS. In Fig. 9A, far- and near-CD spectra are shown. The secondary structure of the monomers is slightly different from that of the holo dimeric protein, particularly around 210 nm. On the other hand, the near-CD spectrum indicated a less structured protein. Moreover, using the PAR method with 1.5 mM SDS it was found that the folded monomers are devoid of zinc ions (Fig. 4A). In summary, compared to the dimeric form the monomeric PaSdsA1 appears to be structurally weaker but retaining some elements of the secondary structure.

The DSC profile of the PaSdsA1 monomer in the presence of 1.5 mM of SDS is shown in Fig. 9B. It has a T_m value of 89.3 °C, only three degrees below that for the dimeric form (Fig. 8A), indicating a quite thermally stable protein. When the sample was subject to a several rescans (Fig. 9B), it appeared that the thermal unfolding is reversible (ratios of the peaks areas indicate 90% refolding). Thus, the folding of the denatured monomers does not produce entangled dimers. Using an excess of zinc (100 equivalents), it was determined by DSC (no transition observed between 20 and 110 °C) and Mild-SDS electrophoresis (only mono-

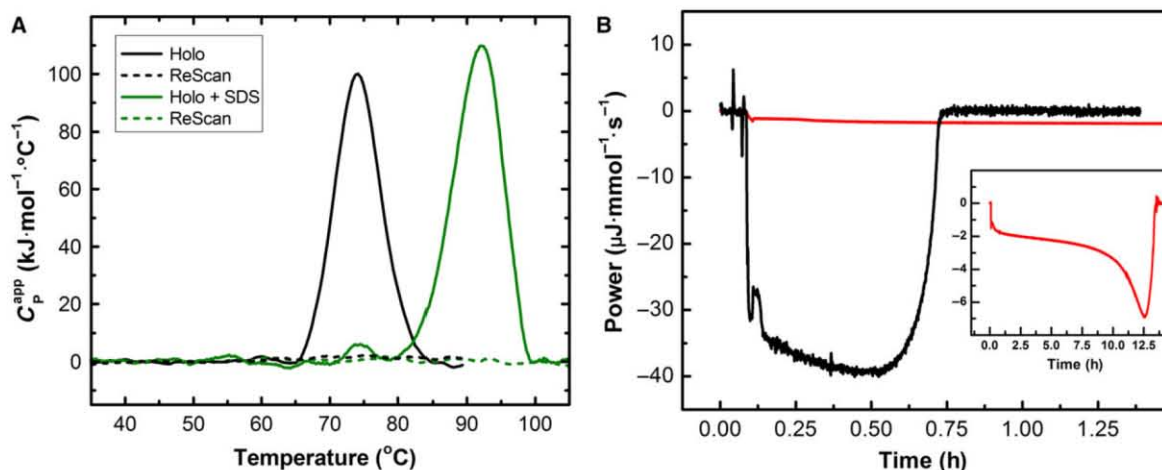


Fig. 8. Effect of SDS over the DSC calorimetric profile and the enzymatic activity of holo PaSdsA. (A) DSC first scans are shown in the absence of SDS and in the presence of 1.5 mM of SDS. Second, reheating scans show no transitions implying that in both cases the unfolding process is irreversible. The scan rate was $1.5\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$. The complete thermogram of the sample with SDS displays a peak at low temperatures, associated with the Krafft temperature of SDS [48–50] in that particular media (Fig. S6). The holo form was prepared as described in the Thermal unfolding section. (B) Enzymatic activity of holo PaSdsA1 followed by Isothermal Titration Calorimetry (ITC) at 20 °C . From these raw data of thermal power as a function of time, reaction rates vs. substrate concentration plots can be obtained, and with a nonlinear fit to the Michaelis–Menten equation, the steady-state parameters (k_{cat} and K_M) can be evaluated as described in [38]. The trace in black corresponds to an ITC experiment where the PaSdsA1 was placed in the calorimeter cell at 50 nM and the substrate (SDS) in the calorimetric syringe at a 3.5 mM concentration. A single injection of $40\text{ }\mu\text{L}$ was performed. The final SDS concentration in the cell was $100\text{ }\mu\text{M}$. Under these conditions, the reaction to produce 1-dodecanol reached completion in 45 min. The trace in red (inset) corresponds to an ITC experiment where SDS at 1.5 mM was placed in the calorimeter cell and the calorimetric syringe was filled with PaSdsA1 at $1.75\text{ }\mu\text{M}$. A single injection of $40\text{ }\mu\text{L}$ was performed. The final PaSdsA1 concentration in the cell was 50 nM . The trace indicates that SDS at 1.5 mM inhibits the enzyme activity for at least 1 h, the reaction reaching completion only after 14 h.

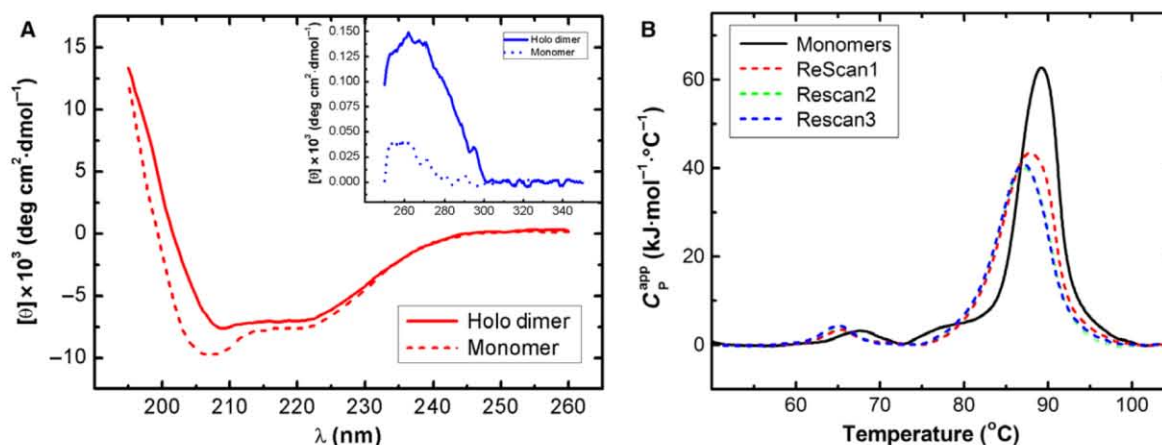


Fig. 9. Structural characterization and thermal denaturation of monomeric PaSdsA1. (A) Far-CD spectra for a PaSdsA1 monomers sample (eluted from the molecular exclusion column (Fig. 7B)) and for the holo dimers. The inset shows the near-CD spectra for the same samples. (B) DSC profile for PaSdsA1 monomers sample (eluted from the molecular exclusion column (Fig. 7B)), showing also three rescans. The scan rate was $1.5\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$. The complete thermogram displays a peak at low temperatures, associated with the Krafft temperature of SDS in that particular media (Fig. S6). The holo form was prepared as described in the Thermal unfolding section.

meric band present) that the unfolded monomers do not refold into the dimeric form. It is difficult to assess if the role of the SDS molecules goes beyond the mere

stabilization of the folded and unfolded monomers, facilitating somehow the reversibility process. It does not appear possible to form dimers from unfolded

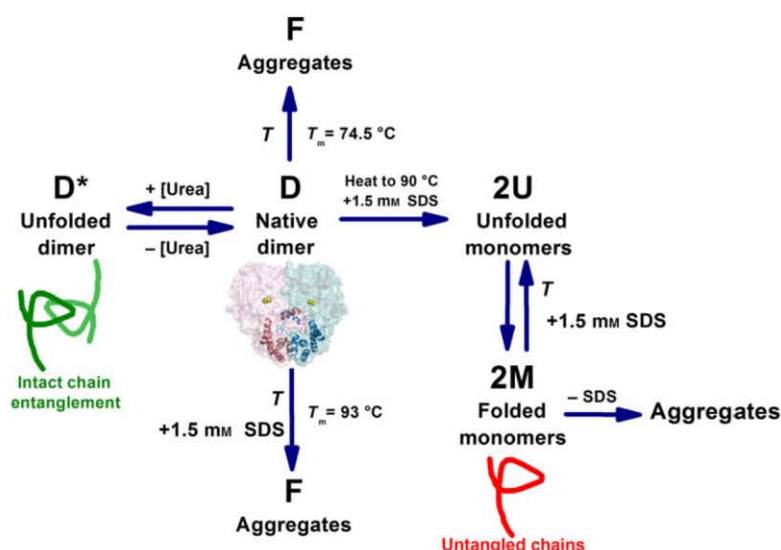


Fig. 10. Thermal and chemical unfolding pathways of the holo form of the PaSdsA1 dimers.

monomers, indicating that the chain entanglement is not a spontaneous process but instead requires external aid [21,46,47].

Conclusions

Understanding the impact of chain entanglement over unfolding pathways of topologically interlinked proteins is an interesting challenge. A good candidate to perform such studies is the large homo-dimeric metalloenzyme PaSdsA1 sulfatase, where the monomer chains are deeply entangled. In the native state three forms coexist in chemical equilibrium, each with a different number of zinc atoms in the catalytic site, and this is not the result of the post-translational machinery of the expression system. The zinc atoms strongly influence the thermal stability of these three proteins, their secondary structures being almost identical. These three forms can be isolated to be studied independently. The thermal and chemical unfolding pathways of the holo form of PaSdsA1 are summarized in Fig. 10.

The main conclusions emerging from the pathways shown in Fig. 10 are: (a) the thermal unfolding of the holo form is irreversible and kinetically controlled, the final state being protein aggregates; (b) the chemical denaturation with urea is reversible implying that the entanglement of the chains in the dimerization domain is preserved in the unfolded state, and allowing the process to be reversible; (c) the affinity of the protein for Zn ions is high enough for the chemically unfolded dimer with entangled chains to be able to recruit Zn from the media during the refolding process, producing the three forms; (d) in the presence of SDS, the thermal

unfolding favours dimer dissociation, untangling the interlinked chains and producing monomers that are stabilized by the SDS molecules; (e) the thermal unfolding of the SDS stabilized monomers is reversible but does not produce dimers, even with an excess of zinc ions, implying that chain entanglement is not a spontaneous process but instead requires external aid.

The pivot factor that correlates the above summarized findings is the stability of the entanglement between the monomer chains in the dimerization domain of the holo form. Upon heating, the noncovalent interactions that maintain this entanglement stable are severely disturbed, ultimately producing temperature irreversible protein aggregates. When urea is used as a denaturant agent, the results indicate that some of the key amino acid/amino acid and amino acid/solvent interactions that maintain the entanglement stability must be preserved, or at least not greatly perturbed. In fact, this entanglement can be thought as a ‘folding seed’ around which both denatured, but entangled monomers, are able to refold upon urea removal, recruiting zinc atoms from the media and producing the dimer. As the unfolded monomers are unable to refold into dimers even in the presence of an excess of zinc ions, preserving the entanglement identity is crucial for the refolding process.

Acknowledgements

We are grateful to Georgina Garza-Ramos and Daniel Alejandro Fernández-Velasco from Facultad de Medicina, and Luis F. Olguin from Facultad de Química, UNAM, for their useful and valuable comments to the manuscript. We also thank Adela Rodríguez-Romero

from Instituto de Química, UNAM, and Sergio Enriquez-Flores from Instituto Nacional de Pediatría, for their help in analysing the information in the pdb files for the holo and 2Zn forms. We thank Alma Jessica Díaz Salazar (Facultad de Química, UNAM) and Masatomo So and Young-Ho Lee (Institute for Protein Research, Osaka University) for their competent technical assistance. C.A. thanks CONACyT-Mexico (doctoral fellowship 235245), Posgrado en Ciencias Químicas (UNAM), Coordinación de Estudios de Posgrado (UNAM), FrontierLab@OsakaU Program (Osaka University) and the International Collaborative Research Program of Institute for Protein Research, Osaka University, for financial support. This work was supported by DGAPA-UNAM (PAPIIT grant number IN112813).

Author contributions

CA, YG and MC conceived the work. CA performed the experiments. CA, YG and MC discussed the results, interpreted the data and cowrote the paper.

References

- Breidenstein EBM, de la Fuente-Núñez C and Hancock REW (2011) *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol* **19**, 419–426.
- Asboe D, Gant V, Aucken HM, Moore DA, Umasankar S, Bingham JS, Kaufmann ME and Pitt TL (1998) Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* strains in respiratory infection in AIDS patients. *AIDS* **12**, 1771–1775.
- Branski LK, Al-Mousawi A, Rivero H, Jeschke MG, Sanford AP and Herndon DN (2009) Emerging infections in burns. *Surg Infect (Larchmt)* **10**, 389–397.
- Højby N (2011) Recent advances in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *BMC Med* **9**, 32.
- Hales SG, Dodgson KS, White GF, Jones N and Watson GK (1982) Initial stages in the biodegradation of the surfactant sodium dodecyltriethoxy sulfate by *Pseudomonas* sp. strain DES1. *Appl Environ Microbiol* **44**, 790–800.
- Klebensberger J, Lautenschlager K, Bressler D, Wingender J and Philipp B (2007) Detergent-induced cell aggregation in subpopulations of *Pseudomonas aeruginosa* as a preadaptive survival strategy. *Environ Microbiol* **9**, 2247–2259.
- Davison J, Brunel F, Phanopoulos A, Prozzi D and Terpstra P (1992) Cloning and sequencing of *Pseudomonas* genes determining sodium dodecyl sulfate biodegradation. *Gene* **114**, 19–24.
- Hagelueken G, Adams TM, Wiehlmann L, Widow U, Kolmar H, Tümmeler B, Heinz DW and Schubert W-D (2006) The crystal structure of SdsA1, an alkylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa*, defines a third class of sulfatases. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 7631–7636.
- Long M, Ruan L, Li F, Yu Z and Xu X (2011) Heterologous expression and characterization of a recombinant thermostable alkylsulfatase (sdsAP). *Extremophiles* **15**, 293–301.
- Kertesz MA (2000) Riding the sulfur cycle - Metabolism of sulfonates and sulfate esters in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 135–175.
- Knaus T, Schober M, Kepplinger B, Faccinelli M, Pitzer J, Faber K, Macheroux P and Wagner U (2012) Structure and mechanism of an inverting alkylsulfatase from *Pseudomonas* sp. DSM6611 specific for secondary alkyl sulfates. *FEBS J* **279**, 4374–4384.
- Bebrone C (2007) Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem Pharmacol* **74**, 1686–1701.
- Daiyasu H, Osaka K, Ishino Y and Toh H (2001) Expansion of the zinc metallo-hydrolase family of the β -lactamase fold. *FEBS Lett* **503**, 1–6.
- González JM, Medrano Martín FJ, Costello AL, Tierney DL and Vila AJ (2007) The Zn²⁺ position in metallo- β -lactamases is critical for activity: a study on chimeric metal sites on a conserved protein scaffold. *J Mol Biol* **373**, 1141–1156.
- Bennett MJ, Choe S and Eisenberg D (1994) Domain swapping: entangling alliances between proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 3127–3131.
- Bennett MJ, Schlunegger MP and Eisenberg D (1995) 3D domain swapping: a mechanism for oligomer assembly. *Protein Sci* **4**, 2455–2468.
- Schlunegger MP, Bennett MJ and Eisenberg D (1997) Oligomer formation by 3D domain swapping: a model for protein assembly and misassembly. In *Advances in Protein Chemistry* 50 Richards FM, Eisenberg DS and Kim PS, eds, pp. 61–122. Academic Press, San Diego.
- Jaskolski M (2001) 3D domain swapping, protein oligomerization, and amyloid formation. *Acta Biochim Pol* **48**, 807–827.
- Rousseau F, Schymkowitz J and Itzhaki L (2012) Implications of 3D domain swapping for protein folding, misfolding and function. In *Protein Dimerization and Oligomerization in Biology* SE – 9 (Matthews J, ed), pp. 137–152. Springer, New York.
- Mallam AL and Jackson SE (2005) Folding studies on a knotted protein. *J Mol Biol* **346**, 1409–1421.
- Mallam AL (2009) How does a knotted protein fold? *FEBS J* **276**, 365–375.
- Mallam AL, Rogers JM and Jackson SE (2010) Experimental detection of knotted conformations in

- denatured proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 8189–8194.
- 23 Virnau P, Mallam A and Jackson S (2011) Structures and folding pathways of topologically knotted proteins. *J Phys Condens Matter* **23**, 033101.
- 24 Boutz DR, Cascio D, Whitelegge J, Perry LJ and Yeates TO (2007) Discovery of a thermophilic protein complex stabilized by topologically interlinked chains. *J Mol Biol* **368**, 1332–1344.
- 25 Duff AP, Cohen AE, Ellis PJ, Kuchar JA, Langley DB, Shepard EM, Dooley DM, Freeman HC and Guss JM (2003) The crystal structure of *Pichia pastoris* lysyl oxidase. *Biochemistry* **42**, 15148–15157.
- 26 Yeates TO, Norcross TS and King NP (2007) Knotted and topologically complex proteins as models for studying folding and stability. *Curr Opin Chem Biol* **11**, 595–603.
- 27 Zhou HX (2003) Effect of catenation on protein folding stability. *J Am Chem Soc* **125**, 9280–9281.
- 28 Cao Z, Roszak AW, Gourlay LJ, Lindsay JG and Isaacs NW (2005) Bovine mitochondrial peroxiredoxin III forms a two-ring catenane. *Structure* **13**, 1661–1664.
- 29 Helgstrand C, Wikoff WR, Duda RL, Hendrix RW, Johnson JE and Liljas L (2003) The refined structure of a protein catenane: the HK97 bacteriophage capsid at 3.44 Å resolution. *J Mol Biol* **334**, 885–899.
- 30 Blankenship JW and Dawson PE (2003) Thermodynamics of a designed protein catenane. *J Mol Biol* **327**, 537–548.
- 31 Yan LZ and Dawson PE (2001) Design and synthesis of a protein catenane. *Angew Chem Int Ed Engl* **40**, 3625–3627.
- 32 Scheer M, Grote A, Chang A, Schomburg I, Munaretto C, Rother M, Sohngen C, Stelzer M, Thiele J and Schomburg D (2011) BRENDA, the enzyme information system in 2011. *Nucleic Acids Res* **39**, D670–D676.
- 33 Elsasser S, Schmidt M and Finley D (2005) Characterization of the proteasome using native gel electrophoresis. *Methods Enzymol* **398**, 353–363.
- 34 Brunelle JL and Green R (2014) One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE). *Methods Enzymol* **541**, 151–159.
- 35 Costas M, Rodríguez-Larrea D, De Maria L, Borchert TV, Gómez-Puyou A and Sanchez-Ruiz JM (2009) Between-species variation in the kinetic stability of TIM proteins linked to solvation-barrier free energies. *J Mol Biol* **385**, 924–937.
- 36 Rodríguez-Larrea D, Minning S, Borchert TV and Sanchez-Ruiz JM (2006) Role of solvation barriers in protein kinetic stability. *J Mol Biol* **360**, 715–724.
- 37 Aguirre Y, Cabrera N, Aguirre B, Pérez-Montfort R, Hernandez-Santoyo A, Reyes-Vivas H, Enríquez-Flores S, de Gómez-Puyou MT, Gómez-Puyou A, Sanchez-Ruiz JM *et al.* (2014) Different contribution of conserved amino acids to the global properties of triosephosphate isomerases. *Proteins* **82**, 323–335.
- 38 Aguirre C, Condado-Morales I, Olguin LF and Costas M (2015) Isothermal titration calorimetry determination of individual rate constants of trypsin catalytic activity. *Anal Biochem* **479**, 18–27.
- 39 Hunt JB, Neece SH and Ginsburg A (1985) The use of 4-(2-pyridylazo)resorcinol in studies of zinc release from *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase. *Anal Biochem* **146**, 150–157.
- 40 McCall KA and Fierke CA (2000) Colorimetric and fluorimetric assays to quantitate micromolar concentrations of transition metals. *Anal Biochem* **284**, 307–315.
- 41 De Seny D, Heinz U, Wommer S, Kiefer M, Meyer-Klaucke W, Galleni M, Frère JM, Bauer R and Adolph HW (2001) Metal ion binding and coordination geometry for wild type and mutants of metallo- β -lactamase from *Bacillus cereus* 569/H/9 (BcII): a combined thermodynamic, kinetic, and spectroscopic approach. *J Biol Chem* **276**, 45065–45078.
- 42 DiTusa CA, McCall KA, Christensen T, Mahapatro M, Fierke CA and Toone EJ (2001) Thermodynamics of metal ion binding. 2. Metal ion binding by carbonic anhydrase variants. *Biochemistry* **40**, 5345–5351.
- 43 Hernandez Valladares M, Felici A, Weber G, Adolph HW, Zeppezauer M, Rossolini GM, Amicosante G, Frère JM and Galleni M (1997) Zn(II) dependence of the *Aeromonas hydrophila* AE036 metallo-beta-lactamase activity and stability. *Biochemistry* **36**, 11534–11541.
- 44 Deep S and Ahluwalia JC (2001) Interaction of bovine serum albumin with anionic surfactants. *Phys Chem Chem Phys* **3**, 4583–4591.
- 45 Xu Q and Keiderling TA (2004) Effect of sodium dodecyl sulfate on folding and thermal stability of acid-denatured cytochrome c: a spectroscopic approach. *Protein Sci* **13**, 2949–2959.
- 46 Lim NCH and Jackson SE (2015) Mechanistic insights into the folding of knotted proteins in vitro and in vivo. *J Mol Biol* **427**, 248–258.
- 47 Mallam AL and Jackson SE (2011) Knot formation in newly translated proteins is spontaneous and accelerated by chaperonins. *Nat Chem Biol* **8**, 147–153.
- 48 Kékicheff P, Grabielle-Madellmont C and Ollivon M (1989) Phase diagram of sodium dodecyl sulfate-water system: 1. A calorimetric study. *J Colloid Interface Sci* **131**, 112–132.
- 49 Kékicheff P (1989) Phase diagram of sodium dodecyl sulfate-water system: 2. Complementary isoplethal and isothermal phase studies. *J Colloid Interface Sci* **131**, 133–152.

50 Laughlin RG (1994) Aqueous Phase Behaviour of Surfactants. Academic Press, London.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web site:

Fig. S1. B-factor values for the holo and 2Zn forms.

Fig. S2. Native-PAGE of the purified PaSdsA1.

Fig. S3. Native-PAGE of the holo, 2Zn and apo forms

of PaSdsA1.

Fig. S4. Arrhenius plots for the holo, 2Zn and apo forms of PaSdsA1.

Fig. S5. Critical micelle concentration of SDS in the working buffer.

Fig. S6. DSC thermograms for dimeric and monomeric PaSdsA1 in the presence of SDS.

Table S1. Contact maps for E280 and the zinc atoms in the holo and 2Zn forms.

12 Bibliografía

- 1 Kertesz M a. (2000) Riding the sulfur cycle - Metabolism of sulfonates and sulfate esters in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 135–175.
- 2 Brown KA (1982) Sulphur in the environment: A review. *Environ. Pollut. Ser. B, Chem. Phys.* **3**, 47–80.
- 3 Stipanuk MH (2004) Sulfur amino acid metabolism: Pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu. Rev. Nutr.* **24**, 539–577.
- 4 Hummerjohann J, Küttel E, Quadroni M, Ragaller J, Leisinger T & Kertesz M a. (1998) Regulation of the sulfate starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: Role of cysteine biosynthetic intermediates. *Microbiology* **144**, 1375–1386.
- 5 Kertesz MA, Leisinger T & Cook AM (1993) Proteins induced by sulfate limitation in *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, or *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **175**, 1187–1190.
- 6 Quadroni M, Staudenmann W, Kertesz M & James P (1996) Analysis of global responses by protein and peptide fingerprinting of proteins isolated by two-dimensional gel electrophoresis. Application to the sulfate-starvation response of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **239**, 773–781.
- 7 Dainese P, Staudenmann W, Quadroni M, Korostensky C, Gonnet G, Kertesz M & James P (1997) Probing protein function using a combination of gene knockout and proteome analysis by mass spectrometry. *Electrophoresis* **18**, 432–442.
- 8 Quadroni M, James P, Dainese-Hatt P & Kertesz MA (1999) Proteome mapping, mass spectrometric sequencing and reverse transcription-PCR for characterization of the sulfate starvation-induced response in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Eur. J. Biochem.* **266**, 986–996.
- 9 Beil S, Kehrl H, James P, Staudenmann W, Cook AM, Leisinger T & Kertesz MA (1995) Purification and characterization of the arylsulfatase synthesized by *Pseudomonas aeruginosa* PAO during growth in sulfate-free medium and cloning of the arylsulfatase gene (*atsA*). *Eur. J. Biochem.* **229**, 385–394.
- 10 Roberts R, Abelson P, Cowie D, Bolton E & Britten R (1955) *Studies of Biosynthesis in Escherichia coli*, 1st ed. Carnegie Institution, Washington DC.

- 11 Zerbinati O, Vincenti M, Pittavino S & Gennaro MC (1997) Fate of aromatic sulfonates in fluvial environment. *Chemosphere* **35**, 2295–2305.
- 12 Fichtner S, Lange FT, Schmidt W & Brauch H-J (1995) Determination of aromatic sulfonates in the river Elbe by on-line ion-pair extraction and ion-pair chromatography. *Fresenius. J. Anal. Chem.* **353**, 57–63.
- 13 Hellmann H (1991) Area-detailed determination of anion-active surfactants (LAS) in flowing waters of the Federal Republic of Germany through the UV spectra of second order. *Zeitschrift für Wasser und Abwasserforsch.* **24**, 178–187.
- 14 Zerbinati O, Salomone S & Ostacoli G (1994) Sulfonated derivatives of naphthalene in water samples of an Italian river. *Chemosphere* **29**, 2639–2643.
- 15 Prats D, Ruiz F, Vazquez B, Zarzo D, Berna JL & Moreno A (1993) LAS homolog distribution shift during wastewater treatment and composting: Ecological implications. *Environ. Toxicol. Chem.* **12**, 1599–1608.
- 16 de Wolf W & Feijtel T (1998) Terrestrial risk assessment for linear alkyl benzene sulfonate (LAS) in sludge-amended soils. *Chemosphere* **36**, 1319–1343.
- 17 Coughtrie MWH (1996) Sulphation catalysed by the human cytosolic sulphotransferases - chemical defence or molecular terrorism? *Hum. Exp. Toxicol.* **15**, 547–555.
- 18 Kim D, Kim B, Kim H, Sohng I & Kobashi K (1994) Sulfation of parabens and tyrosylpeptides by bacterial arylsulfate sulfotransferases. *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 1326–1328.
- 19 Niehrs C, Beißwanger R & Huttner WB (1994) Protein tyrosine sulfation, 1993 — an update. *Chem. Biol. Interact.* **92**, 257–271.
- 20 Ouyang YB, Lane WS & Moore KL (1998) Tyrosylprotein sulfotransferase: purification and molecular cloning of an enzyme that catalyzes tyrosine O-sulfation, a common posttranslational modification of eukaryotic proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 2896–2901.
- 21 Bundgaard JR, Vuust J & Rehfeld JF (1997) New consensus features for tyrosine O-sulfation determined by mutational analysis. *J. Biol. Chem.* **272**, 21700–21705.
- 22 Huttner WB (1988) Tyrosine sulfation and the secretory pathway. *Annu. Rev. Physiol.* **50**, 363–376.
- 23 Coughtrie MW., Sharp S, Maxwell K & Innes NP (1998) Biology and function of the reversible sulfation pathway catalysed by human sulfotransferases and sulfatases. *Chem. Biol. Interact.* **109**, 3–27.
- 24 Painter H (1992) Anionic surfactants. In *The Handbook of Environmental Chemistry* (Hutzinger O, ed), 1st ed., pp. 1–88. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.
- 25 Brycki B, Waligórska M & Szulc A (2014) The biodegradation of monomeric and dimeric alkylammonium surfactants. *J. Hazard. Mater.* **280**, 797–815.

- 26 Dodgson KS, White G & Fitzgerald W (1982) *Sulfatases of Microbial Origin* CRC Press, Boca Ratón, FL.
- 27 Lee C, Russell N & White G (1995) Modelling the kinetics of biodegradation of anionic surfactants by biofilm bacteria from polluted riverine sites: A comparison of five classes of surfactant at three sites. *Water Res.* **29**, 2491–2497.
- 28 White GF, Russell NJ & Day MJ (1985) A survey of sodium dodecyl sulphate (SDS) resistance and alkylsulphatase production in bacteria from clean and polluted river sites. *Environ. Pollut. Ser. A, Ecol. Biol.* **37**, 1–11.
- 29 Marzluf GA (1997) Molecular genetics of sulfur assimilation in filamentous fungi and yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**, 73–96.
- 30 Marzluf GA (1994) Genetics and molecular genetics of sulfur assimilation in the fungi. *Adv. Genet.* **31**, 187–206.
- 31 Hallmann A & Sumper M (1994) An inducible arylsulfatase of *Volvox carteri* with properties suitable for a reporter-gene system. Purification, characterization and molecular cloning. *Eur. J. Biochem.* **221**, 143–150.
- 32 de Hostos EL (1988) Purification and biosynthesis of a derepressible periplasmic arylsulfatase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* **106**, 29–37.
- 33 Barbeyron T, Potin P, Richard C, Collin O & Kloareg B (1990) Arylsulphatase from *Alteromonas carrageenovora*. *Microbiology* **141**, 2897–2904.
- 34 Parenti G, Meroni G & Ballabio A (1997) The sulfatase gene family. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**, 386–391.
- 35 Ganeshamurthy AN & Nielsen NE (1990) Arylsulphatase and the biochemical mineralization of soil organic sulphur. *Soil Biol. Biochem.* **22**, 1163–1165.
- 36 Poux N (1966) Ultrastructural localization of arylsulfatase activity in plant meristematic cells. *J. Histochem. Cytochem.* **14**, 932–933.
- 37 Freeman C & Hopwood J (1992) Lysosomal degradation of heparin and heparan sulfate. In *Heparin and Related Polysaccharides* (Lane D, Bjork I, & Lindahl U, eds), pp. 121–134. Plenum Press, New York.
- 38 Miech C, Dierks T, Selmer T, von Figura K & Schmidt B (1998) Arylsulfatase from *Klebsiella pneumoniae* carries a formylglycine generated from a serine. *J. Biol. Chem.* **273**, 4835–4837.
- 39 Murooka Y, Ishibashi K, Yasumoto M, Sasaki M, Sugino H, Azakami H & Yamashita M (1990) A sulfur- and tyramine-regulated *Klebsiella aerogenes* operon containing the arylsulfatase (*atsA*) gene and the *atsB* gene. *J. Bacteriol.* **172**, 2131–2140.
- 40 Adachi T, Murooka Y & Harada T (1975) Regulation of arylsulfatase synthesis by sulfur compounds in

- Klebsiella aerogenes. *J. Bacteriol.* **121**, 29–35.
- 41 Henderson M & Milazzo F (1979) Arylsulfatase in Salmonella typhimurium: detection and influence of carbon source and tyramine on its synthesis. *J. Bacteriol.* **139**, 80–87.
- 42 Murooka Y & Harada T (1981) Regulation of derepressed synthesis of arylsulfatase by tyramine oxidase in Salmonella typhimurium. *J. Bacteriol.* **145**, 796–802.
- 43 Fowler L & Rammler D (1963) Sulfur metabolism of Aerobacter aerogenes. II. The purification and some properties of a sulfatase. *Biochemistry* **208**, 230–237.
- 44 Rammler D, Grado C & Fowler L (1964) Sulfur metabolism of Aerobacter aerogenes. I. A repressible sulfatase. *Biochemistry* **3**, 224–230.
- 45 Fitzgerald W & Milazzo F (1970) Arylsulfatase multiplicity in Proteus rettgeri. *Can. J. Microbiol.* **16**, 1109–1115.
- 46 Dodgson KS (1959) Observations on the arylsulphatase of Proteus vulgaris. *Enzymologia* **20**, 301–312.
- 47 Murooka Y, Yim M & Harada T (1980) Formation and purification of Serratia marcescens arylsulfatase. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**, 812–817.
- 48 Fitzgerald J & George J (1977) Localization of arylsulfatase in Pseudomonas C12B. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**, 107–108.
- 49 Delisle G & Milazzo F (1972) Characterization of arylsulfatase isoenzymes from Pseudomonas aeruginosa. *Can. J. Microbiol.* **18**, 561–568.
- 50 Fitzgerald J & Cline M (1977) The occurrence of an inducible arylsulphatase in Comamonas terrigena. *FEMS Microbiol Lett* **2**, 221–224.
- 51 Mueller S & Schmidt A (1986) Substrate-dependent arylsulfatase activity in the cyanobacterium Plectonema 73110. *Z. Naturforsch. C* **41**, 820–824.
- 52 Dierks T, Schmidt B & von Figura K (1997) Conversion of cysteine to formylglycine: A protein modification in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 11963–11968.
- 53 Knaust A, Schmidt B, Dierks T, von Bülow R & von Figura K (1998) Residues critical for formylglycine formation and/or catalytic activity of arylsulfatase A. *Biochemistry* **37**, 13941–13946.
- 54 Dierks T, Lecca M, Schmidt B & von Figura K (1998) Conversion of cysteine to formylglycine in eukariotic sulfatases occurs by a common mechanism in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* **423**, 61–65.
- 55 Schmidt B, Selmer T, Ingendoh A & von Figura K (1995) A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency. *Cell* **82**, 271–278.
- 56 Lukatela G, Krauss N, Theis K, Selmer T, Gieselmann V, von Figura K & Saenger W (1998) Crystal structure of human arylsulfatase A: the aldehyde function and the metal ion at the active site suggest a novel mechanism for sulfate ester hydrolysis. *Biochemistry* **37**, 3654–3664.

- 57 Bond C, Clements P, Ashby S, Collyer C, Harrop S, Hopwood J & Guss JM (1997) Structure of a human lysosomal sulfatase. *Structure* **5**, 277–289.
- 58 Hagelueken G, Adams TM, Wiehlmann L, Widow U, Kolmar H, Tümmler B, Heinz DW & Schubert W-D (2006) The crystal structure of SdsA1, an alkylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa*, defines a third class of sulfatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 7631–7636.
- 59 Schober M, Gadler P, Knaus T, Kayer H, Birner-Grünberger R, Güllly C, Macheroux P, Wagner U & Faber K (2011) A stereoselective inverting sec-alkylsulfatase for the deracemization of sec-alcohols. *Org. Lett.* **13**, 4296–4299.
- 60 Knaus T, Schober M, Kepplinger B, Faccinelli M, Pitzer J, Faber K, Macheroux P & Wagner U (2012) Structure and mechanism of an inverting alkylsulfatase from *Pseudomonas* sp. DSM6611 specific for secondary alkyl sulfates. *FEBS J.* **279**, 4374–4384.
- 61 Karsisiotis a I, Damblon CF & Roberts GCK (2014) A variety of roles for versatile zinc in metallo- β -lactamases. *Metallomics* **6**, 1181–97.
- 62 Davison J, Brunel F, Phanopoulos A, Prozzi D & Terpstra P (1992) Cloning and sequencing of *Pseudomonas* genes determining sodium dodecyl sulfate biodegradation. *Gene* **114**, 19–24.
- 63 Jovicic B, Venturi V, Davison J, Topisirovic L & Kojic M (2010) Regulation of the SdsA alkyl sulfatase of *Pseudomonas* sp. ATCC19151 and its involvement in degradation of anionic surfactants. *J. Appl. Microbiol.* **109**, 1076–1083.
- 64 Kahnert A & Kertesz M a. (2000) Characterization of a sulfur-regulated oxygenative alkylsulfatase from *Pseudomonas putida* S-313. *J. Biol. Chem.* **275**, 31661–31667.
- 65 Long M, Ruan L, Li F, Yu Z & Xu X (2011) Heterologous expression and characterization of a recombinant thermostable alkylsulfatase (sdsAP). *Extremophiles* **15**, 293–301.
- 66 Daiyasu H, Osaka K, Ishino Y & Toh H (2001) Expansion of the zinc metallo-hydrolase family of the β -lactamase fold. *FEBS Lett.* **503**, 1–6.
- 67 Ernst S, Langer R, Cooney CL & Sasisekharan R (2008) Enzymatic degradation of glycosaminoglycans. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*
- 68 Bebrone C (2007) Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem. Pharmacol.* **74**, 1686–1701.
- 69 Bonomo MSH and RA (2003) β -Lactamases: A survey of protein diversity. *Curr. Drug Target - Infectious Disord.* **3**, 9–23.
- 70 Sabath LD & Abraham EP (1966) Zinc as a cofactor for cephalosporinase from *Bacillus cereus* 569. *Biochem. J.* **98**, 11C–13C.
- 71 Bandoh K, Watanabe K, Muto Y, Tanaka Y, Kato N & Ueno K (1992) Conjugal transfer of imipenem resistance in *Bacteroides fragilis*. *J. Antibiot* **45**, 542–547.

- 72 Watanabe M, Iyobe S, Inoue M & Mitsuhashi S (1991) Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 147–151.
- 73 Fritsche TR, Sader HS, Toleman MA, Walsh TR & Jones RN (2005) Emerging metallo- β -lactamase-mediated resistances: A summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. *Clin. Infect. Dis.* **41**, S276–S278.
- 74 Fast W, Wang Z & Benkovic SJ (2001) Familial Mutations and Zinc Stoichiometry Determine the Rate-Limiting Step of Nitrocefin Hydrolysis by Metallo- β -lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Biochemistry* **40**, 1640–1650.
- 75 Jacquin O, Balbeur D, Damblon C, Marchot P, De Pauw E, Roberts GCK, Frère J-M & Matagne A (2009) Positively cooperative binding of zinc ions to *Bacillus cereus* 569/H/9 beta-lactamase II suggests that the binuclear enzyme is the only relevant form for catalysis. *J. Mol. Biol.* **392**, 1278–91.
- 76 Selevsek N, Rival S, Tholey A, Heinzle E, Heinz U, Hemmingsen L & Adolph HW (2009) Zinc Ion-induced Domain Organization in Metallo- β -lactamases: A FLEXIBLE “ZINC ARM” FOR RAPID METAL ION TRANSFER? *J. Biol. Chem.* **284**, 16419–16431.
- 77 Page MI & Badarau A (2008) The mechanisms of catalysis by metallo- β -lactamases. *Bioinorg. Chem. Appl.* **2008**, 1–14.
- 78 Fonseca F, Bromley EHC, Saavedra MJ, Correia A & Spencer J (2011) Crystal structure of *Serratia fonticola* Sfh-I: activation of the nucleophile in mono-zinc metallo- β -lactamases. *J. Mol. Biol.* **411**, 951–9.
- 79 Garau G, Bebrone C, Anne C, Galleni M, Frère J-M & Dideberg O (2005) A metallo-beta-lactamase enzyme in action: crystal structures of the monozinc carbapenemase CphA and its complex with biapenem. *J. Mol. Biol.* **345**, 785–95.
- 80 Palzkill T (2013) Metallo- β -lactamase structure and function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1277**, 91–104.
- 81 Crowder MW, Spencer J & Vila AJ (2006) Metallo- β -lactamases: Novel Weaponry for Antibiotic Resistance in Bacteria. *Acc. Chem. Res.* **39**, 721–728.
- 82 Weston J (2005) Mode of action of bi- and trinuclear zinc hydrolases and their synthetic analogues. *Chem. Rev.* **105**, 2151–2174.
- 83 Fink AL & Page MI (2011) The mechanism of catalysis by β -lactamases. In *β -lactamases* (Frère J-M, ed), 1st ed., pp. 161–198. Nova Science Publishers, New York.
- 84 Kaminskaia N V, Spingler B & Lippard SJ (2000) Hydrolysis of β -lactam antibiotics catalyzed by dinuclear zinc(II) complexes: Functional mimics of metallo- β -lactamases. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 6411–6422.
- 85 Galleni M, Lamotte-Brasseur J, Rossolini GM, Spencer J, Dideberg O, Frère J-M & Group TM- β -LW

- (2001) Standard numbering scheme for class B β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 660–663.
- 86 Widmann M, Pleiss J & Oelschlaeger P (2012) Systematic analysis of metallo- β -lactamases using an automated database. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 3481–3491.
- 87 Wang Z, Fast W, Valentine AM & Benkovic SJ (1999) Metallo- β -lactamase: Structure and mechanism. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 614–622.
- 88 Garau G, Di Guilmi AM & Hall BG (2005) Structure-based phylogeny of the metallo- β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2778–2784.
- 89 Meini M-R, Llarrull L & Vila A (2014) Evolution of metallo- β -lactamases: Trends revealed by natural diversity and in vitro evolution. *Antibiotics* **3**, 285–316.
- 90 Cameron AD, Ridderström M, Olin B & Mannervik B (1999) Crystal structure of human glyoxalase II and its complex with a glutathione thiolester substrate analogue. *Structure* **7**, 1067–1078.
- 91 Kim MH, Choi W-C, Kang HO, Lee JS, Kang BS, Kim K-J, Derewenda ZS, Oh T-K, Lee CH & Lee J-K (2005) The molecular structure and catalytic mechanism of a quorum-quenching N-acyl-L-homoserine lactone hydrolase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 17606–17611.
- 92 Thomas PW, Stone EM, Costello AL, Tierney DL & Fast W (2005) The quorum-quenching lactonase from *Bacillus thuringiensis* is a metalloprotein. *Biochemistry* **44**, 7559–7569.
- 93 Ishii R, Minagawa A, Takaku H, Takagi M, Nashimoto M & Yokoyama S (2005) Crystal structure of the tRNA 3' processing endoribonuclease tRNase Z from *Thermotoga maritima*. *J. Biol. Chem.* **280**, 14138–14144.
- 94 Frazao C, Silva G, Gomes CM, Matias P, Coelho R, Sieker L, Macedo S, Liu MY, Oliveira S, Teixeira M, Xavier A V, Rodrigues-Pousada C, Carrondo MA & Le Gall J (2000) Structure of a dioxygen reduction enzyme from *Desulfovibrio gigas*. *Nat Struct Mol Biol* **7**, 1041–1045.
- 95 Silaghi-Dumitrescu R, Kurtz Donald M., Ljungdahl LG & Lanzilotta WN (2005) X-ray crystal structures of *Moorella thermoacetica* FprA. Novel diiron site structure and mechanistic insights into a scavenging nitric oxide reductase. *Biochemistry* **44**, 6492–6501.
- 96 Makris TM, Knoot CJ, Wilmot CM & Lipscomb JD (2013) Structure of a dinuclear iron cluster-containing β -hydroxylase active in antibiotic biosynthesis. *Biochemistry* **52**, 6662–6671.
- 97 Davies RB & Abraham EP (1974) Metal cofactor requirement of β -lactamase II. *Biochem. J.* **143**, 129–135.
- 98 González JM, Medrano Martín FJ, Costello AL, Tierney DL & Vila AJ (2007) The Zn² position in metallo- β -lactamases is critical for activity: A study on chimeric metal sites on a conserved protein scaffold. *J. Mol. Biol.* **373**, 1141–1156.
- 99 Badarau A, Damblon C & Page MI (2007) The activity of the dinuclear cobalt- β -lactamase from

- Bacillus cereus in catalysing the hydrolysis of β -lactams. *Biochem. J.* **401**, 197–203.
- 100 Badarau A & Page MI (2006) The variation of catalytic efficiency of Bacillus cereus metallo- β -lactamase with different active site metal ions. *Biochemistry* **45**, 10654–10666.
- 101 Hu Z, Spadafora LJ, Hajdin CE, Bennett B & Crowder MW (2009) Structure and mechanism of copper- and nickel-substituted analogues of metallo- β -lactamase L1. *Biochemistry* **48**, 2981–2989.
- 102 Concha NO, Rasmussen BA, Bush K & Herzberg O (1997) Crystal structures of the cadmium- and mercury-substituted metallo-beta-lactamase from Bacteroides fragilis. *Protein Sci.* **6**, 2671–6.
- 103 González JM, Buschiazzi A & Vila AJ (2010) Evidence of adaptability in metal coordination geometry and active-site loop conformation among B1 metallo- β -lactamases. *Biochemistry* **49**, 7930–7938.
- 104 Quintanar L & Rivillas-Acevedo L (2013) Studying metal ion–protein interactions: Electronic absorption, circular dichroism, and electron paramagnetic resonance. In *Protein-Ligand Interactions: Methods and Applications* (Williams MA & Daviter T, eds), pp. 267–297. Humana Press.
- 105 De Seny D, Heinz U, Wommer S, Kiefer M, Meyer-Klaucke W, Galleni M, Frère JM, Bauer R & Adolph HW (2001) Metal ion binding and coordination geometry for wild type and mutants of metallo- β -lactamase from Bacillus cereus 569/H/9 (BcII): A combined thermodynamic, kinetic, and spectroscopic approach. *J. Biol. Chem.* **276**, 45065–45078.
- 106 Hemmingsen L, Damblon C, Antony J, Jensen M, Adolph HW, Wommer S, Roberts GCK & Bauer R (2001) Dynamics of mononuclear cadmium β -lactamase revealed by the combination of NMR and PAC spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 10329–10335.
- 107 Crawford PA, Yang K-W, Sharma N, Bennett B & Crowder MW (2005) Spectroscopic studies on cobalt(II)-substituted metallo- β -lactamase ImiS from Aeromonas veronii bv. sobria. *Biochemistry* **44**, 5168–5176.
- 108 Hawk MJ, Breece RM, Hajdin CE, Bender KM, Hu Z, Costello AL, Bennett B, Tierney DL & Crowder MW (2009) Differential binding of Co(II) and Zn(II) to metallo- β -lactamase Bla2 from Bacillus anthracis. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 10753–10762.
- 109 Kaminskaia N V, Spingler B & Lippard SJ (2001) Intermediate in β -Lactam Hydrolysis Catalyzed by a Dinuclear Zinc(II) Complex: Relevance to the Mechanism of Metallo- β -lactamase. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 6555–6563.
- 110 Breidenstein EBM, de la Fuente-Núñez C & Hancock REW (2011) Pseudomonas aeruginosa: All roads lead to resistance. *Trends Microbiol.* **19**, 419–426.
- 111 Asboe D, Gant V, Aucken HM, Moore D a, Umasankar S, Bingham JS, Kaufmann ME & Pitt TL (1998) Persistence of Pseudomonas aeruginosa strains in respiratory infection in AIDS patients. *AIDS* **12**, 1771–1775.

- 112 Branski LK, Al-Mousawi A, Rivero H, Jeschke MG, Sanford AP & Herndon DN (2009) Emerging infections in burns. *Surg. Infect. (Larchmt)*. **10**, 389–397.
- 113 Høiby N (2011) Recent advances in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *BMC Med.* **9**, 32.
- 114 Hales SG, Dodgson KS, White GF, Jones N & Watson GK (1982) Initial stages in the biodegradation of the surfactant sodium dodecyltriethoxy sulfate by *Pseudomonas* sp. strain DES1. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 790–800.
- 115 Klebensberger J, Lautenschlager K, Bressler D, Wingender J & Philipp B (2007) Detergent-induced cell aggregation in subpopulations of *Pseudomonas aeruginosa* as a preadaptive survival strategy. *Environ. Microbiol.* **9**, 2247–2259.
- 116 Boltes I, Czapinska H, Kahnert A, Von Bülow R, Dierks T, Schmidt B, Von Figura K, Kertesz M a. & Usón I (2001) 1.3 Å structure of arylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa* establishes the catalytic mechanism of sulfate ester cleavage in the sulfatase family. *Structure* **9**, 483–491.
- 117 Müller I, Kahnert A, Pape T, Sheldrick GM, Meyer-Klaucke W, Dierks T, Kertesz M & Usón I (2004) Crystal Structure of the Alkylsulfatase AtsK: Insights into the Catalytic Mechanism of the Fe(II) α -Ketoglutarate-Dependent Dioxygenase Superfamily^{†,‡}. *Biochemistry* **43**, 3075–3088.
- 118 Bennett MJ, Choe S & Eisenberg D (1994) Domain swapping: Entangling alliances between proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 3127–3131.
- 119 Bennett MJ, Schlunegger MP & Eisenberg D (1995) 3D domain swapping: A mechanism for oligomer assembly. *Protein Sci.* **4**, 2455–2468.
- 120 Schlunegger MP, Bennett MJ & Eisenberg D (1997) Oligomer formation by 3D domain swapping: A model for protein assembly and misassembly. *Adv. Protein Chem.* **50**, 61–122.
- 121 Jaskolski M (2001) 3D domain swapping, protein oligomerization, and amyloid formation. *Acta Biochim. Pol.* **48**, 807–827.
- 122 Rousseau F, Schymkowitz J & Itzhaki L (2012) Implications of 3D domain swapping for protein folding, misfolding and function. In *Protein Dimerization and Oligomerization in Biology SE - 9* (Matthews J, ed), pp. 137–152. Springer New York.
- 123 Mallam AL & Jackson SE (2005) Folding studies on a knotted protein. *J. Mol. Biol.* **346**, 1409–1421.
- 124 Mallam AL (2009) How does a knotted protein fold? *FEBS J.* **276**, 365–375.
- 125 Mallam AL, Rogers JM & Jackson SE (2010) Experimental detection of knotted conformations in denatured proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 8189–8194.
- 126 Virnau P, Mallam A & Jackson S (2011) Structures and folding pathways of topologically knotted proteins. *J. Phys. Condens. Matter* **23**, 033101.
- 127 Yoshimura Y, Lin Y, Yagi H, Lee Y-H, Kitayama H, Sakurai K, So M, Ogi H, Naiki H & Goto Y

- (2012) Distinguishing crystal-like amyloid fibrils and glass-like amorphous aggregates from their kinetics of formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 14446–51.
- 128 So M, Hall D & Goto Y (2016) Revisiting supersaturation as a factor determining amyloid fibrillation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **36**, 32–39.
- 129 Biou V, Dumas R, Cohen-Addad C, Douce R, Job D & Pebay-Peyroula E (1997) The crystal structure of plant acetohydroxy acid isomeroeductase complexed with NADPH, two magnesium ions and a herbicidal transition state analog determined at 1.65 Å resolution. *EMBO J.* **16**, 3405–3415.
- 130 Taylor WR & Lin K (2003) Protein knots: A tangled problem. *Nature* **421**, 25.
- 131 Misaghi S, Galardy PJ, Meester WJN, Ovaa H, Ploegh HL & Gaudet R (2005) Structure of the ubiquitin hydrolase UCH-L3 complexed with a suicide substrate. *J. Biol. Chem.* **280**, 1512–1520.
- 132 Ahn HJ, Kim H, Yoon H, Lee B II, Suh SW & Yang JK (2003) Crystal structure of tRNA(m1G37)methyltransferase: insights into tRNA recognition. *EMBO J.* **22**, 2593–2603.
- 133 Liang C & Mislow K (1994) Knots in proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 11189–11190.
- 134 Liang C & Mislow K (1995) Topological features of protein structures: Knots and links. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 4201–4213.
- 135 Boutz DR, Cascio D, Whitelegge J, Perry LJ & Yeates TO (2007) Discovery of a thermophilic protein complex stabilized by topologically interlinked chains. *J. Mol. Biol.* **368**, 1332–1344.
- 136 Cao Z, Roszak AW, Gourlay LJ, Lindsay JG & Isaacs NW (2005) Bovine mitochondrial peroxiredoxin III forms a two-ring catenane. *Structure* **13**, 1661–1664.
- 137 Duff AP, Cohen AE, Ellis PJ, Kuchar JA, Langley DB, Shepard EM, Dooley DM, Freeman HC & Guss JM (2003) The crystal structure of *Pichia pastoris* lysyl oxidase. *Biochemistry* **42**, 15148–15157.
- 138 Yeates TO, Norcross TS & King NP (2007) Knotted and topologically complex proteins as models for studying folding and stability. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**, 595–603.
- 139 Zhou HX (2003) Effect of catenation on protein folding stability. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 9280–9281.
- 140 Helgstrand C, Wikoff WR, Duda RL, Hendrix RW, Johnson JE & Liljas L (2003) The refined structure of a protein catenane: The HK97 bacteriophage capsid at 3.44 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **334**, 885–899.
- 141 Blankenship JW & Dawson PE (2003) Thermodynamics of a designed protein catenane. *J. Mol. Biol.* **327**, 537–548.
- 142 L. Z. Yan, P. E. Dawson (2001) Design and synthesis of a protein catenane. *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**, 3625–3627.
- 143 De La Mora E, Flores-Hernandez E, Jakoncic J, Stojanoff V, Siliqi D, Sanchez-Puig N & Moreno A (2015) SdsA polymorph isolation and improvement of their crystal quality using nonconventional

- crystallization techniques. *J. Appl. Crystallogr.* **48**, 1551.
- 144 Helgstrand C, Wikoff WR, Duda RL, Hendrix RW, Johnson JE & Liljas L (2003) The Refined Structure of a Protein Catenane: The HK97 Bacteriophage Capsid at 3.44Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **334**, 885–899.
- 145 Scheer M, Grote A, Chang A, Schomburg I, Munaretto C, Rother M, Sohngen C, Stelzer M, Thiele J & Schomburg D (2011) BRENDA, the enzyme information system in 2011. *Nucleic Acids Res* **39**, D670–6.
- 146 Elsasser S, Schmidt M & Finley D (2005) Characterization of the proteasome using native gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* **398**, 353–363.
- 147 Brunelle JL & Green R (2014) One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE). *Methods Enzymol.* **541**, 151–159.
- 148 Costas M, Rodríguez-Larrea D, De Maria L, Borchert T V., Gómez-Puyou A & Sanchez-Ruiz JM (2009) Between-species variation in the kinetic stability of TIM proteins linked to solvation-barrier free energies. *J. Mol. Biol.* **385**, 924–937.
- 149 Rodríguez-Larrea D, Minning S, Borchert T V. & Sanchez-Ruiz JM (2006) Role of solvation barriers in protein kinetic stability. *J. Mol. Biol.* **360**, 715–724.
- 150 Aguirre Y, Cabrera N, Aguirre B, Pérez-Montfort R, Hernandez-Santoyo A, Reyes-Vivas H, Enríquez-Flores S, de Gómez-Puyou MT, Gómez-Puyou A, Sanchez-Ruiz JM & Costas M (2014) Different contribution of conserved amino acids to the global properties of triosephosphate isomerases. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **82**, 323–335.
- 151 Aguirre C (2011) Cinética enzimática de la tripsina de *Bos taurus* utilizando calorimetría de titulación isotérmica. .
- 152 Aguirre C, Condado-Morales I, Olguin LF & Costas M (2015) Isothermal titration calorimetry determination of individual rate constants of trypsin catalytic activity. *Anal. Biochem.* **479**, 18–27.
- 153 Transtrum MK, Hansen LD & Quinn C (2015) Enzyme kinetics determined by single-injection isothermal titration calorimetry. *Methods* **76**, 194–200.
- 154 Chekmeneva E, Prohens R, Díaz-Cruz JM, Ariño C & Esteban M (2008) Thermodynamics of Cd²⁺ and Zn²⁺ binding by the phytochelatin (γ-Glu-Cys)₄-Gly and its precursor glutathione. *Anal. Biochem.* **375**, 82–89.
- 155 Reichle R a., McCurdy KG & Hepler LG (1975) Zinc hydroxide: Solubility product and hydroxy-complex stability constants from 12.5–75 °C. *Can. J. Chem.* **53**, 3841–3845.
- 156 Yu Q, Kandededara A, Xu Y & Rorabacher DB (1997) Avoiding interferences from Good's buffers: A contiguous series of noncomplexing tertiary amine buffers covering the entire range of pH 3–11. *Anal. Biochem.* **253**, 50–56.

12. Bibliografia

- 157 Zhang Y, Akilesh S & Wilcox DE (2000) Isothermal titration calorimetry measurements of Ni(II) and Cu(II) B binding to His, GlyGlyHis, HisGlyHis, and bovine serum albumin: A critical evaluation. *Inorg. Chem.* **39**, 3057–3064.
- 158 Wilcox DE (2008) Isothermal titration calorimetry of metal ions binding to proteins: An overview of recent studies. *Inorganica Chim. Acta* **361**, 857–867.
- 159 Wyrzykowski D, Tesmar A, Jacewicz D, Pranczk J & Chmurzyński L (2014) Zinc(II) complexation by some biologically relevant pH buffers. *J. Mol. Recognit.* **27**, 722–6.
- 160 Hunt JB, Neece SH & Ginsburg A (1985) The use of 4-(2-pyridylazo)resorcinol in studies of zinc release from Escherichia coli aspartate transcarbamoylase. *Anal. Biochem.* **146**, 150–157.
- 161 McCall K a & Fierke C a (2000) Colorimetric and fluorimetric assays to quantitate micromolar concentrations of transition metals. *Anal. Biochem.* **284**, 307–315.
- 162 Rivillas-Acevedo L, Sánchez-López C, Amero C & Quintanar L (2015) Structural basis for the inhibition of truncated islet amyloid polypeptide aggregation by Cu(II): Insights into the bioinorganic chemistry of type II diabetes. *Inorg. Chem.* **54**, 3788–3796.
- 163 DiTusa C a., McCall K a., Christensen T, Mahapatro M, Fierke C a. & Toone EJ (2001) Thermodynamics of metal ion binding. 2. Metal ion binding by carbonic anhydrase variants. *Biochemistry* **40**, 5345–5351.
- 164 Hernandez Valladares M, Felici A, Weber G, Adolph HW, Zeppezauer M, Rossolini GM, Amicosante G, Frère JM & Galleni M (1997) Zn(II) dependence of the Aeromonas hydrophila AE036 metallo- β -lactamase activity and stability. *Biochemistry* **36**, 11534–11541.
- 165 Deep S & Ahluwalia JC (2001) Interaction of bovine serum albumin with anionic surfactants. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **3**, 4583–4591.
- 166 Xu Q & Keiderling TA (2004) Effect of sodium dodecyl sulfate on folding and thermal stability of acid-denatured cytochrome c: A spectroscopic approach. *Protein Sci.* **13**, 2949–2959.
- 167 Lim NCH & Jackson SE (2015) Mechanistic Insights into the Folding of Knotted Proteins In Vitro and In Vivo. *J. Mol. Biol.* **427**, 248–258.
- 168 Mallam AL & Jackson SE (2011) Knot formation in newly translated proteins is spontaneous and accelerated by chaperonins. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 147–153.
- 169 Aguirre C, Goto Y & Costas M (2016) Thermal and chemical unfolding pathways of PaSdsA1 sulfatase, a homo-dimer with topologically interlinked chains. *FEBS Lett.* **590**, 202–214.
- 170 Daniele PG, Prenesti E & Ostacoli G (1996) Ultraviolet-circular dichroism spectra for structural analysis of copper(II) complexes with aliphatic and aromatic ligands in aqueous solution. *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.*, 3269–3275.
- 171 Kelly SM, Jess TJ & Price NC (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys.*

- Acta - Proteins Proteomics* **1751**, 119–139.
- 172 Kállay C, Várnagy K, Micera G, Sanna D & Sóvágó I (2005) Copper(II) complexes of oligopeptides containing aspartyl and glutamyl residues. Potentiometric and spectroscopic studies. *J. Inorg. Biochem.* **99**, 1514–1525.
- 173 Grande-Aztatzi R, Rivillas-Acevedo L, Quintanar L & Vela A (2013) Structural models for Cu(II) bound to the fragment 92-96 of the human prion protein. *J. Phys. Chem. B* **117**, 789–799.
- 174 Foster AW, Osman D & Robinson NJ (2014) Metal Preferences and Metallation. *J. Biol. Chem.* **289**, 28095–28103.
- 175 Yu F, Cangelosi VM, Zastrow ML, Tegoni M, Plegaria JS, Tebo AG, Mocny CS, Ruckthong L, Qayyum H & Pecoraro VL (2014) Protein Design: Toward Functional Metalloenzymes. *Chem. Rev.* **114**, 3495–3578.
- 176 Lever A & Solomon EI (2006) Ligand Field Theory and the Properties of Transition Metal Complexes. In *Inorganic Electronic Structure and Spectroscopy, Volume I: Methodology* (Solomon EI & Lever A, eds), 1st ed. Wiley, New York.
- 177 Solomon E & Hanson H (2006) Bioinorganic Spectroscopy. In *Inorganic Electronic Structure and Spectroscopy, Volume II: Applications and Case Studies* (Solomon EI & Lever ABP, eds), 2nd ed., pp. 1–129. Wiley, New York.
- 178 Solomon EI (1984) Electron Paramagnetic Resonance (EPR). *Comments Inorg. Chem.* **3**, 230–238.
- 179 Bernarducci E, Schwindinger WF, Hughey JL, Krogh-Jespersen K & Schugar HJ (1981) Electronic spectra of copper(II)-imidazole and copper(II)-pyrazole chromophores. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 1686–1691.
- 180 Huheey JE, Keiter EA & Keiter RL (1997) *Química Inorgánica*, 4th ed. Oxford University Press.
- 181 Pilbrow JR & Hanson GR (1993) *Metallobiochemistry Part D: Physical and Spectroscopic Methods for Probing Metal Ion Environment in Metalloproteins* Elsevier.
- 182 Peisach J & Blumberg WE (1974) Structural implications derived from the analysis of electron paramagnetic resonance spectra of natural and artificial copper proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **165**, 691–708.
- 183 Brudvig GW (1995) *Biochemical Spectroscopy* Elsevier.
- 184 Antholine W (2005) Low Frequency EPR of Cu²⁺ in Proteins. In *Biomedical EPR, Part A: Free Radicals, Metals, Medicine, and Physiology SE - 14* (Eaton S, Eaton G, & Berliner L, eds), pp. 417–454. Springer US.
- 185 Lee YH, Kristopo AH, Woo AA, Won AMS, Jung CO, Lee DHI, Hayami S & Thue BP (2012) Copper (II) Complexes of Two New Pyridyl] Aliphatic Amine Ligands : Synthetic , Structural , EPR , and Magnetic Studies *. **2**, 926–930.

- 186 Freire E, Schön A & Velazquez-Campoy A (2009) Chapter 5 Isothermal Titration Calorimetry. General Formalism Using Binding Polynomials. *Methods Enzymol.* **455**, 127–155.
- 187 Piñeiro A & Dumas P Affinimeter. .
- 188 Connors K (1987) *Binding Constants: the measurement of molecular complex stability* Wiley Interscience, New York.
- 189 Piñeiro A & Dumas P Affinimeter. .
- 190 Dumas P, Ennifar E, Da Veiga C, Bec G, Palau W, Di Primo C, Piñeiro A, Sabin J, Muñoz E & J R (2016) Extending ITC to kinetics with kinITC. *Methods Enzymol.* **567**, 157–180.
- 191 Kékicheff P, Grabielle-Madelmont C & Ollivon M (1989) Phase diagram of sodium dodecyl sulfate-water system: 1. A calorimetric study. *J. Colloid Interface Sci.* **131**, 112–132.
- 192 Kékicheff P (1989) Phase diagram of sodium dodecyl sulfate-water system: 2. Complementary isoplethal and isothermal phase studies. *J. Colloid Interface Sci.* **131**, 133–152.
- 193 Laughlin RG (1994) *Aqueous Phase Behaviour of Surfactants* Academic Press, London.