

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA

**EFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA
ESTABILIDAD DE PROTEÍNAS: ASPECTOS
ELECTROSTÁTICOS Y EVOLUTIVOS**

Raúl Pérez Jiménez

TESIS DOCTORAL

GRANADA

2005

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Raúl Pérez Jiménez
D.L.: Gr. 1004 - 2005
ISBN: 84-338-3454-1

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas

Fdo: Raúl Pérez Jiménez

Licenciado en Ciencias Químicas por la Universidad de Granada

Granada a 24 de Mayo de 2005

Directores de la Tesis:

Fdo: José Manuel Sánchez Ruiz
Catedrático de Química Física
Departamento de Química Física
Facultad de Ciencias
Universidad de Granada

Fdo: Beatriz Ibarra Molero
Profesora Titular
Departamento de Química Física
Facultad de Ciencias
Universidad de Granada

A mis padres
A mis hermanos

Agradecimientos

Sin duda las dos personas que merecen mi más sincero agradecimiento son José Manuel y Beatriz, los directores de esta Tesis. Ambos me han transmitido sus extensos conocimientos y perseverancia, y han hecho posible, con sus actitudes, que mi trabajo en estos años haya sido fructífero y agradable. De todo corazón, gracias

A David, “el Canario”, su colaboración en la parte final de esta Tesis ha sido de vital importancia. Además, y aunque fue el último en llegar al grupo, en los últimos meses hemos entablado una profunda amistad, lo que ha hecho más agradable, si cabe, el día a día en el laboratorio.

A Antonio Parody, quien me abrió las puertas de la investigación, cuando el resto de puertas estuvieron cerradas.

Quiero agradecer al Dr. García Ruiz y muy especialmente al Dr. Gavira Gallardo, Gavi, (Laboratorio de Estudios Cristalográficos, CSIC) su valiosa colaboración en los experimentos de cristalización de proteínas.

Mi agradecimiento al Dr. Víctor Muñoz, (University of Maryland, College Park, USA) por su extraordinaria acogida durante mis dos estancias en Estados Unidos, las cuales, sin duda, contribuyeron a ampliar mis conocimientos de la mano de un gran científico y una gran persona.

Agradecer a la Dra. Carmen Barón y al Dr. Luís García (Universidad de Almería) el habernos facilitado el uso del calorímetro de su grupo cuando el nuestro se averió.

A todos los compañeros del Departamento, Fernando, Antonio, Raquel, Adela, Andrés. Bertrand, José Manuel y todos los profesores. Todos han estado ahí cuando los necesité.

No me quiero olvidar de las personas que ya no están (aunque algunos volverán), como Salva, Eva, M. del Mar o Loli, con ellos coincidí en mis primeros años y de todos aprendí.

Y finalmente, a mis padres y hermanos. El apoyo incondicional de mi familia ha sido fundamental siempre y más aún en los momentos difíciles. Gracias.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Materiales y métodos.....	19
2.1 Materiales.....	21
2.1.1. Reactivos.....	21
2.1.2 Instrumentación	23
2.2 Métodos.....	26
2.2.1 Obtención de ADN de proteínas mutantes	26
2.2.1.1 Procedimiento general	26
2.2.1.2 Diseño de oligos.....	29
2.2.2 Expresión y purificación de tioredoxina, forma silvestre y formas mutantes.....	30
2.2.3 Ensayos de actividad.....	35
2.2.3.1 Generalidades.	35
2.2.3.2 Realización del experimento	36
2.2.4 Preparación de disoluciones concentradas de desnaturalizante	37
2.2.4.1 Preparación de disoluciones concentradas de cloruro de guanidinio y de tiocianato de guanidinio.....	37
2.2.4.2 Preparación de disoluciones concentradas de urea	38
2.2.5 Calorimetría Diferencial de Barrido.....	39
2.2.5.1 Descripción.....	39
2.2.5.2 El experimento de calorimetría diferencial de barrido	43
2.2.5.3 Análisis de los datos de DSC según la termodinámica de equilibrio	44
2.2.5.4 Modelo de equilibrio de dos estados.	45
2.2.5.5 Modelo de equilibrio multiestado.....	54

2.2.5.6	Determinación de las capacidades caloríficas absolutas de los estados nativo y desnaturalizado a partir de los termogramas experimentales.....	57
2.2.5.7	Estimación teórica de las capacidades caloríficas de los estados nativo y desnaturalizado	58
2.2.6	Dicroísmo Circular	59
2.2.6.1	Generalidades.....	59
2.2.6.2	Dicroísmo circular y la estructura secundaria de proteínas	62
2.2.6.3	Métodos para la estimación de las estructuras secundarias presentes en proteínas mediante dicroísmo circular	63
2.2.6.4	Análisis de perfiles de desnaturalización térmica determinados mediante dicroísmo circular.....	68
2.2.7	Fluorescencia	69
2.2.7.1	Generalidades.....	69
2.2.7.2	Ensayos de desplegamiento y replegamiento de tiorredoxina y análisis de los perfiles cinéticos	71
2.2.7.2.a	Cinéticas en la dirección del desplegamiento.....	71
2.2.7.2.b	Cinéticas en la dirección del replegamiento.....	73
2.2.8	Cristalización de formas mutantes de tiorredoxina en medios difusivos.....	77
2.2.8.1.	Conceptos.....	75
2.2.8.2.	Procedimiento experimental.....	76

3. Estudio de la eficiencia de diferentes sales en el apantallamiento de las interacciones electrostáticas 79

3.1	Introducción	81
3.2	Estimación teórica de las interacciones carga-carga en la molécula de tiorredoxina.	84
3.3	Diseño del mutante T14K.....	90
3.4	Estudios de Dicroísmo Circular.....	93
3.5	Efecto del cloruro de guanidinio en la desnaturalización térmica de tiorredoxina WT y mutante T14K seguido por DSC.....	97

3.6 Efecto del tiocianato de guanidinio en la desnaturalización térmica de tiorredoxina WT seguido por DSC	102
3.7 Efecto del cloruro sódico en la desnaturalización térmica de tiorredoxina WT y mutante T14K seguido por DSC.....	104
3.8 Cálculo del cambio de energía libre de Gibbs	107
3.9 Determinación de los valores de m a partir de experimentos de DSC.....	111
3.10 Determinación de los valores de $m_{1/2}$ para tiorredoxina WT y el mutante T14K.....	113
3.11 Estimación de los errores de los parámetros termodinámicos mediante el método Monte Carlo.....	119
3.12 Dependencia del cambio de energía de Gibbs de desnaturalización para tiorredoxina con la concentración de cloruro de guanidinio.	121
3.13 Dependencia de la energía de Gibbs de desnaturalización con la concentración de cloruro sódico.	128
3.14 Efecto de la mutación T14K en la estabilidad de tiorredoxina.....	129
3.15 Valores de $m_{1/2}$ para tiorredoxina WT empleando tiocianato de guanidinio	130
3.16 Conclusiones.....	131

4. Empleo de la información obtenida del alineamiento de secuencias en el diseño de proteínas 135

4.1 Introducción.....	137
4.2 Análisis de covarianza del alineamiento de secuencias de tiorredoxina. ...	139
4.3 Análisis de la estabilidad mediante los ciclos de dobles y triples mutantes	144
4.4 Caracterización estructural de las formas mutantes mediante CD y cristalografía de rayos X.....	154
4.5 Ensayos de actividad de los mutantes sugeridos por el alineamiento de secuencias.....	157
4.6 Empleo de mutaciones no sugeridas por el alineamiento de secuencias como control.....	159
4.7 Conclusiones.....	164

5. Estudio del desplegamiento inducido por urea de tiorredoxina y formas mutantes. 167

5.1 Estudio mediante medidas de fluorescencia de las cinéticas de replegamiento y desplegamiento inducido por urea.	169
5.1.1 Análisis de los perfiles cinéticos de los ensayos de plegamiento y desplegamiento	169
5.1.2 Análisis según el modelo cinético de dos estados.	177
5.2 Desplegamiento de P34H, WT y G74S inducido por urea seguido mediante ensayos de doble salto	189
5.2.1 Conceptos y procedimiento experimental	189
5.2.2 Análisis de los perfiles de ΔI frente a C según el modelo de dos estados.	192
5.2.3 Análisis global de los perfiles de ΔI frente a C y de los chevrons.	199
5.3 Análisis de los valores de $m_{1/2}$, $m_{D-\ddagger}$ y $m_{N-\ddagger}$	203
5.4 Análisis de los valores de ΔG obtenidos a partir de cinéticas de replegamiento-desplegamiento inducido por urea.	211
5.5 Análisis de los valores de Φ	232
5.6 Conclusiones	237

6. Análisis de la relación entre los acoplamientos a larga distancia obtenidos a partir de los alineamientos de secuencias y la estructura de proteínas 239

6.1 Introducción	241
6.2 Descripción estadística de la relación entre estructura y alineamiento de secuencias: aplicación a tiorredoxina.	243
6.3 Análisis estadístico de la relación estructura-alineamientos para un set de 24 proteínas	249
6.4 Conclusiones.....	253

7. Resumen y conclusiones. 255

8. Apéndices.....	261
Apéndice A1: Determinación del efecto de la concentración de desnaturalizante en los valores de m	263
Apéndice A2: Desviación de la linealidad de la dependencia de ΔG frente a concentración de desnaturalizante causada por uniones específicas de desnaturalizante al estado nativo.....	268
Apéndice B: Representaciones de η frente a f^*	273
Apéndice C: Representaciones de ρ frente a distancia	285
Apéndice D: Realización de ajustes con MLAB	309
9. Referencias bibliográficas	311

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.....	7	Figura 3.14.....	120
Figura 1.2.....	10	Figura 3.15.....	125
Figura 1.3.....	14		
		Figura 4.1.....	142
Figura 2.1.....	29	Figura 4.2.....	143
Figura 2.2.....	33	Figura 4.3.....	145
Figura 2.3.....	41	Figura 4.4.....	147
Figura 2.4.....	42	Figura 4.5.....	148
Figura 2.5.....	48	Figura 4.6.....	152
Figura 2.6.....	51	Figura 4.7.....	153
Figura 2.7.....	64	Figura 4.8.....	153
Figura 2.8.....	65	Figura 4.9.....	155
Figura 2.9.....	66	Figura 4.10.....	156
Figura 2.10.....	70	Figura 4.11.....	157
Figura 2.11.....	72	Figura 4.12.....	158
Figura 2.12.....	74	Figura 4.13.....	161
Figura 2.13.....	78	Figura 4.14.....	163
		Figura 4.15.....	163
Figura 3.1.....	89	Figura 4.16.....	165
Figura 3.2.....	92		
Figura 3.3.....	93	Figura 5.1.....	170
Figura 3.4.....	95	Figura 5.2.....	171
Figura 3.5.....	96	Figura 5.3.....	172
Figura 3.6.....	99	Figura 5.4.....	173
Figura 3.7.....	100	Figura 5.5.....	174
Figura 3.8.....	103	Figura 5.6.....	175
Figura 3.9.....	105	Figura 5.7.....	176
Figura 3.10.....	106	Figura 5.8.....	178
Figura 3.11.....	108	Figura 5.9.....	182
Figura 3.12.....	109	Figura 5.10.....	183
Figura 3.13.....	117	Figura 5.11.....	184

Figura 5.12.....	185	Figura 5.46.....	219
Figura 5.13.....	186	Figura 5.47.....	220
Figura 5.14.....	187	Figura 5.48.....	220
Figura 5.15.....	188	Figura 5.49.....	221
Figura 5.16.....	194	Figura 5.50.....	221
Figura 5.17.....	195	Figura 5.51.....	222
Figura 5.17.....	196	Figura 5.52.....	223
Figura 5.19.....	197	Figura 5.53.....	225
Figura 5.20.....	198	Figura 5.54.....	226
Figura 5.21.....	200	Figura 5.55.....	227
Figura 5.22.....	201	Figura 5.56.....	228
Figura 5.23.....	202	Figura 5.57.....	229
Figura 5.24.....	204	Figura 5.58.....	230
Figura 5.25.....	205	Figura 5.59.....	231
Figura 5.26.....	206	Figura 5.60.....	231
Figura 5.27.....	207	Figura 5.61.....	232
Figura 5.28.....	207		
Figura 5.29.....	208	Figura 6.1.....	247
Figura 5.30.....	208	Figura 6.2.....	248
Figura 5.31.....	209	Figura 6.3.....	251
Figura 5.32.....	210		
Figura 5.33.....	213		
Figura 5.34.....	213		
Figura 5.35.....	214		
Figura 5.36.....	214		
Figura 5.37.....	215		
Figura 5.38.....	215		
Figura 5.39.....	216		
Figura 5.40.....	216		
Figura 5.41.....	217		
Figura 5.42.....	217		
Figura 5.43.....	218		
Figura 5.44.....	218		
Figura 5.45.....	219		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1.....	101	Tabla 5.1.....	189
Tabla 3.2.....	101	Tabla 5.2.....	199
Tabla 3.3.....	104	Tabla 5.3.....	203
Tabla 3.4.....	107	Tabla 5.4.....	234
Tabla 3.5.....	115	Tabla 5.5.....	235
Tabla 3.6.....	115	Tabla 5.6.....	236
Tabla 3.7.....	116		
		Tabla 6.1.....	250
Tabla 4.1.....	149		
Tabla 4.2.....	159		
Tabla 4.3.....	162		

GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

C_P^{ex}	Capacidad calorífica de exceso
C_P^D	Capacidad calorífica del estado desnaturalizado
C_P^N	Capacidad calorífica del estado nativo
ΔG_I	Energía de acoplamiento
‡	Estado de transición
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ASA	Área accesible al disolvente
C	Concentración de desnaturalizante
$C_{1/2}$	Concentración de desnaturalizante a la que $\Delta G=0$
CD	Dicroísmo circular
D	Estado desnaturalizado de la proteína
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
GdnHCl	Cloruro de guanidinio
GdnSCN	Tiocianato de guanidinio
I	Estado intermedio; Fuerza iónica; Intensidad de fluorescencia
I_∞	Intensidad de fluorescencia en el equilibrio
K	Constante de equilibrio
k	Constante de velocidad aparente
k_D	Constante de velocidad de desplegamiento
k_F	Constante de velocidad de replegamiento
LEM	Método de extrapolación lineal
n	Índice de refracción
N	Estado nativo de la proteína
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
q_i	carga del grupo i
R	Constante de los gases
r	Relación entalpía calorimétrica/entalpía van't Hoff
T	Temperatura (Kelvin, °C)

T_H	Temperatura a la que $\Delta H=0$
T_m, T_m^*	Temperaturas a las que $\Delta G=0$; temperatura a la que la mitad de la hebra de ADN se encuentra como doble hélice
trx WT	Tiorredoxina de <i>E. coli</i> forma silvestre
T_S	Temperatura a la que $\Delta S=0$
W_{ij}	Energía de interacción entre grupos ionizables
W_{q-q}	Energía de interacción total en la proteína nativa
x_i	Fracción de estado i
Z	Función de partición
ΔC_P	Cambio de capacidad calorífica de desnaturalización a presión constante (también $\Delta_N^D C_P$).
$\Delta C_{P,m}$	Cambio de capacidad calorífica de desnaturalización a la T_m
ΔG	Cambio de energía de Gibbs de desnaturalización (también $\Delta_N^D G$)
ΔG_W	Cambio de energía de Gibbs de desnaturalización en disolución acuosa
ΔH	Cambio de entalpía de desnaturalización (también $\Delta_N^D H$)
ΔH_m	Cambio de entalpía de desnaturalización a la T_m
ΔH^{vH}	Cambio de entalpía de van't Hoff
ΔS	Cambio de entropía de desnaturalización (también $\Delta_N^D S$)
ΔI	Amplitud de la cinética
ΔS_m	Cambio de entropía de desnaturalización a la T_m
θ	Elipticidad
τ	Tiempo de relajación
χ	Vector de protonación
ω	Peso estadístico

1. Introducción

Las proteínas, además de ser macromoléculas biológicas con funciones definidas en los seres vivos, poseen múltiples aplicaciones biotecnológicas debido a la gran especificidad con la que pueden desarrollar procesos moleculares. En los últimos años se han desarrollado procedimientos que permiten emplear a las proteínas como catalizadores en procesos industriales, como fármacos tanto terapéuticos como de diagnóstico o como biosensores altamente específicos. El desarrollo de componentes electrónicos a nivel molecular es otro de los campos en los que las proteínas han encontrado aplicación, así como en la industria de la alimentación y en la industria textil.

No obstante, las proteínas en ocasiones no poseen todas las propiedades necesarias para ser empleadas en los procesos anteriormente citados. El mayor inconveniente que poseen es su baja estabilidad. En este sentido bajo determinadas condiciones de pH, elevadas temperaturas, o con la presencia de agentes químicos en el medio se puede alterar considerablemente su estabilidad. Además, muchas proteínas son inestables desde un punto de vista temporal, es decir, pierden su actividad relativamente rápido, días e incluso horas, lo cual no es ventajoso a nivel industrial ya que requeriría tener que renovar continuamente el reactivo. Esto también es un grave inconveniente en el diseño de fármacos, ya que esto supondría un corto periodo de efectividad, también conocido como *shelf-life*. En ocasiones sucede que las proteínas no poseen las condiciones óptimas de actividad y especificidad cuando se emplean en procesos diferentes a los naturales, bien sea por los sustratos empleados, bien sea por la presencia de codisolventes en el medio.

Parece, por tanto, que el desarrollo de procedimientos de diseño de proteínas, mediante técnicas de ingeniería genética, que permitan mejorar tanto su estabilidad como su funcionalidad, es de gran interés y posee una gran aplicabilidad. El desarrollo de procedimientos que nos permitan diseñar proteínas de alta estabilidad es uno de los objetivos fundamentales de la presente tesis.

Son muchas las estrategias propuestas a lo largo de los años para estabilizar proteínas. Algunas de las más utilizadas son: la inmovilización de la proteína en una superficie adecuada; la deshidratación, ya que se disminuye notablemente la movilidad de la proteína o la adición de sustancias estabilizantes, como la sarcosina que puede producir incrementos notables en la estabilidad.

No obstante, en los últimos años, el empleo de la ingeniería genética se ha convertido en la herramienta más ampliamente utilizada y con más posibilidades para estabilizar proteínas (Stearman et al., 1988; Serrano et al., 1992; Cordes et al., 1996; Malakauskas et al., 1998). Básicamente, se trata de introducir una o varias mutaciones que alteren de manera adecuada, los factores que determinan, de manera mayoritaria, la estabilidad y la estructura del estado nativo, que son: el efecto hidrofóbico, los enlaces de hidrógeno, las fuerzas de van der Waals y la entropía conformacional. Estas mutaciones se pueden realizar sobre residuos internos o expuestos al disolvente, no obstante, y debido a que los grupos expuestos al disolvente en la estructura nativa no van a producir grandes alteraciones en la estabilidad al desplegarse la proteína, la introducción de mutaciones en posiciones internas ha sido más ampliamente estudiada.

Además, como veremos seguidamente, se han descrito procedimientos que permiten estabilizar proteínas mediante la optimización de las interacciones carga-carga (Ibarra-Molero et al., 1999, Loladze et al., 1999; Sanchez-Ruiz y Makhatadze, 2001, Ibarra-Molero y Sanchez-Ruiz, 2002). Lo sorprendente de estos procedimientos es que se centran en las interacciones electrostáticas que en comparación con los factores anteriormente mencionados, son minoritarias en la estabilidad de proteínas.

En la presente tesis, se abordan estudios que proporcionan una base para el diseño racional de proteínas y mejora de sus propiedades. En estos estudios también obtendremos información relacionada con el estado desnaturalizado e información de carácter evolutivo.

Estudio de las interacciones electrostáticas

Como se acaba de decir, las interacciones electrostáticas son una contribución minoritaria, si se compara con por ejemplo el efecto hidrofóbico, ya que las primeras son de unos pocos kJ/mol, mientras que la segunda es del orden de cientos de kJ/mol. No obstante, el cambio de energía de Gibbs de desnaturalización, que es la diferencia de energía libre entre el estado desplegado y el estado nativo, es un número pequeño debido a que es un balance entre los efectos fuertemente estabilizantes y los efectos fuertemente desestabilizantes. Así pues, la introducción de mutaciones que modifiquen las interacciones carga-carga puede tener efectos en la energía libre similares al cambio total de ésta, siendo por tanto una estrategia muy razonable para estabilizar proteínas.

La estabilización de proteínas mediante el diseño de las interacciones carga-carga, además de producir mutaciones en posiciones superficiales en la estructura nativa, las cuales provocan menos cambios en la estructura y en la actividad, posee una ventaja realmente importante, y es que utilizando modelos electrostáticos relativamente sencillos, se puede decidir que mutaciones se deben introducir para producir una estabilización. En la presente tesis se ha empleado un procedimiento basado en el modelo simple de Tanford-Kirkwood (1957) y la aproximación de Bashford-Karplus (1991) (Ibarra-Molero et al., 1999; Loladze et al., 1999; Sanchez-Ruiz y Makhatadze 2001). El modelo de Tanford-Kirkwood supone que la proteína es una esfera con una constante dieléctrica mucho menor que la del disolvente en la cual las cargas se sitúan en la superficie de la proteína. Este modelo ha sido ya aplicado con éxito como puede verse en la figura 1.1 (Sanchez-Ruiz y Makhatadze, 2001), en la que se representan, para varias proteínas, los efectos en la temperatura de desnaturalización y el cambio en la energía libre de Gibbs, de mutaciones en residuos cargados, frente a los cambios de energía de Gibbs asociados a las interacciones carga-carga en el estado nativo, calculados teóricamente mediante el procedimiento mencionado. Como puede comprobarse existe una buena correlación entre los valores que se obtienen experimentalmente y los valores calculados. Esto es, mutaciones que optimizan las interacciones carga-carga producen un aumento en la estabilidad que viene dado por un aumento en la temperatura de desnaturalización y en el cambio en la energía de Gibbs de desplegamiento. Además, esta correlación se cumple incluso en el caso en el que la mutación es desestabilizante.

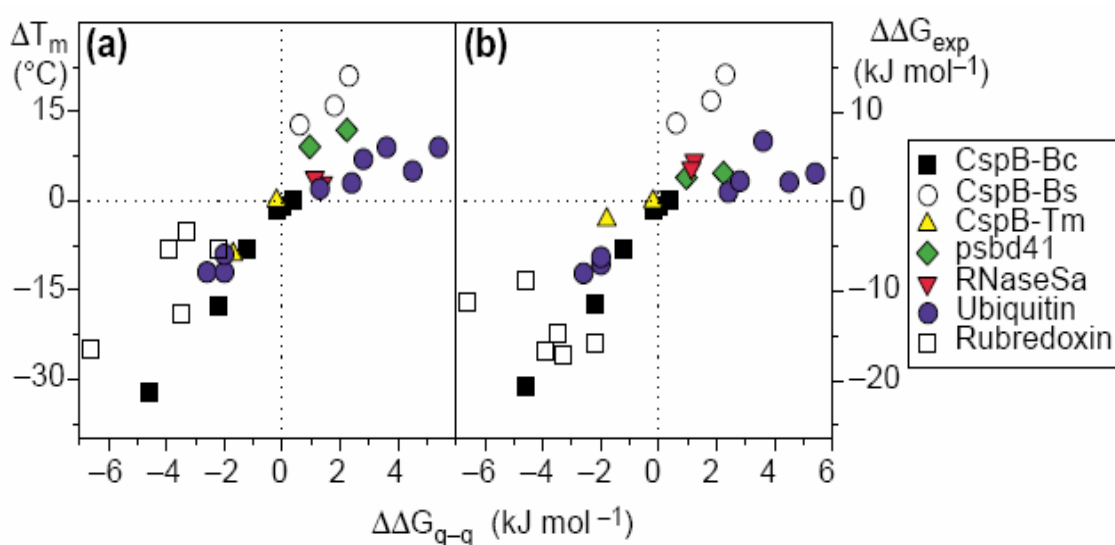


Figura 1.1 Correlación entre cambios en la energía de interacción carga-carga $\Delta\Delta G_{q-q}$ y (a) los cambios en la temperatura de desnaturalización (ΔT_m) o (b) cambios en la energía de Gibbs, $\Delta\Delta G_{exp}$. Los cambios en los parámetros termodinámicos están calculados como la diferencia entre la proteína con las interacciones carga-carga alteradas y la forma silvestre. Los valores de ΔG se calcularon con el procedimiento basado en el modelo de Tanford-Kirkwood (Loladze et al., 1999; Ibarra-Molero et al., 1999). Los datos experimentales para las temperaturas de desnaturalización y los cambios de energía de Gibbs son para CspN-Bc, cuadros sólidos; CspB-Bs, círculos huecos; CspB-Tm, triángulos amarillos; dominio de unión de la subunidad periférica (psbd41), rombos verdes; ribonucleasa Sa, triángulos amarillos; ubiquitina, círculos rojos y rubredoxina, cuadrados huecos (Sanchez-Ruiz y Makhatadze, 2001).

Por tanto, parece que el empleo de procedimientos basados en cálculos electrostáticos sencillos es perfectamente factible a la hora de predecir mutaciones estabilizantes. La estrategia que seguiremos parte de la estructura de la proteína determinada por rayos-X o resonancia magnética nuclear (NMR), la cual se puede extraer del *Protein Data Bank*. A continuación aplicamos un modelo electrostático

simple para determinar para calcular la energía de interacción de cada carga con el resto de las cargas presentes en la estructura en estado nativo de la proteína. A partir de estos cálculos podremos conocer qué residuos, suficientemente expuestos al disolvente, están inmersos en interacciones electrostáticas destabilizantes con cargas de su mismo signo en la proteína. Estos residuos pueden ser mutados para generar interacciones estabilizantes. Si la mutación realizada elimina una carga, es decir se introduce un residuo no cargado, se eliminarán algunas interacciones carga-carga y eso debería producir un aumento de la estabilidad. Si la mutación produce una inversión de carga, la estabilización esperada debería de ser mayor ya que las interacciones destabilizantes se convierten en estabilizantes.

Este procedimiento ha sido experimentalmente demostrado (Ibarra-Molero et al., 1999; Loladze et al., 1999).

De hecho, el aumento de estabilidad mediante la optimización de las interacciones electrostáticas, es algo que la Naturaleza podría estar utilizando para diseñar proteínas termofílicas. Esto lo podemos comprobar realizando un cálculo de las energías de interacción carga-carga de los grupos ionizables en función del número de residuo en la secuencia para tres proteínas *cold-shock* de diferentes bacterias: CspB-Bs mesofílica de *Bacillus subtilis*, CspB-Bc termofílica de *Bacillus caldolyticus* y CspB-Tm hipertermofílica de *Thermotoga maritima* (Sanchez-Ruiz y Makhatadze, 2001). El resultado de este cálculo empleando el procedimiento basado en el modelo de Tanford-Kirkwood se puede ver en las representaciones de barras de la figura 1.2. En estas representaciones, las barras hacia arriba simbolizan interacciones del grupo

predominantemente desestabilizantes, por el contrario, las barras hacia abajo indican interacciones predominantemente estabilizantes. Como puede verse en la figura 1.2 las interacciones carga-carga juegan un papel importante en las diferencias de estabilidad entre estas proteínas. A la vista de la figura 1.2, para el caso de la proteína mesofílica, existe un mayor número de interacciones electrostáticas desestabilizantes que en el caso de las proteínas termofílica e hipertermofílica. Para el caso de la proteína hipertermofílica, parece que su aumento de estabilidad con respecto a la mesofílica y la termofílica se consigue por la eliminación de las interacciones desestabilizantes y la aparición de nuevas interacciones estabilizantes. Uno de los objetivos, dentro de las líneas de investigación de nuestro grupo, es poder imitar a la Naturaleza y rediseñar la distribución superficial de carga.

Más recientemente, y con el propósito de emular a la Naturaleza optimizando las interacciones carga-carga, se ha desarrollado en nuestro grupo un procedimiento basado en algoritmos genéticos, que permite rediseñar toda la distribución superficial de carga (Ibarra-Molero y Sanchez-Ruiz, 2002). Con este procedimiento se generan numerosas distribuciones de carga mediante un procedimiento iterativo, y sujetas a imposiciones, como por ejemplo no modificar los residuos del sitio activo. Finalmente, se puede llegar a varias distribuciones de carga las cuales propondrán las mutaciones necesarias, en términos de introducción o eliminación de cargas.

En la presente tesis y relacionado con las interacciones electrostáticas, abordamos un estudio del efecto de diferentes sales en el apantallamiento de las interacciones carga-carga.

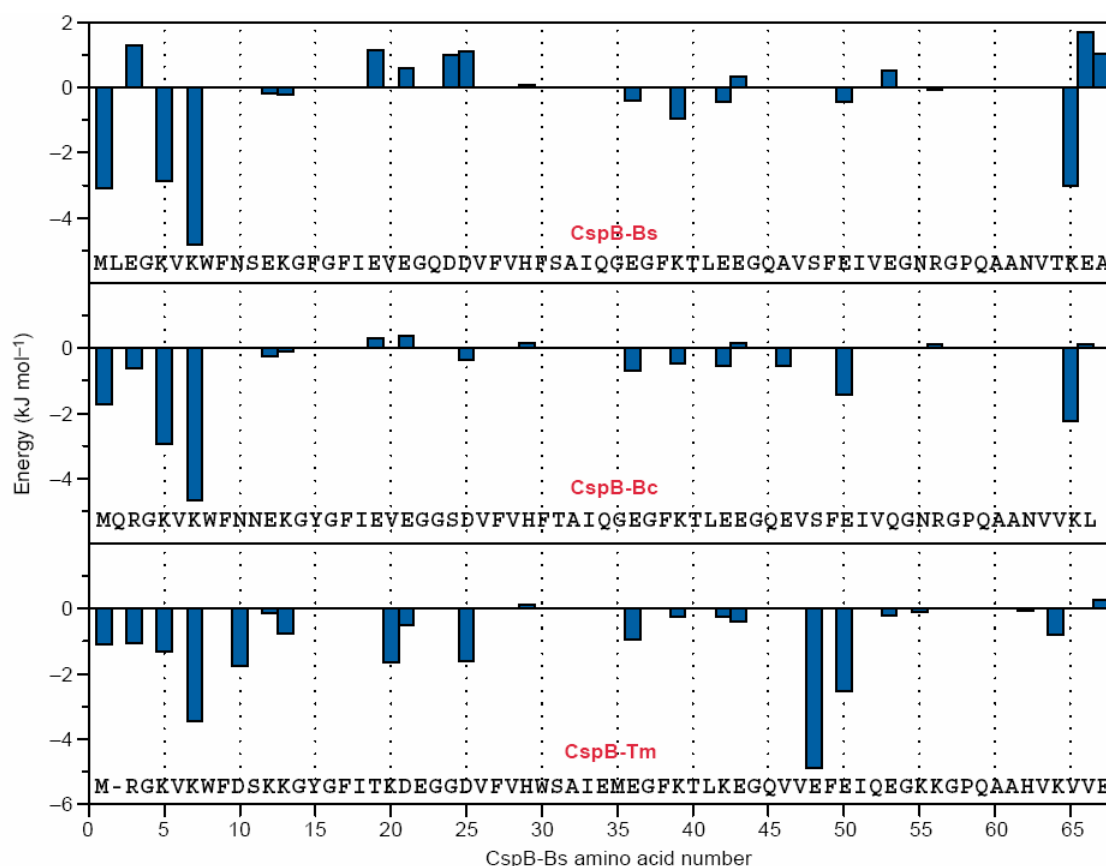


Figura 1.2. Energías de interacción carga-carga para residuos ionizables individuales para tres secuencias diferentes de proteína “cold-shock” (Csp) de bacterias distintas: la mesofílica Csp-Bs (*B. Subtilis*), la termofílica CspB-Bc (*B. Caldolyticus*) y la hipertermofílica CspB-Tm (*T. Maritima*). Las energías positivas implican que las interacciones son desestabilizantes y las energías de signo negativo implican que las interacciones son estabilizantes. La suma de todas las interacciones carga-carga desestabilizantes en CspB-Bs, CspB-Bc y CspB-Tm es 8.7, 1.2 y 0.4 kJ/mol, respectivamente. Como comparación, la suma de todas las interacciones carga-carga estabilizantes en estas tres proteínas es -16.5, -16.6 y -23.9 kJ/mol, respectivamente (Sanchez-Ruiz y Makhatadze, 2001).

Como quiera que las proteínas, tanto *in vivo* como a la hora de llevar a cabo aplicaciones tecnológicas, se encuentran, la mayor parte de las veces, en medios salinos, resulta de gran interés el conocer como pueden afectar a las interacciones

electrostáticas y en suma a la estabilidad, la presencia de sales que interaccionen con las cargas de la proteína. En esta tesis, se han realizado experimentos con sales como cloruro sódico, cloruro de guanidinio y tiocianato de guanidinio con objeto de comprobar la eficiencia en el apantallamiento de las interacciones carga-carga de dichas sales, sugiriendo que dicha eficiencia está correlacionada con el poder desnaturizante de las mismas.

Efectos asociados al estado desnaturizado

Como se ha dicho anteriormente, la estabilidad termodinámica de una proteína se mide como la diferencia entre la energía libre del estado desnaturizado y la energía libre del estado nativo. Así pues, parece lógico incluir en nuestros estudios el estado desnaturizado ya que cualquier factor que afecte a éste va a tener una incidencia directa en la estabilidad de la proteína.

Tradicionalmente se ha considerado al estado desnaturizado como un conjunto de conformaciones más o menos extendidas. No obstante recientes estudios experimentales (Shortle et al., 2001; Klein-Seetharaman et al., 2002) sugieren la existencia de interacciones de largo alcance y procesos cooperativos en estados desnaturizados.

Un estudio realizado con Ribonucleasa de dos organismos diferentes (Guzman-Casado et al., 2003; Robic et al., 2003), uno mesofílico, *E. coli* y otro termofílico, *Thermus thermophilus*, demuestran que existe una alteración drástica de la capacidad

calorífica del estado desnaturalizado en un margen muy estrecho de pH, apenas unas décimas, y que este cambio tiene una incidencia directa en la estabilidad. Esta alteración se atribuye a la formación de un clúster hidrofóbico generado por un cambio en el estado de protonación, lo cual demuestra la importancia de las interacciones electrostáticas en el estado desnaturalizado. Además, se ha demostrado que la existencia de estructura residual en el estado desnaturalizado está relacionada con la mayor temperatura de desnaturalización y menor capacidad calorífica de la proteína del organismo termofílico (lo cual produce valores de cambio de energía libre no muy altos a temperatura ambiente). Asimismo, se sugiere la posibilidad de que los estados desnaturalizados, estén diseñados por la evolución al igual que los estados nativos, de ahí la importancia del estudio del estado desnaturalizado.

Información obtenida del alineamiento de secuencias

Los alineamientos de secuencias se realizan a partir de bases de datos de secuencias que podemos encontrar en Internet. En nuestro caso hemos usado la base de datos SWALL y más recientemente Uniprot/TrEMBL (<http://www.ebi.ac.uk/trembl>).

A partir del alineamiento de secuencias es posible obtener información que podemos relacionar directamente con la estabilidad. Así lo demuestra un reciente estudio realizado por nuestro grupo (Godoy-Ruiz et al., 2004). En este trabajo se realizan estudios experimentales del efecto de mutaciones conservativas en tiorredoxina de *E. coli*. En concreto, se realizan mutaciones de ácidos carboxílicos (Glu a Asp y Asp a Glu) y mutaciones de residuos hidrofóbicos (Val a Ile e Ile a Val). En ambos casos se

trata de mutaciones que no introducen cambios muy drásticos, por lo que cabría esperar que no hubiera un gran efecto en la estructura.

La realización de todas estas mutaciones y posterior determinación de la estabilidad mediante calorimetría diferencial de barrido sugiere la existencia de una correlación entre el efecto de la mutación en la estabilidad y la frecuencia de aparición de los residuos en el alineamiento de secuencias, es decir, el alineamiento de secuencias ofrece información sobre la estabilidad. La figura 1.3 muestra esta correlación. Se deduce, por tanto, que las mutaciones en posiciones altamente conservadas tiene un efecto desestabilizante y esto puede ser debido a que la Naturaleza optimiza el ambiente para cada residuo.

Esto ha permitido a nuestro grupo desarrollar un modelo, para el caso de las mutaciones hidrofóbicas, que describe el efecto de estas mutaciones en la estabilidad de proteínas considerando la optimización evolutiva de los ambientes de los residuos, siendo este el primer modelo que tiene en cuenta esa optimización evolutiva (Godoy-Ruiz et al., 2005 (en prensa)).

Otro de los aspectos importantes que se desprende del análisis del alineamiento de secuencias, es que contiene información acerca del acoplamiento a larga distancia de residuos en el estado nativo y que esto puede tener implicación tanto en la estabilidad como en la estructura y la actividad.

Como veremos, es posible realizar análisis estadísticos de cálculos de covarianza para determinar cuales son las parejas de residuos acopladas. Esta información junto con la información estructural surgida de las estructura de rayos X, depositada en el *Protein Data Bank*, permite obtener cuales de estas parejas además, poseen sus residuos espacialmente alejados.

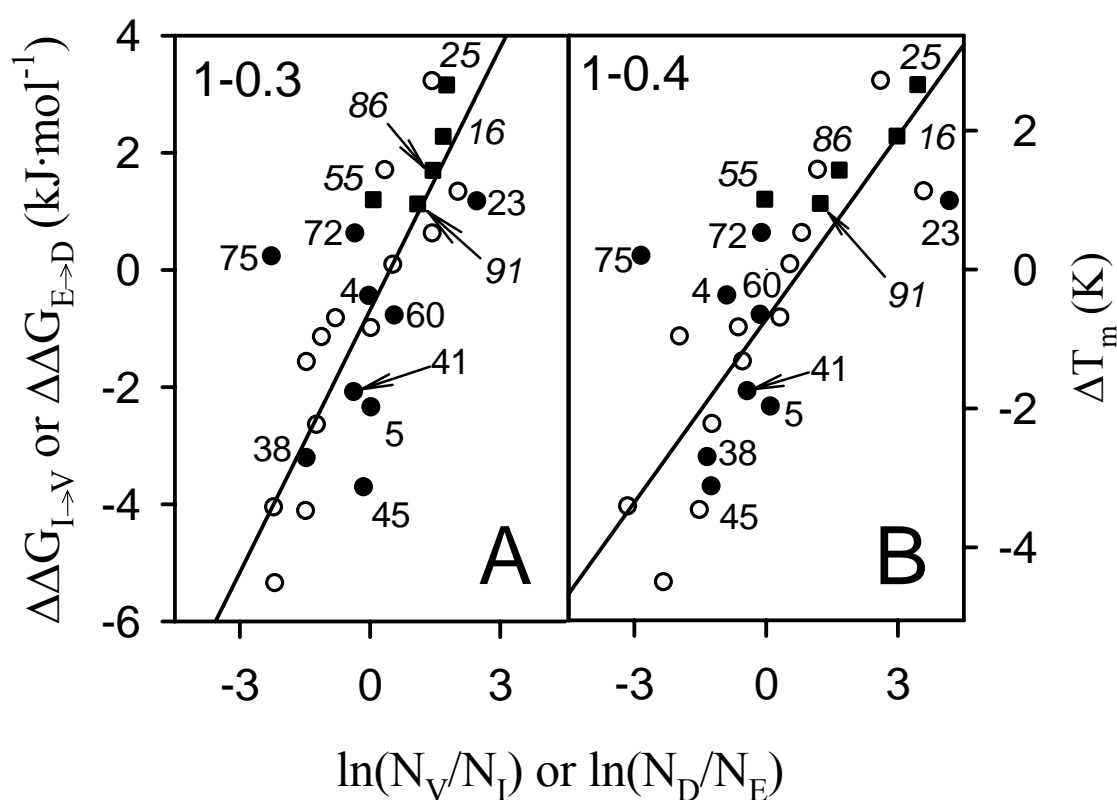


Figura 1.3. Correlación entre el efecto de las mutaciones I a V (símbolos rellenos), D a E (símbolos huecos) en la estabilidad de tiorredoxina y la frecuencia de aparición de I y V y D y E en el alineamiento de secuencias. Los cambios de estabilidad están medidos por el efecto de la mutación en la temperatura de desnaturalización y en el cambio de energía libre. Los números grandes arriba a la izquierda en cada gráfica, indican el intervalo de similaridad usado en el cálculo del número de residuos: N_b , N_v , N_e y N_d .

Si existe o no comunicación a larga distancia, tal y como puede sugerir el alineamiento de secuencias, se puede comprobar mediante la realización del ciclo del doble y triple mutante (Horovitz y Fersht, 1990) de los residuos implicados en el acoplamiento a larga distancia. Veremos como para el caso de tiorredoxina, existen mutaciones correlacionadas a larga distancia y como podemos utilizar estas mutaciones en el diseño de proteínas en base a la estabilidad y la actividad. Así pues, veremos que mutaciones que son fuertemente desestabilizantes producen variantes de tiorredoxina mucho más activas que la forma silvestre, y que es posible recuperar la estabilidad sin perder actividad con respecto a la forma silvestre mediante otras variantes, todas ellas sugeridas por el alineamiento de secuencias

Una de las dudas que surge es si esa interacción a larga distancia afecta al estado desnaturalizado. Se podría considerar posible que algunas mutaciones correlacionadas en el alineamiento de secuencias reflejan efectos en el estado desnaturalizado y por tanto ofrezcan información sobre estructura residual en el este desnaturalizado (Godoy-Ruiz et al., 2004). No obstante, como veremos, esas mutaciones también podrían estar afectando al estado de transición.

Como hemos dicho antes, la información que obtenemos del alineamiento de secuencias, además, puede usarse para generar procedimientos que nos permitan obtener información estructural a partir de la secuencia. Uno de los factores principales en la determinación de contactos entre residuos a partir del alineamiento de secuencias, es la existencia de interacciones a larga distancia, lo cual puede dificultar la derivación de mapas de contacto. Así, propondremos un procedimiento para determinar la relación

entre la estructura y el alineamiento basado en la dependencia del número de residuos acoplados por encima de un umbral de covarianza dado, con la distancia entre residuos que nos permitirá conocer el impacto de las interacciones a larga distancia en la relación entre la estructura de proteínas y el alineamiento de secuencias. Se analizará un conjunto de 24 proteínas obtenidas de la base de datos CATH (Orengo et al., 1997). El empleo de este procedimiento, produce resultados consistentes con un significativo papel del acoplamiento a larga distancia que sugiere que nuestra descripción estadística puede ser una simple pero eficiente herramienta para estudiar la distribución de distancias de mutaciones correlacionadas y las diferencias en las características estructurales reflejadas en el alineamiento de secuencias.

Objetivos

Por tanto, puede concluirse que los estudios recogidos en esta tesis, se relacionan con los siguientes objetivos fundamentales:

- 1) Diseño de proteínas de alta estabilidad mediante la mejora de la distribución superficial de carga.
- 2) Estudio de la eficiencia de diferentes sales en el apantallamiento de las interacciones carga-carga.
- 3) Empleo de la información obtenida del alineamiento de secuencias para el diseño de proteínas de alta estabilidad basándonos en las interacciones a larga distancia, así como su influencia en la actividad.

- 4) Estudio de los efectos en el estado desnaturalizado y estado de transición de las mutaciones sugeridas por los alineamientos de secuencias.
- 5) Desarrollo de descriptores estructurales a partir de los alineamientos de secuencias.

2. Materiales y métodos

2.1 **Materiales.**

2.1.1 **Reactivos.**

A continuación se detallan los reactivos utilizados para todos los experimentos realizados.

De la casa *Difco*, se emplearon extracto de levadura, triptona y agar, todos para la preparación de medios de cultivo, según se describe en “*Molecular Cloning, a laboratory manual*” (Sambrook et al, 1989).

De *Merck*, el cloruro sódico, ácido clorhídrico, ambos usados en diferentes fases experimentales; azida sódica, empleada en el tampón de purificación de proteínas, acetato sódico, usado en la cristalización de proteínas y cloruro cálcico para la preparación de células competentes.

La casa *Sigma* suministró el EDTA (ácido etilendiaminotetrasódico) y Tris HCl, ambos para los tampones de purificación; para electroforesis en geles de poliacrilamida, lauryl sulfato sódico, glicina y *Brilliant Blue G*, sulfato de estreptomicina, empleado para precipitar ácidos nucleicos durante la purificación de tiorredoxina; HEPES para las diálisis; urea, en los experimentos de fluorescencia y tiorredoxina reductasa para los ensayos de actividad.

De la casa *Panreac*, cloruro sódico, ácido clorhídrico, fosfato potásico, hidróxido sódico y glicerol, todos para los medios de cultivo.

Pierce proporcionó el cloruro de guanidinio y el tiocianato de guanidinio, ambos usados en experimentos de calorimetría.

De la marca *Serva*, la acrilamida y la bis-acrilamida para electroforesis.

De la casa *Stratagene*, los reactivos para la mutagénesis dirigida, como la polimerasa *Pfu Turbo*®, la enzima de restricción *DpnI*, las células supercompetentes *XL-1 Blue*®, la mezcla de nucleótidos dNTP y el tampón de reacción. Estos componentes se pueden adquirir por separado o bien en un kit denominado comercialmente, *QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit*.

Qiagen suministró el kit de purificación de ADN, *QIAprep® Spin Miniprep*, necesario para la obtención de éste para su posterior secuenciación.

De *Calbiochem* fueron los reactivos empleados en los ensayos de actividad, como el suero de albúmina bovina (BSA), el NADPH y el DTNB (ácido 5,5' ditio-bis-(2-nitrobenzoico)).

Los reactivos para la cristalización de proteínas fueron suministrados por la casa *Hampton Research*, en forma de kit con numerosas disoluciones que representan

diferentes condiciones de cristalización. Los capilares para la cristalización fueron suministrados por *Jena Biosciences*.

El agua utilizada en todos los experimentos ha sido filtrada por un sistema de resinas de intercambio iónico denominado *Milli-Q* suministrado por la casa *Millipore*.

Por último citar otros materiales, como membranas de diálisis, suministradas por *Spectrum*, filtros de diferentes tamaños y con diámetros de poro de 0.22 y 0.45 μm , de las casas *Pall*, *Millipore* y *Whatman*, concentradores de diferentes volúmenes, suministrados por *Pall* y *Millipore*.

2.1.2 Instrumentación

Los instrumentos empleados en los experimentos se detallan a continuación.

Todos los materiales y reactivos en contacto directo con las células deben estar autoclavados, lo cual se hace con un autoclave de la casa *Selecta* modelo *Autester-E*.

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se empleó un termociclador marca *TECHNE Progene*.

Durante la purificación de las proteínas se empleó una prensa *French*, de la casa *Aminco*, para romper las paredes celulares; centrifugas, *Kokusan H251* y *Hettich Roto Super 40*, hasta 8000 r.p.m y *Beckman LE-80K* para más de 20000 r.p.m que en esta

etapa sirven para eliminar residuos celulares sólidos. Una columna de exclusión molecular de la casa *Pharmacia* modelo XK50, con resina de la misma casa *Sephacryl* S100; otra columna de intercambio iónico de la marca *Biorad*, de 250 ml de volumen, con resina *Fractogel EMD DEAE-650*, de la casa Merck. En el caso de la columna de exclusión molecular, se empleó como sistema de inyección un dispositivo HPLC de la marca KONIC modelo 500-A, que en la última etapa de la experimentación fue sustituido por una bomba peristáltica suministrada por la casa *Gilson*, modelo Minipuls 3. Para la columna de intercambio iónico se empleó como sistema de inyección una bomba *LKB* modelo 2132 *Microperpex*. En ambos casos se usó como sistema de detección un dispositivo equipado con una lámpara UV, *Pharmacia LKB-Control Unit UV-1*, como sistema de registro un registrador *LLOYD Graphic 450* y como sistema de recolección un colector de fracciones de la casa *Pharmacia* modelo FRAC 100.

La medida de la concentración de las proteínas se realizó mediante espectrofotometría. En concreto se usaron dos espectrofotómetros, *Beckman DU-70* y *Perkin Elmer Lambda 25*. Además las medidas de actividad de las proteínas también se realizaron usando el espectrofotómetro.

Para las medidas de pH se utilizaron electrodos combinados de vidrio *Crison* modelos 52-03, para volúmenes grandes y 52-09 para volúmenes pequeños. Estos electrodos estaban conectados a un pHmetro *Crison* modelo 501, de sensibilidad 0.01 unidades. La calibración del instrumento se hace usando disoluciones patrón de pH 7.01 y 4.00, también de *Crison*.

Los experimentos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) se realizaron con un calorímetro de la casa *Microcal* modelo VP-DSC.

El dicroísmo circular (CD) se realizó con un espectropolarímetro *Jasco*, modelo J-715 equipado con un control de temperatura *Jasco*, PTC-348WI.

La realización de los experimentos de fluorescencia se hizo con un fluorímetro *Perkin Elmer* modelo LS55, junto a un baño termostatzado a 25 °C de la marca *Selecta* modelo *Ultraterm 6000383*.

Se empleó un refractómetro de mano *ATAGO* modelo R5000, para medir la concentración de urea. La urea se purifica mediante una resina de intercambio iónico AG501-X8 de *Biorad*. Este refractómetro se utilizó también para las medidas de concentración del cloruro de guanidinio.

Para el procesamiento de datos se utilizaron computadores equipados con procesadores *Pentium IV*, y los programas comerciales utilizados fueron *Sigmaplot 2000*, *MLAB* y *Matlab*, los cuales se emplean para el tratamiento de datos experimentales.

2.2 Métodos

2.2.1 Obtención de ADN de proteínas mutantes.

2.2.1.1 Procedimiento general.

El empleo de la ingeniería genética para la obtención de proteínas mutantes en estudios de estructura y estabilidad de proteínas, está ampliamente extendido. El procedimiento, por el cual se puede producir la mutación de uno o varios aminoácidos en una proteína a partir del ADN, recibe el nombre de mutagénesis dirigida y para producir esa mutación es necesario partir del plásmido que contiene el gen que codifica la proteína en cuestión. El plásmido del que partimos, y que contiene el gen que codifica para tiorredoxina se denomina pTk100, y es un derivado de puC18. A continuación se detalla tanto la secuencia de bases nitrogenadas del mencionado gen para tiorredoxina forma silvestre (también llamada WT, de las siglas en inglés *Wild Type*), así como la secuencia de aminoácidos a la que da lugar:

Secuencia de bases nitrogenadas del gen de tiorredoxina en dirección 5'-3':

```
Atgagcgataaaattattcacctgactgacgacagtttgacacggatgtactcaaagcggacggggcgatcctcgatttctgg  
gcagagtgggtgcggtccgtgcaaaatgatcgccccgattctggatgaaatcgctgacgaatatcagggcaaactgaccgttc  
aaaactgaacatcgatcaaaacctggcactgcgccgaaatatggcatccgtggatcccgactctgctgctgttcaaaaacgg  
tgaagtggcggcaaccaaagtgggtgactgtctaaaggtcagttgaaagagttcctcgacgctaacctggcg
```

Secuencia de aminoácidos para tiorredoxina WT:

SDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLT
VAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSCKGQLKEFLDANLA

En el procedimiento se utiliza ADN de doble cadena, denominado parental, junto a dos oligos o fragmentos de ADN, en los que se ha introducido la mutación deseada, uno que hibrida con la cadena codificante y otro con la cadena molde, y que se diseñan siguiendo unas reglas que veremos en la sección siguiente. Los oligos son complementarios a la doble cadena de ADN, excepto en el lugar donde está la mutación, por lo que se unirán a la cadena y serán extendidos por la acción de una enzima polimerasa mediante una reacción que se denomina comúnmente PCR (de las siglas en inglés *Polimerase Chain Reaction*) y mediante la cual se puede obtener un gran número de copias del gen en el que se ha producido la mutación. Este procedimiento fue descrito por Kary B. Mullis, el cual recibió por ello el Premio Nobel en 1993. La PCR propiamente dicha, consiste fundamentalmente en 3 etapas:

- 1) **Desnaturalización:** Durante la desnaturalización a 95 °C, la doble cadena de ADN se abre para originar dos cadenas simples.
- 2) **Unión de los oligos:** Los oligos se unen a las cadenas simples de ADN parental. Esto ocurre a temperaturas entre 50-60 °C
- 3) **Extensión:** La polimerasa produce la extensión de la cadena a la temperatura de 72 °C.

Un esquema se representa en la figura 2.1.

Una vez finalizado el proceso, tendremos unido al ADN parental una cadena que diferirá únicamente en el codón nuevo introducido para producir la mutación. Este producto es tratado con una enzima de restricción, la cual reconoce ADN metilado y hemimetilado y lo elimina mediante un proceso de digestión. El ADN aislado a partir de bacterias *Escherichia coli dam*⁺ siempre está metilado, como es el caso del ADN parental del que partimos, mientras que el que se sintetiza en el termociclador no está metilado. Una vez obtenido el plásmido con la mutación deseada, hay que amplificarlo, es decir, obtener una mayor cantidad. Esto se hace introduciendo el nuevo plásmido, mediante un proceso de transformación, en las células supercompetentes, que son células que tienen una gran capacidad para absorber el plásmido a través de su pared celular, cultivadas en medio NZY⁺ (Sambrook et al, 1989). Es importante hacer notar que los mutantes se han obtenido de forma individual, es decir, los mutantes simples se obtienen a partir del plásmido silvestre y los mutantes dobles a partir de simples y así sucesivamente.

El último paso para la obtención del ADN de proteínas mutantes es secuenciar el ADN obtenido. De esta forma conoceremos si efectivamente la mutagénesis dirigida ha tenido éxito. Para ello primero se hace necesario obtener el ADN, lo cual se hace mediante el kit de purificación de ADN mencionado en la sección de reactivos. Una vez obtenido, todas las muestras se enviaron al servicio de secuenciación *Sistemas Genómicos* en Valencia, (www.sistemasgenomicos.com).

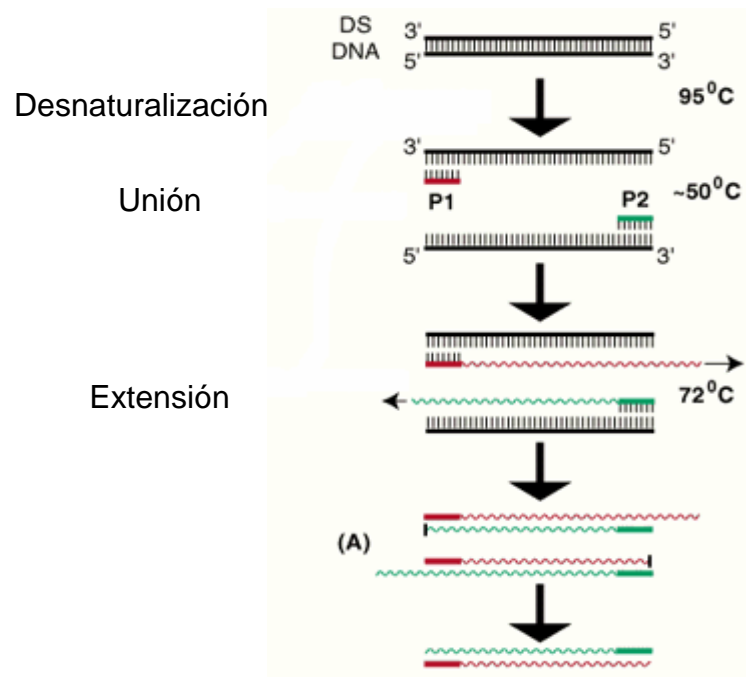


Figura 2.1 Esquema de la PCR mostrando las etapas fundamentales, desnaturalización del plásmido, unión de los oligos y extensión de la polimerasa (ver texto).

2.2.1.2 Diseño de oligos

Para el diseño de los oligos con la mutación deseada, se deben seguir una serie de recomendaciones:

1. Los dos oligos deben contener la mutación deseada, en forma de codón, y deben de ser complementarios e invertidos.
2. Los oligos deben contener entre 25 y 45 bases, y la temperatura de fusión del oligo (T_m), que es la temperatura a la que la mitad de la cadena se encuentra como doble hélice, debe ser mayor o igual a 78°C . El cálculo de T_m se realiza de acuerdo con la expresión:

$$T_m = 81.5 + 0.41 \cdot (\%GC) - 675/N - \% \text{ mismatch} \quad (2.1)$$

donde N es la longitud del oligo en bases. El “mismatch”, es el tanto por cien de modificaciones que hacemos sobre la secuencia de partida.

3. La mutación deseada debe estar aproximadamente en el centro del oligo para asegurar la unión de los extremos del oligo por igual.
4. El contenido en GC debe de ser como mínimo del 40 %, y debe de terminar en una o varias G o C, ya que estas bases forman tres enlaces de hidrógeno en lugar de dos como T y A.
5. El método de purificación de los oligos debe de ser FPLC (*Fast Polynucleotide Liquid Chromatography*).

2.2.2 Expresión y purificación de tiorredoxina, forma silvestre y formas mutantes.

La obtención de proteína tiorredoxina es un proceso que requiere numerosas etapas. El producto de partida es el ADN que contiene el gen que codifica para dicha proteína. En el caso de la forma silvestre, como se ha dicho antes, es el plásmido pTk100. Para las formas mutantes, hay que obtener primero el plásmido con el codón correspondiente al aminoácido introducido, lo cual se realiza mediante mutagénesis dirigida según se describe en la sección anterior, 2.2.1.

Para obtener proteínas a partir de una secuencia de ADN, empleamos un organismo vivo con las enzimas necesarias para la producción de esta proteína. El

organismo vivo del que partimos es una variante de *Escherichia coli* denominada JF521, y tiene la particularidad de producir de forma abundante esta proteína sin necesidad de inducir el proceso con agentes químicos tales como IPTG (Isopropiltiogalactopiranosido). La obtención de tiorredoxina, bien forma silvestre, bien alguna de las formas mutantes, se realiza en una serie de etapas que se resumen de la siguiente forma:

- **Obtención de células competentes**

Antes de introducir el plásmido, es necesario que las células JF521 sean competentes, esto es, que tengan la capacidad de absorber a través de su pared celular el plásmido. El procedimiento utilizado para hacer competentes las células es el tratamiento en CaCl_2 , el cual produce la apertura de los poros de la pared celular. (Sambrook et al, 1989).

- **Transformación**

La introducción del plásmido se efectúa mediante un proceso denominado transformación. La transformación consiste en un pulso de calor de 45 segundos a 42 °C en un baño. Esto produce la apertura de los poros de la pared celular. Después se pone el tubo en hielo durante dos minutos y la pared celular volverá a contraerse. El plásmido se pone directamente en un tubo Falcon 2059 donde se encuentran las células competentes suspendidas en CaCl_2 . La concentración del plásmido debe ser aproximadamente de 150 ng/ μL .

- **Crecimiento, prensado y eliminación de ácidos nucleicos**

El crecimiento de las células se hace en dos etapas: un preinóculo en medio LB (Sambrook et al., 1989) y posteriormente 6 matraces de 750 mL también de LB, siempre empleando como antibiótico para seleccionar kanamicina a una concentración de 40 µg/mL. El crecimiento se produce durante toda una noche. Es al día siguiente cuando las células se centrifugan, se resuspenden en tampón TE (la elaboración del tampón SE TE muestra en Sambrook et al, 1989) y se prensan con ayuda de la prensa French. Una vez eliminados los residuos sólidos, se precipitan los ácidos nucleicos con sulfato de estreptomicina, el cual se vierte gota a gota a 4°C en agitación y muy lentamente para evitar la formación de precipitados de gran tamaño que puedan atrapar en su interior a la proteína. Este proceso se realiza durante la noche.

- **Cromatografía de exclusión molecular**

El siguiente paso es la cromatografía de exclusión molecular. Esta cromatografía se basa en la separación de proteínas debido a su diferente tamaño, mediante un gel formado de pequeñísimas partículas, ya que cada proteína va a viajar de forma diferente a través del entramado que forma el gel en el interior de una columna. El montaje se completa con otros dispositivos mencionados en la sección de instrumentación.

El reconocimiento de la proteína se hace mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Tenemos que introducir muestras de todos los picos junto con un patrón de tiorredoxina, que nos indicará qué banda corresponde a nuestra proteína y podremos

conocer qué fracciones corresponden a ese pico. Un ejemplo representativo del resultado de la electroforesis lo podemos ver en la figura 2.2

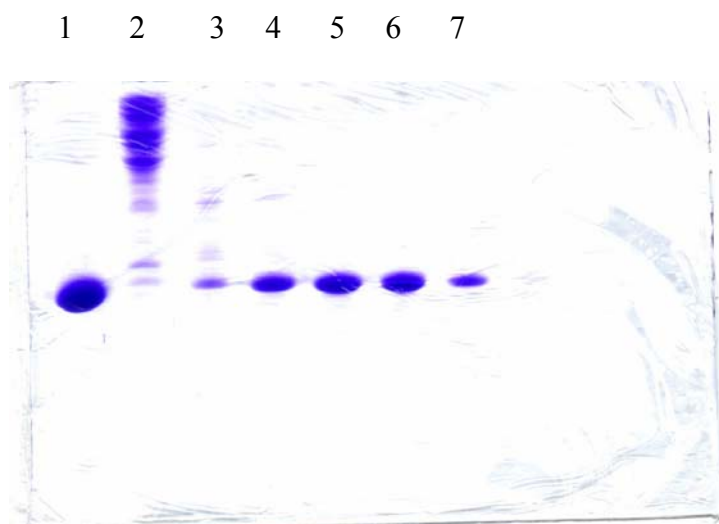


Figura 2.2. Gel de poliacrilamida de tiorredoxina forma silvestre. Electroforesis realizada después de la cromatografía de exclusión molecular. La calle número 1 corresponde al patrón, las calles 4 a 7 corresponden al pico de tiorredoxina del cromatograma.

- **Cromatografía de intercambio iónico**

Una vez conocidas las fracciones que conforman el pico de la proteína deseada se retiran estas fracciones y de nuevo se someten a un proceso de cromatografía, pero esta vez de intercambio iónico. En la cromatografía de intercambio iónico las proteínas interaccionan de forma electrostática con la resina, de forma que, algunas de ellas quedarán unidas a la misma. Sólo la presencia de un agente salino que interaccione más fuertemente con la resina, las desplazará. La elución de la proteína se hace mediante un gradiente de 0-0.5 M de NaCl, con un dispositivo de vasos comunicantes que conecte un vaso con tampón TE, con un vaso con tampón TE 0.5 M NaCl. Habrá una determinada concentración de sal la cual hará que la proteína se desprege, y ésta no será la misma para todas las posibles proteínas que haya. El resto de dispositivos a la

salida de la columna son iguales que en el caso de la exclusión molecular. En esta purificación se van a obtener pocos picos y de muy diferente altura. El pico correspondiente a la proteína está claramente diferenciado porque ya la exclusión molecular tiene una gran eficiencia y la proteína entra bastante pura en la columna de intercambio iónico, si bien, siempre se hace necesaria la electroforesis para confirmar el éxito del proceso.

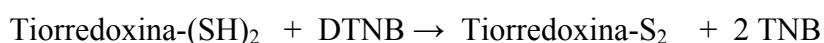
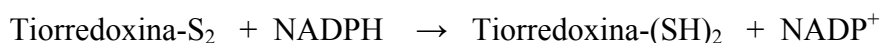
- Diálisis de la proteína

Después de la cromatografía de intercambio iónico, la proteína está casi lista para poder ser utilizada. El último paso es la diálisis exhaustiva. Básicamente, se trata de equilibrar la proteína con el tampón en el que se vayan a realizar los experimentos. El tampón en el que se realiza la diálisis es HEPES 5 mM pH 7 preparado a partir de las formas ácida y básica. En la diálisis se utiliza una membrana de celulosa natural con un tamaño de poro de 6000-8000 ya que el peso molecular de la proteína tiorredoxina es de unos 11700 g/mol. Se pone la disolución de proteína (unos pocos mililitros) salida de la columna de intercambio iónico, en el interior de la membrana de diálisis. El conjunto se pone dentro del búfer en el que queremos tener finalmente la proteína. El volumen de búfer que se suele utilizar es de 500 mL, y se hacen tres cambios de 8 horas cada uno. Para el caso de los experimentos de cristalización de proteínas, la diálisis se hace en tampón acetato sódico 15 mM pH 3.5. El pH se ajusta con ácido clorhídrico concentrado.

2.2.3 Ensayos de actividad.

2.2.3.1 Generalidades.

Tiorredoxina contiene un puente disulfuro en su centro activo entre las cisteínas en posición 32 y 35, el cual puede ser reducido con NADPH en una reacción catalizada por la flavoproteína tiorredoxina reductasa, pudiendo ser reoxidada según las reacciones:



Este ensayo con DTNB (Slaby y Holgrem, 1979), que actúa como aceptor de electrones, permite determinar la actividad enzimática debido a la paulatina aparición de TNB el cual absorbe a 412 nm.

La actividad se define como el número de micromoles de NADPH oxidados por minuto y por miligramo de proteína. Como quiera que la relación estequiométrica entre el NADPH consumido y el TNB formado es 1:2, puede seguirse la formación de TNB, espectrofotométricamente, teniendo en cuenta que el coeficiente de extinción molar para TNB es $13.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Los ensayos de actividad nos permiten verificar si el efecto de las mutaciones realizadas tiene incidencia sobre la actividad de la enzima.

2.2.3.2 Realización del experimento.

En dos cubetas de 1 cm de paso de luz se pone 50 μL de 1.0 M Tris-HCl, pH 8.0, 10 μL de 0.2 M EDTA pH 7.5, 20 μL de 0.01 M DTNB en etanol absoluto, 10 μL de suero de albúmina bovina a 5.0 mg/mL. En ambas cubetas se pone 20 μL de tiorredoxina reductasa 1 μM . Una de las cubetas sirve como blanco y en la otra se pone tiorredoxina, comenzando la reacción que es seguida espectrofotométricamente a 412 nm durante unos 5 minutos. El experimento se hace a 37°C para lo cual se termostatan los reactivos, la muestra y el propio espectrofotómetro.

La actividad se calcula como sigue:

$$(\Delta\text{Abs}_{412}/\text{min}) \times \text{Volumen en ml} / (13.6 \times 2) = \text{Actividad en } \mu\text{mol NADPH}.$$

$\Delta\text{Abs}_{412}/\text{min}$, es la pendiente de la recta de absorbancia frente a tiempo, esta pendiente se puede determinar con el propio programa del espectrofotómetro.

Para considerar el efecto de la concentración de tiorredoxina, se realizaron experimentos empleando diferentes cantidades de proteína, desde 0.001 mg hasta 0.005 mg. La representación de la actividad frente a los mgs de proteína, da una recta de cuya pendiente se obtiene la actividad por mg de proteína.

2.2.4 Preparación de disoluciones concentradas de desnaturizante

En todo el proceso experimental se utilizan diferentes agentes desnaturizantes, como el cloruro de guanidinio, el tiocianato de guanidinio y la urea. A continuación detallaremos la preparación de disoluciones concentradas de los mismos.

2.2.4.1 Preparación de disoluciones concentradas de cloruro de guanidinio y de tiocianato de guanidinio.

Tanto para el cloruro de guanidinio como para el tiocianato de guanidinio el procedimiento es el mismo. En ambos casos lo que se pretende preparar es una disolución 5 mM HEPES y la concentración deseada de desnaturizante a pH 7. Para preparar el HEPES se parte de sus formas ácida y básica. Se pesa la cantidad deseada de ambas formas y junto con ellas la cantidad deseada de desnaturizante, luego para cada caso se enrasa al volumen deseado con agua Milli-Q. La disolución a pH 7 se prepara mezclando ambas formas. Posteriormente se filtra con un filtro de 0.45 μm . Para el caso del cloruro de guanidinio, la concentración se determina de forma exacta mediante medidas del índice de refracción (Pace et al., 1989). La diferencia entre el índice de refracción de la disolución de cloruro de guanidinio y el correspondiente al tampón acuoso, que en este caso es el mismo que el del agua, $\Delta n = n_{GdnHCl} - n_{tampón}$, nos dará Δn que está relacionado con la concentración de cloruro de guanidinio (en mol/l) por la siguiente expresión (Nozaki, 1972):

$$[GdnHCl] = 57.147 \cdot \Delta n + 38.68 \cdot (\Delta n)^2 - 91.60 \cdot (\Delta n)^3 \quad (2.2)$$

Todas las medidas se realizaron a temperatura ambiente.

Para el caso del tiocianato de guanidinio la concentración se determinó por pesada directa.

2.2.4.2 Preparación de disoluciones concentradas de urea.

La preparación de disoluciones de urea requiere ciertas precauciones, ya que ésta descompone lentamente originando iones amonio y cianato (Hagel et al., 1971). Los iones cianato pueden interaccionar con los grupos amino de la proteína (Stark, 1965). Para dicha preparación, en primer lugar pesamos la cantidad de urea necesaria, y disolvemos en agua Milli-Q hasta el volumen deseado. La solubilidad de la urea a 25 °C es 10.5 M, por ello, para facilitar la disolución se puede calentar ligeramente sin que en ningún caso se superen los 30 °C ya que facilitaríamos la descomposición. Cuando se ha conseguido disolver toda la urea, se pasa la disolución por una resina de intercambio iónico como se mencionó en el apartado 2.1.2.

Hasta ahora lo que tenemos es la disolución de urea sin tampón. En este caso también las condiciones finales son HEPES 5 mM y la concentración de urea deseada, a pH 7. Seguidamente preparamos una pequeña cantidad de tampón HEPES 200 mM a pH 7 a partir de las formas ácida y básica. De este tampón, se pone la cantidad necesaria en la disolución de urea para que la concentración final sea 5 mM. Después se mide el pH para confirmar que no hay cambios significativos si bien, la presencia de

desnaturalizantes influye en las medidas de pH (Acevedo et al., 2002). En esta caso, al igual que antes, también se filtra la disolución resultante con un filtro de 0.45 μm .

Para determinar la concentración exacta de las disoluciones de urea se utiliza también la medida del índice de refracción, n . De la misma manera que en el caso anterior, la diferencia entre el índice de refracción de la disolución de urea y el tampón acuoso en el que se disuelve, $\Delta n = n_{urea} - n_{tampón}$, nos dará un Δn el cual está relacionado con la concentración de urea mediante la expresión (Warren et al., 1966):

$$[urea] = 117.66 \cdot \Delta n + 29.753 \cdot (\Delta n)^2 + 185.568 \cdot (\Delta n)^3 \quad (2.3)$$

2.2.5 Calorimetría Diferencial de Barrido

2.2.5.1 Descripción

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica muy útil para la caracterización de cambios conformacionales producidos por la temperatura en proteínas y otras macromoléculas biológicas. De hecho, los estudios por DSC de la desnaturalización térmica de proteínas han tenido un papel muy importante en el desarrollo de los puntos de vista actuales sobre los factores que determinan la estabilidad de proteínas (Privalov, 1979, 1982 y 1989; Mateo, 1984; Sturtevant, 1987; Sanchez-Ruiz y Mateo, 1987, Freire et al., 1990; Freire 1995; Sanchez-Ruiz, 1995).

Un calorímetro diferencial de barrido tiene dos células, una de referencia y otra para la muestra. En la célula de referencia se sitúa la disolución tampón y en la célula de muestra, el mismo tampón o proteína diluida en el tampón en cuestión, según el barrido que se esté realizando. Podemos ver un esquema detallado de un calorímetro en la figura 2.3 (Plotnikov et al., 1997). Las dos células se calientan simultáneamente a una velocidad de calentamiento constante, siendo la señal de salida del aparato proporcional a la diferencia de capacidad calorífica entre las dos células. Un perfil típico de DSC está representado en la figura 2.4. Para una proteína se puede ver normalmente un pico o transición que se asocia con la desnaturalización de la misma. Si el desplegamiento de la proteína es complejo ese pico puede producirse por el solapamiento de varias componentes e incluso pueden llegar a aparecer varios picos claramente diferenciados. En la figura 2.4 también está representada la línea base instrumental que se obtiene en un barrido de DSC cuando, tanto la célula de referencia como la de la muestra, están llenas con tampón. Esta línea base se suele restar a los barridos donde se ha puesto proteína en la célula de la muestra para corregir las posibles distorsiones instrumentales. En la mayoría de los casos esta sustracción da como resultado valores negativos, lo que quiere decir que la capacidad calorífica de la referencia es mayor que la de la muestra como consecuencia del menor contenido de agua de esta última por el hecho de contener proteína.

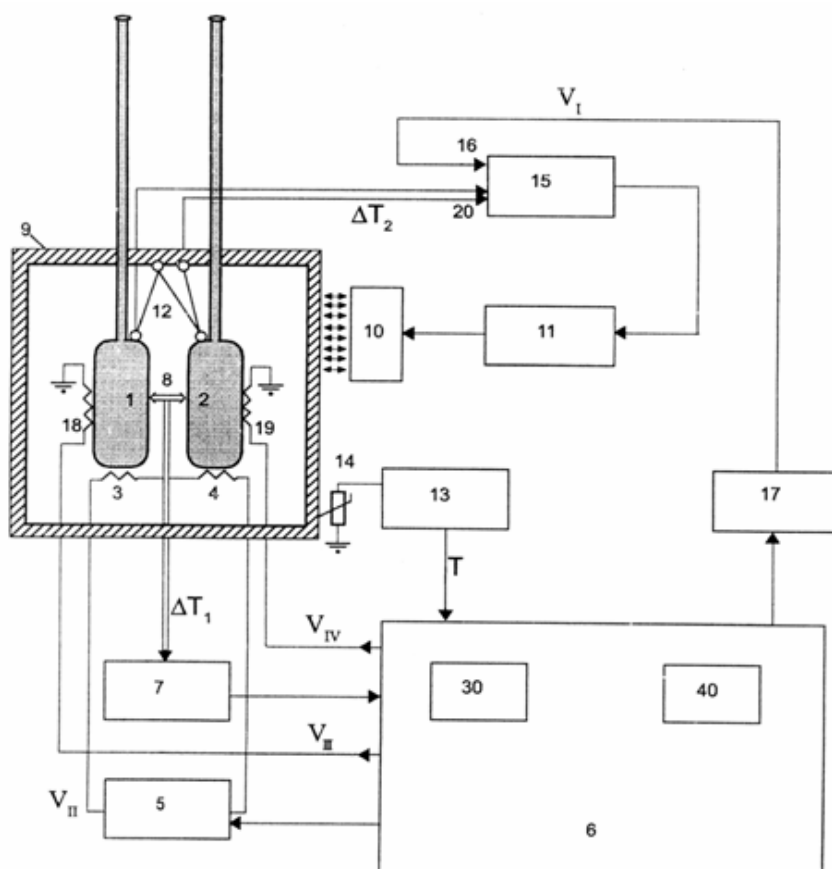


Figura 2.3. Representación esquemática del calorímetro diferencial de barrido VP-DSC: (1,2) Células de muestra y referencia con los tubos capilares de entrada para el llenado y limpieza; (3,4) calentadores principales situados sobre las células, controlados por el voltaje V_{II} de la fuente de alimentación (5). Ésta a su vez está conectada al computador (6) a través de una tarjeta conversora analógico/digital (A/D) (30), (18,19) elementos auxiliares de calentamiento, activados a través de la tarjeta A/D (30), utilizados en la calibración y en el modo de retroalimentación; dispositivo de medida del efecto térmico (7) y sensor de cristal (8) para medir la diferencia de temperatura ΔT_1 entre las dos células. Rodeando a las dos células se encuentra una coraza (9) con dispositivos de calentamiento/enfriamiento (10) dirigidos por un controlador (11), que responde a una señal que procede de un sistema de amplificación (15). El amplificador recibe, a su vez, una señal entrante en un terminal (20) procedente del sensor (12) que mide la diferencia de temperatura ΔT_2 entre las células y la coraza. El otro terminal (16) recibe un voltaje V_I de la fuente de alimentación (17), controlada por el computador a través de la tarjeta A/D (30). La coraza tiene además un dispositivo (13) para la medida de temperaturas absolutas activado mediante un sensor (14) dispuesto en la coraza térmica, de manera que la señal que sale de él pasa por el computador a través de la tarjeta A/D (30). Las señales calibradas de entrada al computador (que corresponden a ΔT_1 y ΔT_2), así como la temperatura absoluta T son seguidas continuamente durante el experimento y almacenadas en la memoria del computador (40) a intervalos señalados por el operador.

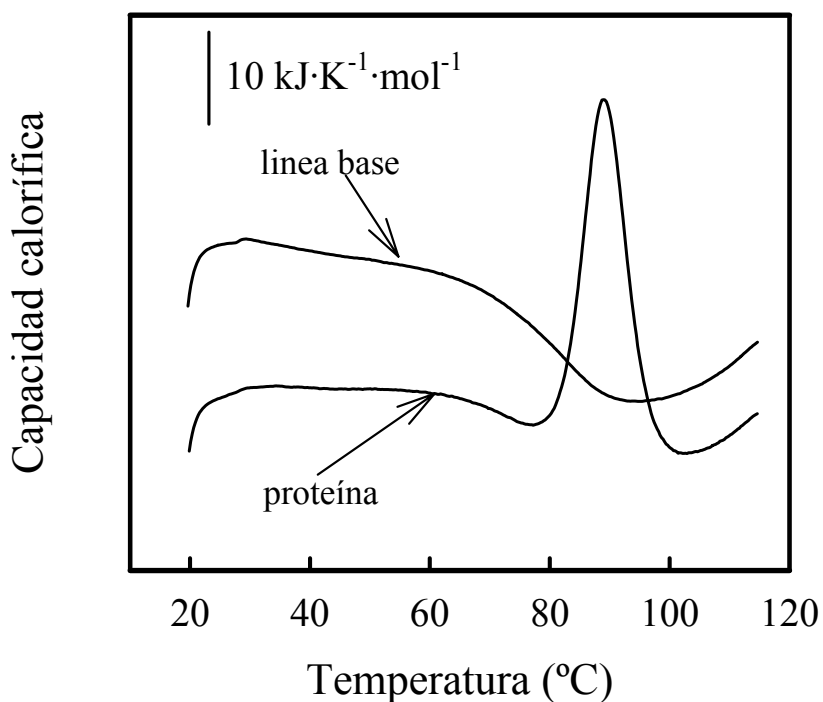


Figura 2.4. Perfiles de DSC. Se representa el termograma de una proteína y la línea base instrumental.

El análisis de los experimentos de DSC según la termodinámica de equilibrio permite, en principio, obtener:

- La capacidad calorífica molar parcial de una proteína.
- El conjunto de parámetros termodinámicos asociados a la transición o transiciones inducidas por temperatura: cambio de entalpía (ΔH), cambio de entropía (ΔS) y cambio de capacidad calorífica (ΔC_p).
- La función de partición de la proteína en función de la temperatura y consecuentemente la población de estados intermedios y sus parámetros termodinámicos.

2.2.5.2 El experimento de calorimetría diferencial de barrido.

El primer paso para realizar un experimento calorimétrico es preparar la muestra. Para ello la proteína se dializa frente al tampón correspondiente como se ha indicado en el apartado 2.2.2. Una vez dializada la muestra, se filtra y se mide la concentración. Es importante conservar el tampón de diálisis para utilizarlo como referencia. Debido a que las dos células del calorímetro no son exactamente iguales, es necesario registrar barridos con tampón en ambas células para después sustraerlos del barrido realizado con proteína, eliminando así los efectos instrumentales. Además suele suceder que, las primeras líneas base instrumentales no son completamente reproducibles y para obtener resultados óptimos es preciso hacer varios barridos hasta alcanzar la completa reproducibilidad. Por lo tanto, para realizar la experiencia primero se rellenan las dos células con el tampón sobrante después de dializar la proteína (equilibrado con la disolución de proteína) y se realizan barridos consecutivos hasta que se aprecie reproducibilidad de los perfiles. En todos los casos la velocidad de barrido fue de 1.5 K/min.

Para hacer el barrido de la muestra, sólo es necesario extraer el tampón de diálisis de la célula de muestra tras los barridos sucesivos y poner la muestra. Las únicas precauciones que deben tenerse en cuenta son: rellenar rápidamente cuando el calorímetro está enfriando y se encuentra a una temperatura lo más cercana posible a la ambiente, para no romper el ciclo térmico del calorímetro, así como eliminar cualquier burbuja que se hubiera podido introducir durante el proceso con ayuda de la jeringa.

Una vez realizado el primer barrido a la muestra es necesario realizar un segundo barrido, ya que para poder aplicar la termodinámica de equilibrio el proceso tiene que ser reversible térmicamente. Por esta razón, en todos los casos se hicieron segundos barridos con la muestra dentro del calorímetro.

En nuestro caso, además, se realizaron experimentos en presencia de codisolvente, cloruro de guanidinio, tiocianato de guanidinio o cloruro sódico. El experimento se realiza de la misma forma si bien es necesario preparar disoluciones de cloruro de guanidinio en la forma descrita en el apartado 2.2.4.1.

Es importante realizar experimentos a varias concentraciones de proteína, para comprobar que no existe efecto de concentración en la temperatura de desnaturalización (Ladbury et al., 1993). En nuestro caso, se hicieron experimentos para tiorredoxina y formas mutantes, en el rango de concentración 0.1-0.5 mg/mL, no detectándose efectos en la temperatura de desnaturalización.

2.2.5.3 Análisis de los datos de DSC según la termodinámica de equilibrio.

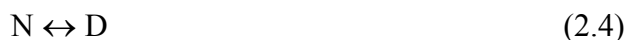
Como se ha indicado en la sección anterior, para poder aplicar la termodinámica de equilibrio a transiciones de DSC, es necesario que el proceso transcurra a través de estados de equilibrio del sistema. Normalmente se acepta que un proceso es de equilibrio cuando se obtiene reversibilidad calorimétrica. Para el caso de tiorredoxina y las formas mutantes obtenidas la reversibilidad resultó ser superior al 90 %, calculada a

partir de las alturas de las transiciones, cuando se calienta hasta justo después de la transición.

Una vez comprobado que un sistema es calorimétricamente reversible se intentan ajustar al modelo termodinámico más sencillo posible los perfiles obtenidos. El modelo para el análisis de los experimentos en este trabajo se describe en detalle a continuación.

2.2.5.4 Modelo de equilibrio de dos estados.

Es el mecanismo de desnaturalización más simple, y es aquél en el que sólo se encuentran poblados de forma significativa los estados nativo (N) y desplegado (D) de la proteína.



Las proporciones relativas de dichos estados a una temperatura dada están determinadas por el valor de la constante de equilibrio (K) a esa temperatura:

$$K = \frac{[D]}{[N]} \quad (2.5)$$

En general, los cambios en un parámetro termodinámico producidos por la desnaturalización, $\Delta_N^D J$, se definen como las diferencias entre los valores de dicho parámetro en el estado desnaturalizado y el nativo:

$$\Delta_N^D J = J(D) - J(N) \quad (2.6)$$

donde J puede ser la energía de Gibbs (G), entalpía (H), entropía (S), capacidad calorífica a presión constante (C_p), etc. Esta definición implica que se está tomando como estado de referencia el estado nativo. Así, el cambio de entalpía de exceso y la capacidad calorífica de exceso vienen dadas por:

$$\langle \Delta H \rangle = x_D \Delta_N^D H = \frac{K}{1+K} \cdot \Delta_N^D H \quad (2.7)$$

$$C_p^{ex} = \frac{\partial \langle \Delta H \rangle}{\partial T} = \frac{(\Delta_N^D H)^2}{RT^2} \cdot \frac{K}{(1+K)^2} + x_D \cdot \Delta_N^D C_p \quad (2.8)$$

donde $x_D = \frac{K}{1+K}$ es la fracción de proteína que se encuentra en el estado desnaturalizado y $\Delta_N^D C_p = C_p^D - C_p^N$ donde C_p^D es la capacidad calorífica del estado desplegado y C_p^N la del estado nativo, y para expresar la dependencia con la temperatura de K y de $\Delta_N^D H$ se han utilizado las ecuaciones de van't Hoff y de Kirchoff:

$$\frac{\partial \ln K}{\partial T} = \frac{\Delta_N^D H}{RT^2} \quad (2.9)$$

$$\frac{\partial \Delta_N^D H}{\partial T} = \Delta_N^D C_p \quad (2.10)$$

El segundo término en el lado derecho de la ecuación (2.8) representa la capacidad calorífica media de la proteína y corresponde a la línea base química, mientras que el primer término proviene del desplazamiento inducido por la temperatura en el equilibrio de desnaturalización.

Se define la temperatura de desnaturalización (T_m) como la temperatura en la que $x_D=0.5$, y por lo tanto $K=1$ y $\Delta_N^D G = 0$. En las transiciones de dos estados esta temperatura es muy cercana a la temperatura del máximo de capacidad calorífica.

El área encerrada entre la transición y la línea base química es igual al cambio total de entalpía en el proceso de desnaturalización, como muestra la figura 2.5; normalmente se denomina cambio de entalpía calorimétrica y se corresponde con $\Delta_N^D H$. Según la ecuación de Kirchoff, esta entalpía depende de la temperatura. Si la transición es simétrica y estrecha no se comete mucho error si se desprecia esta dependencia dentro del rango estrecho de la transición y se asigna esta entalpía a la T_m , denominándose ΔH_m . Como a esta temperatura el cambio de energía de Gibbs es cero, el cambio de entropía a la T_m se puede calcular como:

$$\Delta S_m = \frac{\Delta H_m}{T_m} \quad (2.11)$$

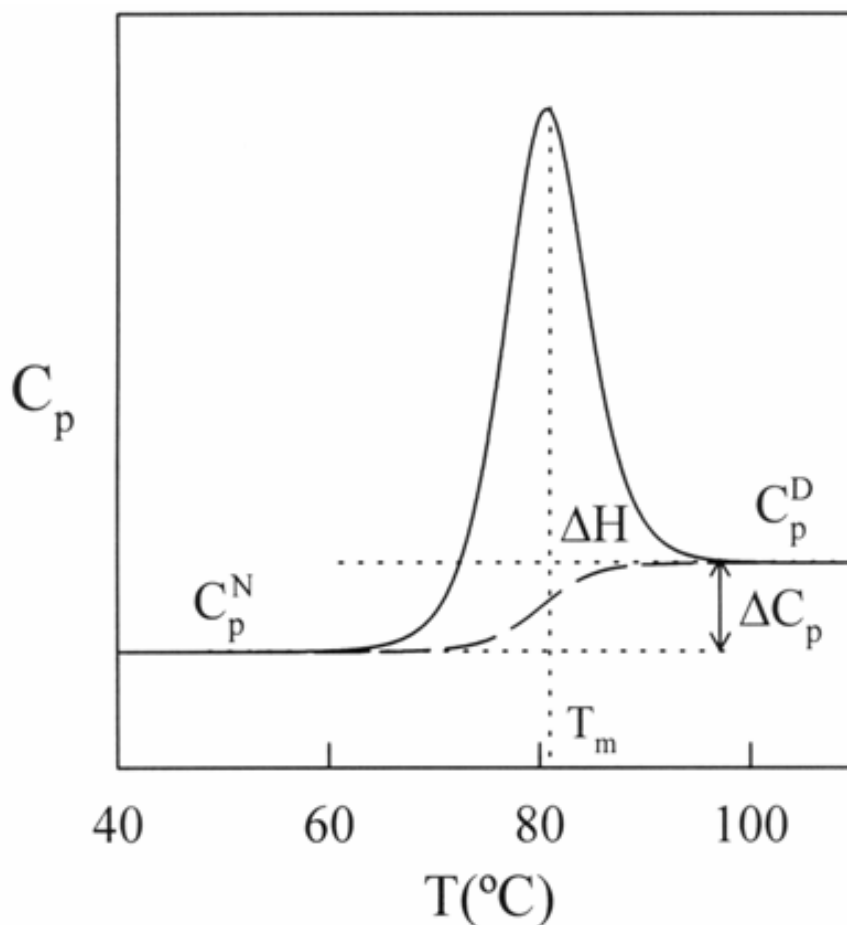


Figura 2.5. Representación gráfica de un perfil de DSC. En él se representa la curva de capacidad calorífica (trazo continuo) en función de la temperatura, para el proceso de desnaturalización térmica de una proteína hipotética sencilla. C_p^N representa la capacidad calorífica del estado nativo y C_p^D la del estado desplegado. En trazo discontinuo se representa también la capacidad calorífica intrínseca. El área encerrada entre ambas curvas es el cambio de entalpía de desnaturalización, ΔH . T_m es la temperatura a la que se localiza el máximo de la transición y ΔC_p es el incremento de capacidad calorífica que existe entre ambos estados, nativo (N) y desplegado (D).

En principio, el cambio de capacidad calorífica en el proceso de desnaturalización también se puede determinar desde el perfil de DSC, y por lo tanto los

valores de $\Delta_N^D G$, $\Delta_N^D H$ y $\Delta_N^D S$ a cualquier temperatura T se pueden calcular usando ecuaciones termodinámicas estándar:

$$\Delta_N^D H(T) = \Delta_N^D H(T_m) + \int_{T_m}^T \Delta_N^D C_p \cdot dT \quad (2.12)$$

$$\Delta_N^D S(T) = \frac{\Delta_N^D H(T_m)}{T_m} + \int_{T_m}^T \frac{\Delta_N^D C_p}{T} \cdot dT \quad (2.13)$$

$$\Delta_N^D G(T) = \Delta_N^D H(T) - T \cdot \Delta_N^D S(T) \quad (2.14)$$

Si se considera el cambio de capacidad calorífica constante con la temperatura las ecuaciones (2.12), (2.13) y (2.14) pasarían a ser:

$$\Delta_N^D H(T) = \Delta H_m + \Delta_N^D C_p \cdot (T - T_m) \quad (2.15)$$

$$\Delta_N^D S(T) = \frac{\Delta H_m}{T_m} + \Delta_N^D C_p \cdot \ln\left(\frac{T}{T_m}\right) \quad (2.16)$$

$$\Delta_N^D G(T) = \Delta H_m \cdot \left[1 - \frac{T}{T_m}\right] + \Delta_N^D C_p \cdot \left[T - T_m - T \cdot \ln\left(\frac{T}{T_m}\right)\right] \quad (2.17)$$

La dependencia de ΔG con la temperatura se conoce como curva de estabilidad. Un ejemplo de esta curva se puede ver en la figura 2.6. Las propiedades fundamentales de la curva de estabilidad son (Becktel y Schellman, 1987; Schellman, 1987):

- La curvatura viene dada por $\frac{\partial^2 \Delta_N^D G}{\partial T^2} = -\frac{\Delta_N^D C_p}{T}$, que tiene siempre valores negativos porque el cambio de capacidad calorífica de desnaturalización es siempre positivo.
- La pendiente de la curva es $-\frac{\partial \Delta_N^D G}{\partial T} = \Delta_N^D S$ y presenta un único extremo (un máximo) a la temperatura, T_S , a la que $\Delta_N^D S = 0$ (figura 2.6, tomada de Sanchez-Ruiz, 1995). La temperatura T_H , a la que la entalpía de desnaturalización es cero, es ligeramente inferior a T_S . La proteína nativa es estable en el rango de temperatura en que $\Delta_N^D G > 0$. Según se puede ver en la figura 2.6 la curva de estabilidad cruza la línea de $\Delta_N^D G = 0$ en dos puntos diferentes, siendo la temperatura más alta la correspondiente a la temperatura de desnaturalización, T_m , usada en el cálculo de la curva de estabilidad. El punto de corte menor es el resultado de la extrapolación de la curva e indica que es posible desnaturalizar la proteína también por frío (desnaturalización fría), según predijo Brandts (Brandts, 1964) y se demostró experimentalmente con posterioridad (véase por ejemplo Privalov et al., 1986; Ibarra-Molero et al., 1999b)

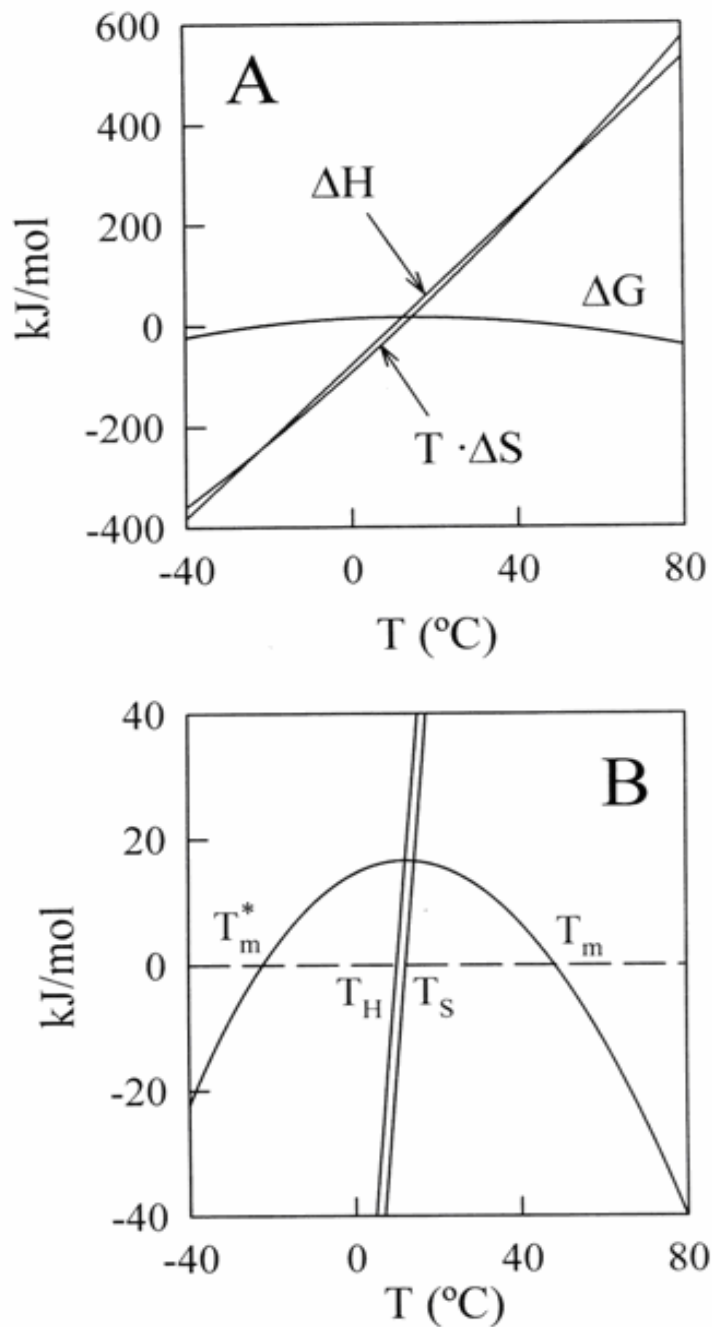


Figura 2.6. (A) Dependencia con la temperatura de los incrementos de entalpía, entropía y energía libre de Gibbs de desnaturalización de una proteína hipotética. (B) ampliación que muestra las principales características de la curva de estabilidad (representación de ΔG frente a T); se indican las temperaturas correspondientes a la desnaturalización caliente T_m , y fría, T_m^* , así como las temperaturas de inversión de entalpía T_H y T_S a las que ΔH y ΔS se hacen cero, respectivamente.

En la mayoría de los casos, la temperatura predicha para la desnaturalización fría está cerca o por debajo de 0 °C, aunque es posible detectarla experimentalmente si se sobreenfría la disolución de proteína o por adición de urea o cloruro de guanidinio, de forma que se desplace la temperatura a valores superiores.

Numerosos estudios de DSC (Privalov et al., 1986; Griko et al., 1988, 1989; Tamura et al., 1991; Griko y Privalov, 1992; Azuaga et al., 1992) sugieren que la desnaturalización fría es una propiedad común a las proteínas globulares, confirmando así las características mencionadas de la curva de estabilidad de proteínas.

La aplicabilidad del modelo de dos estados es posible a partir de un análisis directo de la transición de DSC. Si realizamos simulaciones dando diferentes valores al cambio de entalpía de desnaturalización en la ecuación (2.8), veremos que ésta determina el área bajo la transición así como su anchura. La entalpía de desnaturalización calculada a partir de la forma (anchura) de la transición se conoce como entalpía aparente o de *van't Hoff* (ΔH^{vH}). Se puede derivar una expresión para ésta a partir del término debido al desplazamiento del equilibrio de desnaturalización por efecto de la temperatura en la ecuación (2.8) y considerando $T=T_m$ y por tanto $K=1$:

$$\Delta H^{vH} = 4RT^2 \cdot \left[\frac{\Delta C_{p,m}}{\Delta_N^D H_m} \right] \quad (2.18)$$

donde $\Delta C_{p,m}$ es la capacidad calorífica de exceso a la temperatura T_m medida sobre la línea base química. El cociente $\Delta C_{p,m} / \Delta_N^D H_m$ no depende de la cantidad de proteína

presente en la célula del calorímetro, pero sí es sensible a la forma (anchura) de la transición.

Obviamente, no puede haber dos cambios de entalpía para el mismo proceso. A la ecuación (2.18) se llega suponiendo un modelo de dos estados, de manera que si realmente el proceso de desnaturalización en estudio transcurre según este modelo, encontraremos que las entalpías de van't Hoff y la calorimétrica son iguales dentro del error experimental. Si por el contrario existen diferencias significativas entre los valores se concluye que el proceso de desnaturalización no ocurre siguiendo un modelo de dos estados. Los resultados de este test del modelo de dos estados se suelen dar como la relación entre las entalpías calorimétrica y de van't Hoff: $r = \Delta_N^D H_m / \Delta H^{vH}$. Así, si estados intermedios llegan a poblarse significativamente durante el proceso, entonces la transición de DSC será más ancha que la predicha por el modelo de dos estados, y por consiguiente, la entalpía de van't Hoff será menor que la calorimétrica. Otro caso que puede conducir a un parámetro r aparentemente distinto de la unidad, es la presencia de desnaturalización fría en la traza calorimétrica, ya que en este caso la entalpía de van't Hoff y la calorimétrica podrían no estar bien determinadas con las ecuaciones habituales.

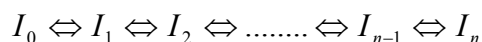
Privalov y colaboradores han encontrado una relación de $r = 1.05 \pm 0.03$ para diversas proteínas globulares pequeñas (Privalov, 1979), indicando una baja proporción de estados intermedios, y por tanto, una buena concordancia con el modelo de dos estados.

2.2.5.5 Modelo de equilibrio multiestado.

En ocasiones existen transiciones calorimétricas reversibles que no pueden ser explicadas con un modelo tan sencillo como el de dos estados. Son los casos en los que aparecen varias transiciones separadas, o bien, aquellos en los que aún existiendo un sólo pico, las entalpías calorimétrica y de van't Hoff no coinciden. Es aquí donde el parámetro r resulta de gran utilidad. Si $r < 1$ indica que existe cooperatividad intermolecular, es decir, la unidad cooperativa no es un monómero sino un dímero u otro estado de agregación superior al que se suponía inicialmente. Si $r > 1$ debemos considerar la presencia de estados intermedios en la desnaturalización térmica de la proteína en estudio. En este apartado nos centraremos en este último caso.

Esquema multiestado

Un mecanismo general para la desnaturalización térmica de proteínas en equilibrio fue propuesto por Freire y Biltonen (1978). Estos autores sugieren que el estado nativo (I_0) pasa al estado desnaturalizado (I_n) a través de $n-1$ estados intermedios:



El análisis se simplifica si usamos el formalismo de la función de partición. Tomamos como referencia el estado nativo y definimos los pesos estadísticos (ω_i), para cada uno de los estados, como el cociente entre su concentración y la del estado de referencia:

$$\omega_i = \frac{[I_i]}{[I_0]} = K_i = \exp(-\Delta_N^i \Delta G / RT) \quad (2.19)$$

Toda la información relevante sobre el sistema está contenida en la función de partición (Z) que se define como la suma de los pesos estadísticos:

$$Z = \sum_{i=0}^n \omega_i = \sum_{i=0}^n \exp(-\Delta_N^i G / RT) = 1 + \sum_{i=1}^n \exp(-\Delta_N^i G / RT) \quad (2.20)$$

La fracción de proteína (x_i) presente en un determinado estado I_i , viene dada por el cociente entre el peso estadístico de ese estado y la función de partición:

$$x_i = \omega_i / Z = (1/Z) \cdot \exp(-\Delta_N^i G / RT) \quad (2.21)$$

La entalpía de exceso, promedio de las contribuciones de todos los estados presentes, viene dada por:

$$\langle \Delta H \rangle = \sum_{i=0}^n x_i \cdot \Delta_N^i H = (1/Z) \cdot \sum_{i=0}^n \Delta_N^i H \cdot \exp(-\Delta_N^i G / RT) \quad (2.22)$$

y la capacidad calorífica de exceso:

$$C_p^{ex} = \delta \langle \Delta H \rangle / \delta T = (\langle \Delta H^2 \rangle - \langle \Delta H \rangle^2) / (RT^2) + \langle \Delta C_p \rangle \quad (2.23)$$

donde $\langle \Delta H^2 \rangle$ es el valor medio de ΔH^2 [= $\sum x_i \cdot (\Delta_N^i H)^2$]. El primer término de la ecuación (2.23) se debe al desplazamiento del equilibrio de desnaturalización inducido

por la temperatura, mientras que el segundo término es la capacidad calorífica media de la proteína y corresponde a la línea base química.

A partir de la ecuación (2.22) y mediante una doble integración es posible obtener la función de partición como función de la temperatura:

$$\ln[Z(T)] = \int_{T_0}^T (1/RT^2) \cdot \langle \Delta H \rangle \cdot dT = \int_{T_0}^T (1/RT^2) \cdot \left(\int_{T_0}^T C_P^{ex} \cdot dT \right) \cdot dT \quad (2.24)$$

donde T_0 es una temperatura en la que toda la proteína está presente en estado nativo.

Vemos cómo un perfil de DSC contiene toda la información requerida para caracterizar completamente el proceso de desnaturalización en equilibrio, como ya señalaron Freire y Biltonen. Estos autores desarrollaron un procedimiento recursivo por pasos para determinar el número de estados intermedios significativamente poblados y caracterizados termodinámicamente. También es posible encontrar en la bibliografía modos alternativos de deconvolucionar un perfil de DSC (Filimonov et al., 1982; Gill et al., 1985).

Es posible generalizar el formalismo de la función de partición descrito para incluir efectos de unión de ligando y oligomerización (Thorolfsson et al., 2002)

2.2.5.6 Determinación de las capacidades caloríficas absolutas de los estados nativo y desnaturalizado a partir de los termogramas experimentales.

Es posible obtener valores de capacidad calorífica absoluta a partir de la dependencia con la concentración de proteína de la función de capacidad calorífica aparente ΔC_{app} , que es la capacidad calorífica de la proteína tomando como referencia la línea base tampón-tampón. ΔC_{app} es un número negativo ya que en la célula de muestra la cantidad de agua es menor, y ésta tiene una capacidad calorífica mayor que la proteína. ΔC_{app} de una proteína puede expresarse como:

$$\Delta C_{app} = C \cdot V_0 \cdot 10^{-6} \cdot \left(C_{p,P} - \frac{V_P}{V_W} C_{p,W} \right) \quad (2.25)$$

donde C es la concentración de proteína expresada en mM, V_0 es el volumen de la célula del calorímetro en ml, $C_{p,P}$ y $C_{p,W}$ son las capacidades caloríficas de la proteína y el agua (tampón) respectivamente y V_P y V_W son los volúmenes molares de la proteína y el agua. El volumen específico de la proteína se puede calcular mediante procedimientos descritos (Makhatadze et al., 1990). A partir de la ecuación anterior se puede calcular la capacidad calorífica absoluta mediante la representación de ΔC_{app} frente a la concentración de proteína, la cual es lineal pasando por el origen y con una pendiente

$$V_0 \cdot 10^{-6} \cdot \left(C_{p,P} - \frac{V_P}{V_W} C_{p,W} \right).$$

2.2.5.7 Estimación teórica de las capacidades caloríficas de los estados nativo y desnaturalizado:

A partir de la composición de aminoácidos es posible determinar la capacidad calorífica teórica de los estados nativo y desnaturalizado. Para el caso del estado desnaturalizado podemos emplear (Privalov y Makhatadze, 1990):

$$C_p^D = \sum_{i=1}^{20} n_i \cdot C_{p,i} + (N-1) \cdot C_{p,NH-CO} + C_{p,NH_2} + C_{p,COOH} \quad (2.26)$$

donde N es el número de aminoácidos de la proteína, el subíndice i se refiere a los 20 aminoácidos naturales, n_i es el número de aminoácidos del tipo i , y $C_{p,NH-CO}$, $C_{p,COOH}$ y C_{p,NH_2} son las capacidades caloríficas de la unidad peptídica y los grupos carboxilo y amino terminal para los que se emplean los valores de representaciones polinómicas de los datos de Privalov y Makhatadze (1990) dados por Freire (1995).

Los valores estimados para la capacidad calorífica de las proteínas en estado nativo se pueden obtener en función de la temperatura a partir de la ecuación dada por Freire (1995):

$$C_p^N = (1.323 + 0.0067 \cdot T) \cdot M_r \quad (2.27)$$

donde M_r es la masa molecular de la proteína y el resultado se obtiene en $J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$.

2.2.6 Dicroísmo Circular

2.2.6.1 Generalidades.

El dicroísmo circular es una técnica instrumental muy útil en la determinación de la estructura de macromoléculas. Las moléculas quirales, entre las que están las proteínas, interaccionan de distinta manera con la luz polarizada circularmente hacia la derecha y hacia la izquierda en ausencia de campos magnéticos (Woody, 1996). Concretamente, el dicroísmo circular (CD, de las siglas en inglés *Circular Dichroism*) se define como la diferencia entre la absorción de luz polarizada circularmente hacia la derecha y hacia la izquierda.

La luz polarizada circularmente se consigue con dos haces de luz ortogonales que están polarizados en el plano y que se encuentran fuera de fase en 90°. El vector eléctrico de la luz polarizada circularmente se puede expresar matemáticamente (Michl y Thulstrup, 1986; Kliger et al., 1990) como:

$$\mathbf{E}_{\pm} = E_0 (\mathbf{i} \pm i\mathbf{j}) \exp[2\pi i(\nu t - z / \lambda)] \quad (2.28)$$

donde + indica luz circular polarizada a la derecha y – indica luz circular polarizada a la izquierda, E_0 es la amplitud de la onda, \mathbf{i} y \mathbf{j} son los vectores unidad en las coordenadas x e y respectivamente en un sistema de coordenadas cartesiano hacia la derecha en el que + z es la dirección de propagación, i es $(-1)^{1/2}$ y ν y λ son la frecuencia y la longitud de onda de la luz.

La absorbancia de luz polarizada hacia la izquierda se puede expresar como:

$$A_i = \log_{10} \left(\frac{I_i^0}{I_i} \right) = \varepsilon_i Cl \quad (2.29)$$

Y hacia la derecha:

$$A_d = \log_{10} \left(\frac{I_d^0}{I_d} \right) = \varepsilon_d Cl \quad (2.30)$$

donde I^0 e I son las intensidades de luz polarizada que inciden y que salen de la muestra respectivamente, l es la distancia que recorre la luz a través de la muestra, C es la concentración de soluto quiral y ε es el coeficiente de extinción molar del soluto para la luz polarizada hacia el lado correspondiente. En consecuencia, según la definición de CD:

$$\Delta A = A_i - A_d = \varepsilon_i \cdot Cl - \varepsilon_d \cdot Cl = (\varepsilon_i - \varepsilon_d) \cdot Cl = \Delta \varepsilon \cdot Cl \quad (2.31)$$

donde $\Delta \varepsilon$ es el CD decimal molar.

Además de expresar el CD en forma de $\Delta \varepsilon$, en bioquímica también se utiliza el método de medida original propuesto por Lowry (Lowry, 1935). Cuando una luz polarizada circularmente pasa a través de un medio circularmente dicroico, la absorción diferencial de las dos componentes circulares hace que a la salida de la muestra cada

componente siga estando circularmente polarizada, pero los radios de los círculos trazados por los vectores eléctricos son ahora diferentes, y cuando estas dos ondas luminosas opuestas, polarizadas circularmente, se combinan, el resultado sea luz polarizada elípticamente. Cuando los vectores eléctricos de las dos componentes circulares van en el mismo sentido, la suma de sus magnitudes es el eje mayor de la elipse, y cuando van en sentidos opuestos, la resta de sus magnitudes nos da el valor del eje menor de la elipse. Ahora el CD se puede caracterizar por la relación entre los ejes mayor y menor, que es la tangente de un ángulo θ , al que se denomina elipticidad. Como θ es normalmente muy pequeño, puede expresarse como:

$$\theta(rad) = \tan \theta = \frac{|\mathbf{E}_i| - |\mathbf{E}_d|}{|\mathbf{E}_i| + |\mathbf{E}_d|} = \frac{\exp\left(\frac{-A_i}{2}\right) - \exp\left(\frac{-A_d}{2}\right)}{\exp\left(\frac{-A_i}{2}\right) + \exp\left(\frac{-A_d}{2}\right)} \quad (2.32)$$

Expandiendo las exponenciales, teniendo en cuenta el valor despreciable de ΔA frente a la unidad y convirtiendo a grados:

$$\theta(grad) = 180 \cdot \ln 10 \cdot \Delta A / 4\pi = 32.98 \Delta A \quad (2.33)$$

de donde obtenemos que la elipticidad es proporcional al dicroísmo circular.

La elipticidad molar se define como:

$$[\theta] = 100 \frac{\theta}{Cl} \quad (2.34)$$

o bien la elipticidad molar normalizada:

$$[\theta]_{MRW} = 100 \frac{\theta \cdot M_r}{C \cdot l \cdot N_A} \quad (2.35)$$

donde M_r es la masa molecular y N_A el número de aminoácidos.

Si se sustituyen las ecuaciones (2.31) y (2.33) en la (2.34) obtenemos:

$$[\theta] = 3298 \Delta \varepsilon \quad (2.36)$$

2.2.6.2 Dicroísmo circular y la estructura secundaria de proteínas:

El espectro de ultravioleta lejano de CD, por debajo de 250 nm es muy sensible a los cambios estructurales, fundamentalmente a los de estructura secundaria, ya que la contribución de la estructura terciaria a la señal de CD en estas longitudes de onda es despreciable.

En concreto el espectro de CD de una proteína con estructura de hélice α presenta un doble mínimo a 222 y a 208-210 nm y un máximo más intenso a 191-193 nm (figura 2.7). La intensidad de las tres bandas da una idea de la cantidad de contenido helicoidal que tiene la proteína.

Las proteínas con estructura β suelen presentar un único pico negativo y un único pico positivo cuyas intensidades son menores que las de las hélices. El mínimo se encuentra normalmente entre 210 y 225 nm aunque se han descrito algunos ejemplos (Manavalan y Johnson, 1983; Wu et al., 1992) donde proteínas que por resonancia magnética nuclear se ha determinado que son todo β tienen una banda negativa intensa alrededor de 200 nm, como los péptidos con estructura no regular. La explicación que se ha dado a estos casos es que, según los datos de difracción de rayos X, estas proteínas tienen hojas β cortas y bastante irregulares. El pico positivo es de mayor intensidad que el negativo y aparece entre 190 y 200 nm (figura 2.8).

Los péptidos y proteínas con estructura no regular presentan habitualmente una banda negativa intensa cerca de 200 nm (véase la figura 2.9) y algunas bandas débiles entre 220 y 230 nm que pueden ser tanto positivas como negativas.

2.2.6.3 Métodos para la estimación de las estructuras secundarias presentes en proteínas mediante dicroísmo circular.

La estimación de los tipos de estructura secundaria que se encuentran presentes en proteínas (hélice α , hoja β , o estructura no regular) es un proceso empírico para el que se han propuesto numerosos modelos (Alder et al., 1973; Woody, 1985, 1992; Johnson, 1985, 1988, 1990; Yang et al., 1986).

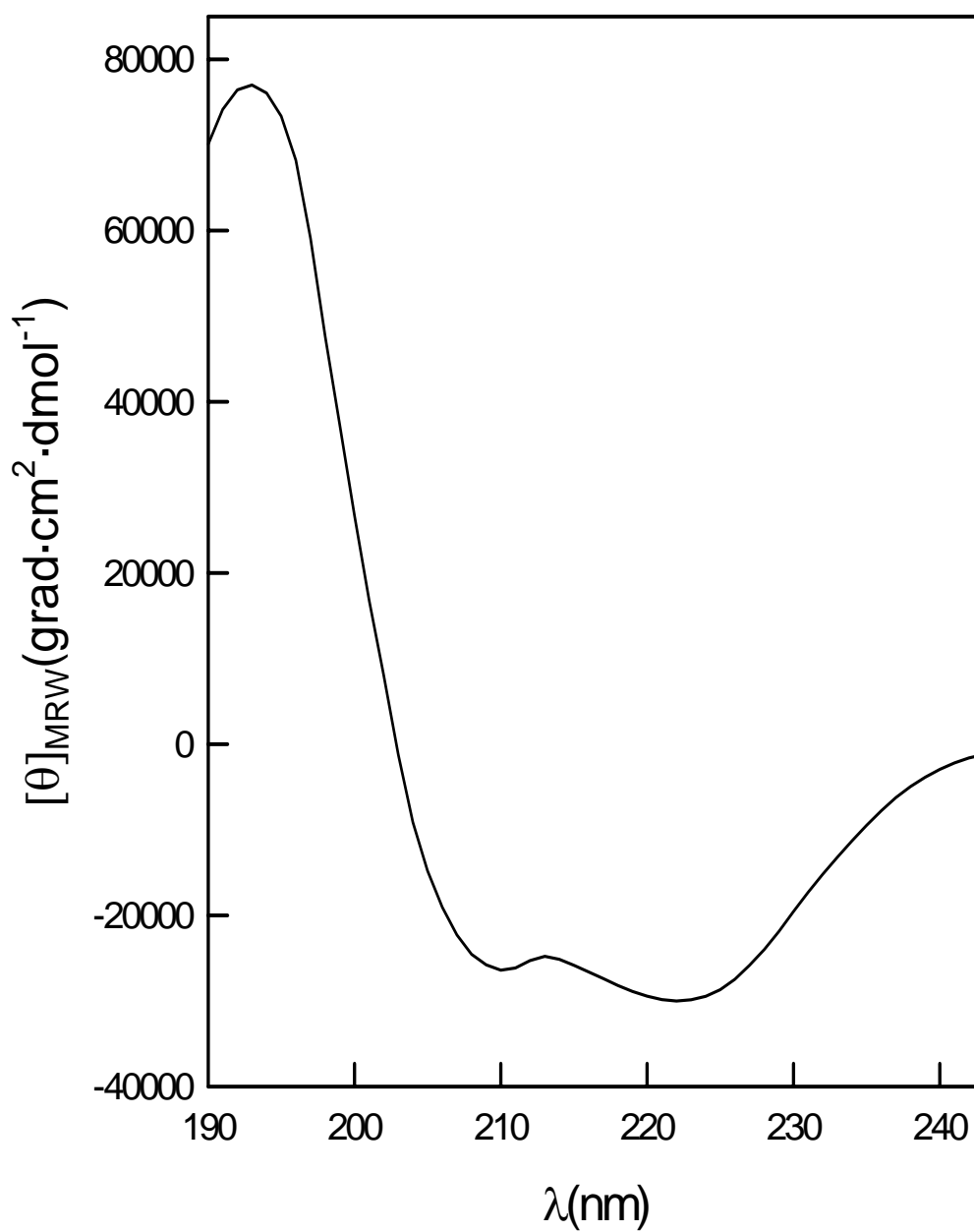


Figura 2.7 Espectro de CD de una proteína con estructura de hélice α (Chen et al., 1972)

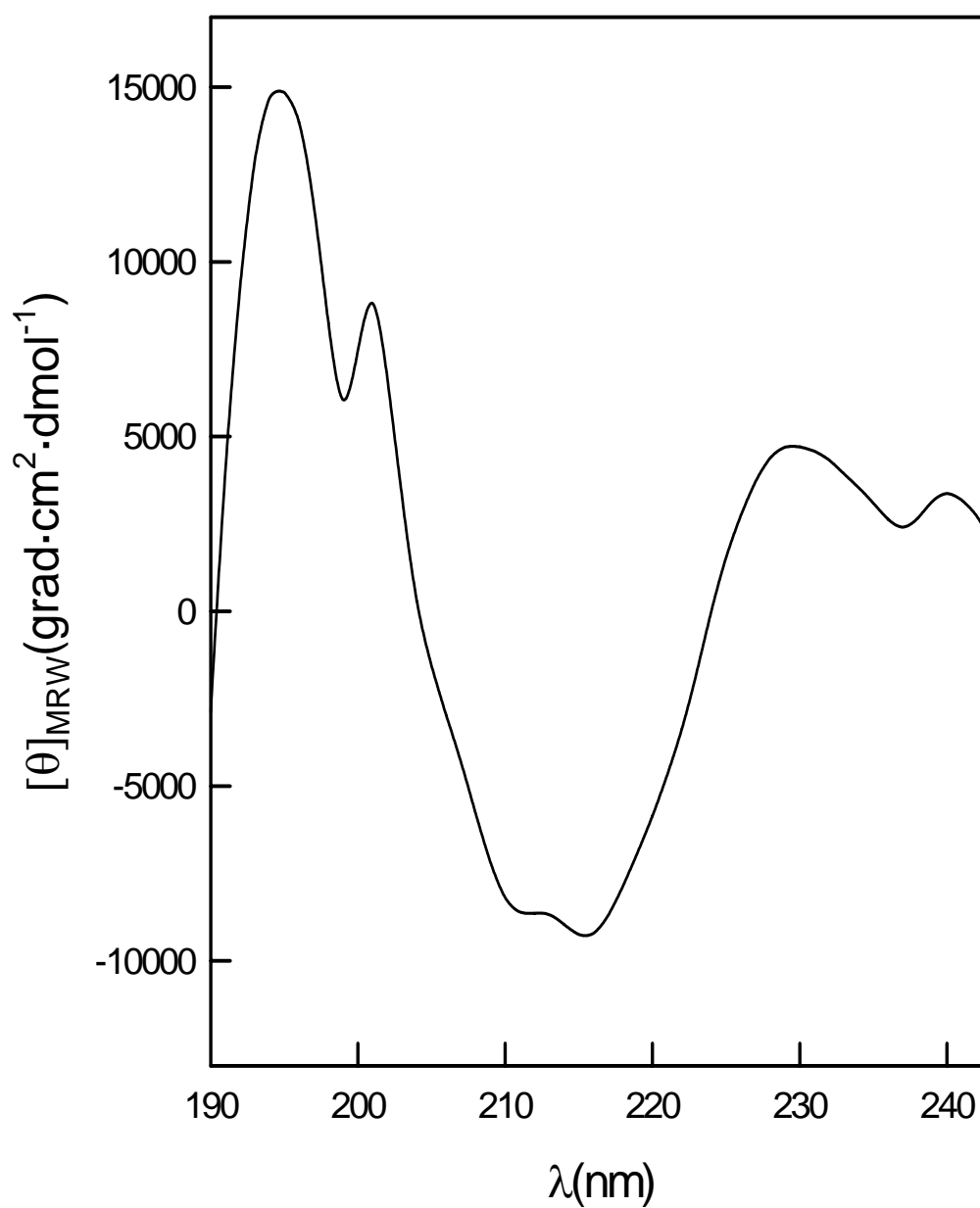


Figura 2.8. Espectro de CD de una proteína con estructura de hoja β (Chen et., 1972)

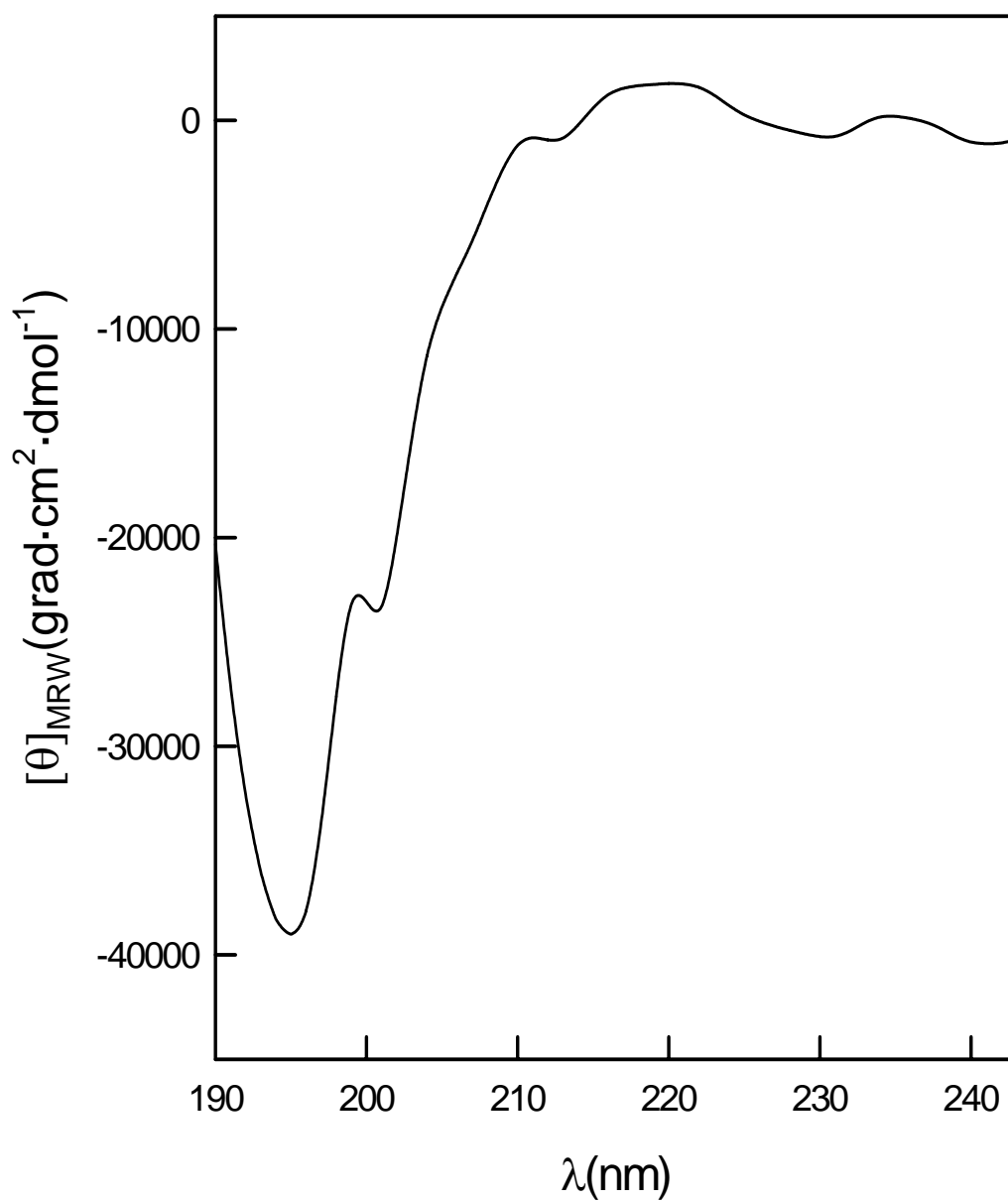


Figura 2.9. Espectro de CD de una proteína con estructura no regular (Chen et al., 1972)

La determinación de los espectros base de las estructuras secundarias puras $B_k(\lambda)$ se puede hacer a partir de espectros de péptidos modelo y/o proteínas de estructura conocida (Greenfield y Fasman, 1969; Brahms y Brahms, 1980; Chen et al., 1972; Saxena y Wetlaufer, 1971; Baikalov, 1985).

En todos los procedimientos que se han propuesto hasta el momento se hacen una serie de suposiciones (Venyaminov y Yang, 1996):

- La estructura tridimensional obtenida por cristalografía de rayos X es la misma que presentan las proteínas en disolución acuosa, ya que la asignación de los espectros base se ha hecho comparando con estructuras obtenidas con esta técnica.

- Las contribuciones de los distintos tipos de estructura secundaria a la señal de CD es aditiva, mientras que la contribución de la estructura terciaria es despreciable.

- En el espectro de CD de ultravioleta lejano sólo contribuyen los cromóforos peptídicos, y la contribución de los cromóforos no peptídicos presentes en la proteínas es despreciable.

- Cada elemento estructural, como la hélice α o la hoja β , se puede describir con un único espectro de CD.

El espectro de CD de una proteína, $S(\lambda)$, se puede analizar como la combinación lineal de k espectros base, $B_k(\lambda)$:

$$S(\lambda) = \sum_{k=1}^N f_k B_k(\lambda) \quad (2.37)$$

donde N es el número de estructuras secundarias diferentes que pueden estar presentes y f_k es la fracción de la estructura secundaria k . Las restricciones para f_k son:

$$\sum_{k=1}^N f_k = 1 \quad \text{y} \quad f_k \geq 0 \quad (2.38)$$

2.2.6.4 Análisis de perfiles de desnaturalización térmica determinados mediante dicroísmo circular.

El análisis de los datos de CD correspondientes a la desnaturalización térmica de una proteína se puede hacer con los mismos modelos que se han mencionado anteriormente. La única particularidad que debe ser tenida en cuenta es que la señal de elipticidad molar es:

$$[\theta] = \sum_i x_i \cdot [\theta_i] \quad (2.39)$$

donde la sumatoria debe aplicarse sobre todas las especies que puedan estar pobladas en el modelo termodinámico que se esté utilizando; x_i es la fracción de cada especie y $[\theta_i]$ es la elipticidad molar correspondiente, que normalmente se considera linealmente dependiente de la temperatura.

En el caso de un proceso de desnaturalización siguiendo un modelo de dos estados, tendremos:

$$[\theta] = [\theta_D]x_D + [\theta_N]x_N \quad (2.40)$$

donde las fracciones molares quedan definidas en términos de la constante de equilibrio como $x_D = \frac{K}{1+K}$ y $x_N = \frac{1}{1+K}$ y considerando la ecuación (2.9). La elipticidad molar para cada una de las especies puede definirse, para el estado nativo y desnaturalizado, respectivamente como:

$$[\theta_N] = a + b \cdot T \quad (2.41)$$

$$[\theta_D] = c + d \cdot T \quad (2.42)$$

donde a, b, c y d son los parámetros del ajuste lineal. A partir de este análisis se pueden obtener parámetros termodinámicos como la temperatura de desnaturalización, el cambio de entalpía o el cambio de energía libre.

2.2.7 Fluorescencia

2.2.7.1 Generalidades.

La fluorescencia es una técnica altamente sensible que comúnmente es utilizada en el estudio de proteínas para analizar cambios conformacionales y más concretamente cambios en el ambiente de los fluoróforos.

Tiorredoxina posee dos triptófanos en las posiciones 27 y 31, cuyo espectro de excitación está centrado entorno a 276 nm. El espectro de emisión está centrado aproximadamente a 345 nm, lo cual es propio de triptófano; este máximo se desplaza desde 345 a 355 nm en presencia de urea (figura 2.10).

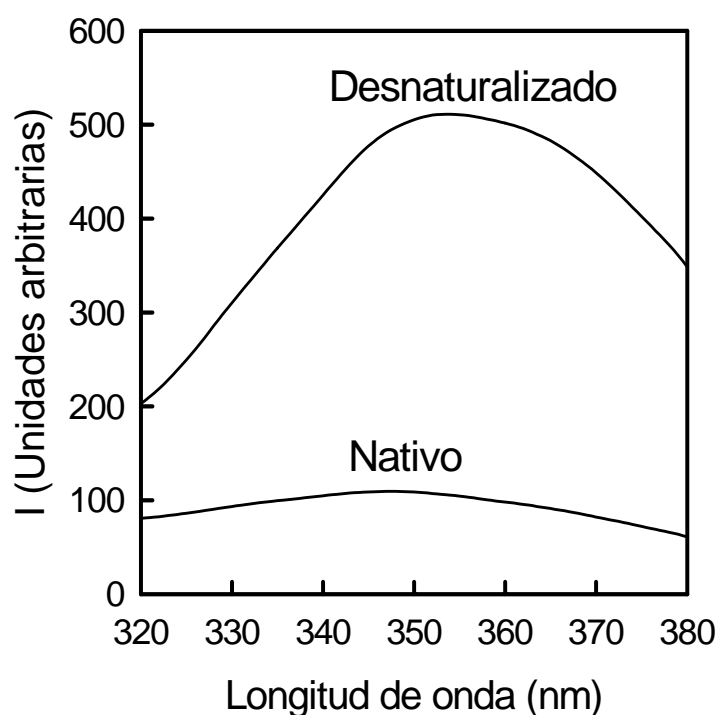


Figura 2.10 Espectros de emisión de fluorescencia característicos para tiorredoxina en estado nativo y desnaturado a 25 °C. Longitud de onda de excitación 280 nm y de emisión 350 nm. La proteína en estado nativo se preparó en HEPES 5 mM pH 7 y la proteína desplegada se preparó en el mismo tampón a 8 M urea. La concentración de proteína fue 0.05 mg/mL. La cubeta utilizada fue de cuarzo y de paso de luz 1 cm. La velocidad de barrido fue de 500 nm/min y las rendijas de excitación y emisión 10 nm.

Se han realizado experimentos de desplegamiento y replegamiento en presencia de urea a 25 °C, excitando a 276 nm y tomando datos de intensidad de fluorescencia a medida a 350 nm, que corresponde al máximo de emisión. El procedimiento para la realización de estos experimentos será descrito a continuación.

2.2.7.2 Cinéticas de desplegamiento y replegamiento de tiorredoxina y formas mutantes y análisis de los perfiles cinéticos.

Tanto para tiorredoxina forma silvestre como para las formas mutantes, se realiza la diálisis en tampón HEPES 5 mM, pH 7. Además, se prepara una disolución concentrada de urea más o menos 10 M de la forma expuesta en el apartado 2.2.4.2

2.2.7.2.a Cinéticas en la dirección del desplegamiento.

Para estos experimentos se parte de una disolución de proteína de alrededor de 0.7 mg/mL en el tampón de la diálisis y se transfiere una alícuota directamente a la cubeta en el fluorímetro en la cual hay una disolución 5 mM HEPES pH 7 y a una determinada concentración de urea, de forma que la concentración final de proteína sea 0.05 mg/mL. Una vez añadida la proteína se homogeniza la disolución con la pipeta automática y acto seguido se comienza a medir el aumento de la intensidad de fluorescencia en función del tiempo. Para evitar efectos de fotodescomposición se mide de forma intermitente de forma que la radiación no incida continuamente en la muestra todo el tiempo. Cuando la cinética ha terminado medimos el índice de refracción y determinamos la concentración de urea mediante la ecuación 2.3. Se realizaron numerosas cinéticas que van desde 5.7 hasta 9.7 M Urea.

Todos los perfiles de desplegamiento, han sido ajustados según la ecuación exponencial (algunos ejemplos se dan en la figura 2.12):

$$I = I_{\infty} + \Delta I \cdot e^{(-t/\tau)} \quad (2.43)$$

donde I_{∞} es la intensidad de fluorescencia a tiempo infinito, ΔI la amplitud de la exponencial y τ el tiempo de relajación que se define como el tiempo requerido para que la concentración de reactivo disminuya $1/e$ de su valor inicial. τ viene dado por la inversa de la constante de velocidad:

$$\tau = \frac{1}{k} \quad (2.44)$$

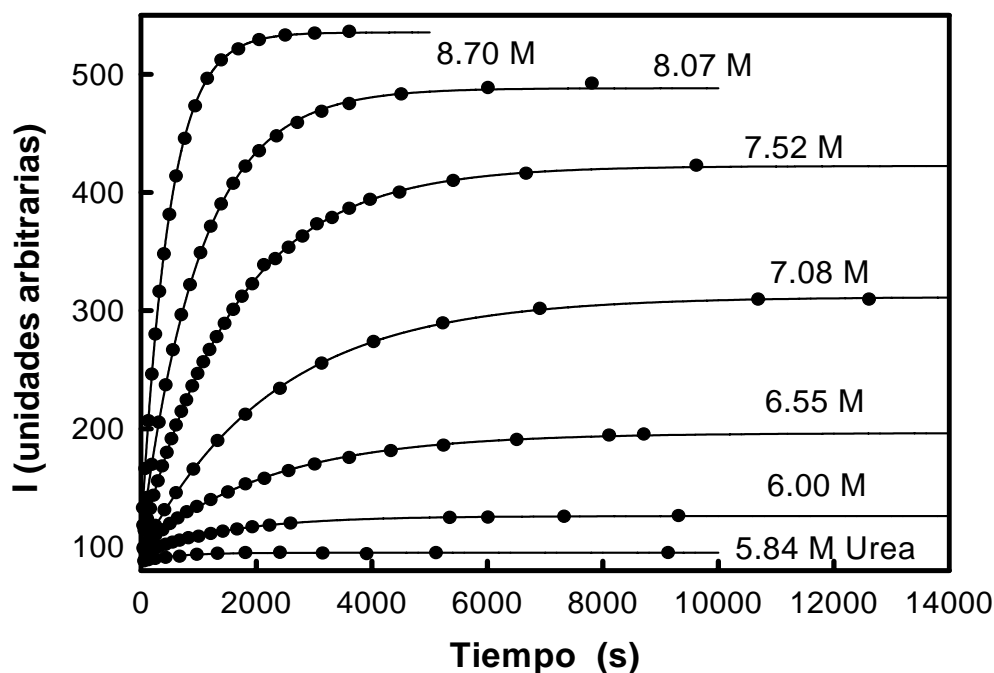


Figura 2.11. Perfiles cinéticos representativos de desplegamiento a diferentes concentraciones de urea para tiorredoxina WT a 25 °C, en HEPES 5 mM pH 7 y concentración de proteína 0.05 mg/mL. Las líneas continuas representan el ajuste a los datos experimentales, círculos, según la ecuación (2.43).

2.2.7.2.b Cinéticas en la dirección del replegamiento.

El procedimiento es muy similar al descrito para el desplegamiento, pero en esta ocasión se parte de proteína desnaturalizada. Se pone una alícuota de proteína en urea a alta concentración, ~10 M de forma que las condiciones finales de esta disolución sean de 0.7 mg/mL de proteína y ~8 M urea al igual que antes, así los volúmenes a utilizar son los mismos para conseguir en la cubeta una concentración de 0.05 mg/mL. Para estar seguros de que la proteína se encuentra en estado desnaturalizado, se deja esta disolución a 25 °C durante al menos 3 horas, ya que según se determinó en las cinéticas de desplegamiento, el valor de τ para las cinéticas más lentas es aproximadamente 40 minutos y esto corresponde a la fracción $1/e$ (~37 %) del tiempo total para el proceso de desnaturalización completo. En este caso las cinéticas se siguen mediante el decrecimiento de la señal de fluorescencia en función del tiempo. En el caso de tiorredoxina forma silvestre, el rango de concentraciones de urea que se sigue es más o menos de 7 a 4.5 M.

En este caso los perfiles cinéticos se ajustan mediante la siguiente ecuación (algunos ejemplos se dan en la figura 2.12):

$$I = I_{\infty} - \Delta I \cdot e^{(-t/\tau)} \quad (2.45)$$

El análisis de los perfiles tanto de desplegamiento como de replegamiento fue realizado con los programa MLAB y MatLab, y en todos los casos los ajustes fueron excelentes.

En la sección 5 se hace un análisis de los resultados obtenidos mediante los experimentos cinéticos, basado en el modelo de dos estados, tanto para tiorredoxina WT como para diversas formas mutantes.

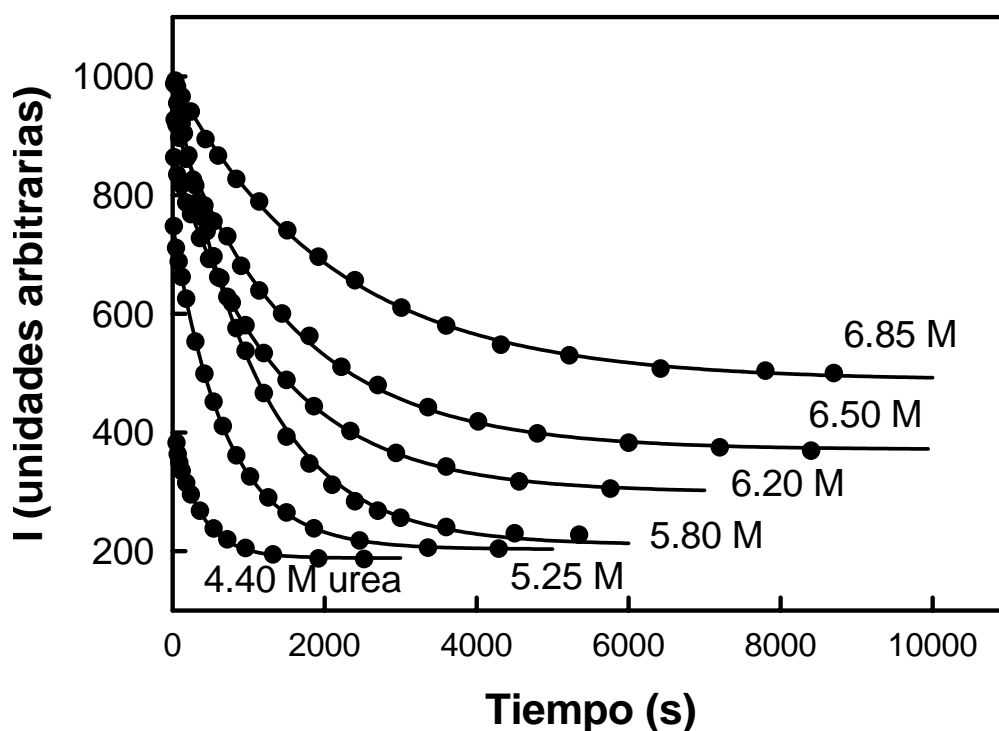


Figura 2.12. Perfiles cinéticos representativos de replegamiento a diferentes concentraciones de urea para tiorredoxina WT a 25 °C después de transferir una alícuota de proteína desplegada a 8.5 M urea en HEPES 5 mM pH 7 y concentración de proteína 0.05 mg/mL. Las líneas continuas representan el ajuste a los datos experimentales, círculos, según la ecuación (2.45).

2.2.8 Cristalización de formas mutantes de tiorredoxina en medios difusivos.

2.2.8.1 Conceptos

El conocimiento de la estructura de las formas mutantes de tiorredoxina es de gran importancia en nuestras investigaciones. En el caso de tiorredoxina forma silvestre, podemos encontrar la estructura determinada por difracción de rayos X (Katti et al., 1990), a una resolución de 1.68 Å. Las coordenadas espaciales están depositadas en el *Protein Data Bank* (PDB) con el código 2trx.pdb. Para obtener las estructuras de las formas mutantes vamos a emplear también la difracción de rayos X que nos permite conocer la estructura a escala atómica. No obstante, el primer paso es obtener los cristales de proteína para lo cual se requieren multitud de experimentos, hasta encontrar las condiciones óptimas.

Básicamente, al cristalizar una proteína lo que se hace es favorecer la ordenación de las moléculas en un entramado periódico. En esta ordenación existen dos procesos que juegan un papel fundamental; por un lado, el transporte de las moléculas de proteína hacia las caras del cristal mediante procesos de difusión o convección, y por otro lado, la incorporación de las moléculas de proteína a las posiciones adecuadas del cristal. La velocidad relativa de los dos procesos determina la obtención de cristales y la calidad de los mismos. Para obtener un buen cristal, es necesario que la velocidad de transporte de las moléculas al cristal sea inferior a la velocidad de incorporación de las moléculas al entramado. Para conseguir esto, se han desarrollado técnicas (García-Ruiz et al., 2003)

basadas en la difusión. La difusión consiste en un flujo direccional que se produce debido al movimiento aleatorio de las moléculas a escala microscópica dentro de un gradiente de concentración. Una posibilidad para conseguir que el transporte de materia esté dominado por procesos difusivos y no convectivos, que son mucho más rápidos y caóticos, es hacer que las fuerzas gravitatorias sean de menor intensidad que otras fuerzas no direccionales. En la práctica esto se consigue empleando capilares, geles, medios viscosos, condiciones de gravedad reducida o combinación de todos estos métodos. En nuestro caso el procedimiento que hemos utilizado es la cristalización en capilar en combinación o no con geles de agarosa.

2.2.8.2 Procedimiento experimental.

Para la realización de los experimentos de cristalización de proteínas en capilares, se emplearon capilares de 0.1 mm de diámetro, que podemos considerar espacialmente divididos en tres cámaras. Como agente precipitante MPD (2, metil-2,4-pentanediol), cuya misión es disminuir la solubilidad de la proteína. Además, para favorecer la precipitación de la proteína, al contacto con el agente precipitante, es necesario utilizar concentraciones de proteína elevadas, entorno a 30 mg/mL. La proteína se dializó en tampón acetato sódico 15 mM a pH 3.5 y posteriormente se concentró.

Lo más difícil a la hora de producir cristales es encontrar las condiciones óptimas de cristalización, por esto, se realizaron un gran número de experimentos probando diferentes condiciones de pH y reactivos. Como punto de partida se tomaron

las diferentes condiciones que encontramos en la bibliografía (Holgrem y Söderberg, 1970; LeMaster y Richard, 1988; Katti et al., 1990; Nikkola et al., 1993; Rudresh et al., 2002).

Para montar cada condición se necesitan unos 5 μ L de disolución de proteína, los cuales, por capilaridad, se introducen en el capilar por la parte más fina; esto corresponde a la cámara de proteína. Por la parte superior, más ancha y con ayuda de una pipeta, se ponen 3 mL de disolución de agarosa al 0.5 % en el tampón de trabajo, conformando la cámara de gel, y por último se añade sobre la cámara de gel la cámara de sal, compuesta de 40 μ L de la mezcla de reactivos. Los capilares se sellan por los extremos con cera para evitar la evaporación. La aparición de cristales puede requerir desde varios días hasta varias semanas. Además de las condiciones obtenidas de la bibliografía, se ensayaron diferentes condiciones empleando un kit comercial con 50 disoluciones diferentes que representan las más efectivas en la cristalización de proteínas. En nuestro caso, no tuvimos éxito empleando este kit comercial.

Después de muchos experimentos, hemos conseguido cristales de la forma mutante de tiorredoxina L7V a pH 3.8 10 mM acetato sódico, 25 % etanol y 10 mM acetato cúprico, en la cámara de sal y con una cámara de gel formada por una disolución de agarosa al 0.5 % en tampón acetato sódico pH 3.5. Para L7V podemos ver un cristal en la imagen de la figura 2.13. También se han conseguido cristales de las formas G74S y P34H.

2. Materiales y Métodos

No obstante, a la dificultad de conseguir cristales se une el hecho de que para obtener estructuras por difracción de rayos X, los cristales tienen que ser de calidad. Hasta el momento sólo los cristales de la forma L7V han tenido la calidad suficiente para ser difractados, resultados que se muestran en el apartado 4.4.

Los experimentos de cristalización se han realizado en colaboración con el laboratorio del Dr. García Ruiz y bajo la supervisión del Dr. Gavira Gallardo.

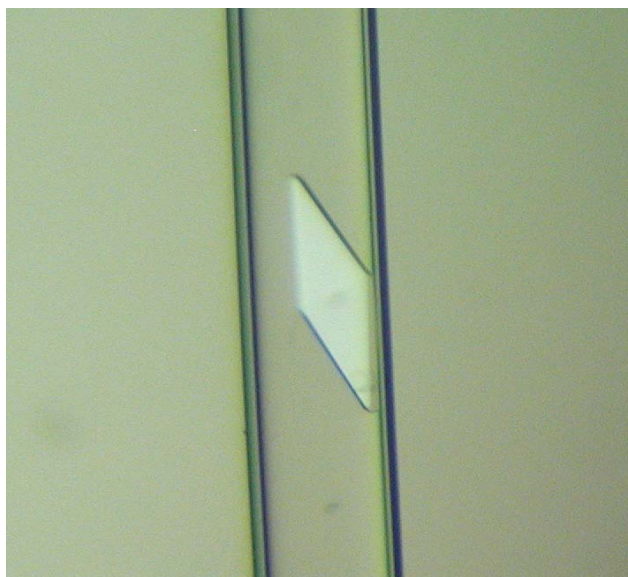


Figura 2.13. Cristal de tioredoxina, mutante L7V, en condiciones 10 mM acetato sódico, pH 3.8, 25% etanol, 10 mM acetato cúprico con una cámara de gel formada por una disolución de agarosa al 0.5 % en tampón acetato sódico pH 3.5

3. Estudio de la eficiencia de diferentes sales en el apantallamiento de las interacciones electrostáticas

3.1 Introducción

Las interacciones entre grupos cargados juegan un papel realmente importante en los procesos moleculares en proteínas, incluyendo uniones proteína-ligando, interacciones entre proteínas y procesos de plegamiento y desplegamiento. De hecho, trabajos recientes sostienen que las interacciones carga-carga son determinantes en los valores de pK de grupos ionizables expuestos en la superficie de la proteína (Pace et al., 2002; Sunnd et al., 2002; Laurents et al., 2003) y que la distribución superficial de carga puede ser racionalmente diseñada para incrementar la estabilidad y para optimizar las interacciones intermoleculares (Grimsley et al., 1999; Ibarra-Molero et al., 1999a; Loladze et al., 1999; Pace 2000; Perl et al., 2000; Spector et al., 2000; Lee y Oidor, 2001; Nohaile et al., 2001; Peral y Schmid, 2001; Sanchez-Ruiz y Makhatadze, 2001; Ibarra-Molero y Sanchez-Ruiz, 2002; Marshall et al., 2002; Martin et al., 2002; Makhatadze et al., 2003). La estimación experimental de las interacciones carga-carga en proteínas es de gran importancia. Esta estimación es usualmente llevada a cabo considerando la dependencia de los parámetros termodinámicos de los procesos en estudio con la concentración de cloruro sódico, asumiendo que las interacciones carga-carga son efectivamente apantalladas a concentraciones moderadas de NaCl, normalmente por debajo de 1 M. No obstante, a lo largo del tiempo se han acumulado evidencias que demuestran que en muchos casos, puentes salinos en la superficie pueden ser insensibles al NaCl, incluso cuando existe una clara interacción carga-carga (Perutz et al., 1985; Yu et al., 1996; Kao et al., 2000; Luisi et al., 2003). También, un trabajo de Dominy et al., (2002) mantiene que el NaCl apantalla de forma más efectiva interacciones de larga distancia que interacciones de corta distancia. Parece, por lo

tanto, que el apantallamiento completo de las interacciones carga-carga en proteínas por concentraciones moderadas de una sal, como NaCl, no puede darse por hecho.

Es por esto, que en la presente tesis nos planteamos estudiar la eficiencia de sales de diferente naturaleza en el apantallamiento de cargas.

Existen trabajos experimentales que sostienen que la tendencia de los agentes desnaturizantes es interactuar con la superficie de la proteína, mientras que los estabilizantes tienden a quedar excluidos de la superficie (Arakawa y Timasheff, 1984, 1985; Makhatadze y Privalov, 1992; Bolen y Baskarov, 2001; Courtenay et al., 2001). Parece probable que sales desnaturizantes, como el cloruro de guanidinio, se acumulan cerca de la superficie de la proteína, y como resultado, son muy eficientes en el apantallamiento de las interacciones carga-carga en proteínas. Para algunas proteínas, la dependencia del cambio de energía libre de desnaturización con la concentración de cloruro de guanidinio, muestra abruptas desviaciones de la linealidad a bajas concentraciones de desnaturizante ($< \sim 1M$), lo cual ha sido atribuido al apantallamiento de interacciones que implican grupos cargados (Santoro y Bolen, 1992; Monera et al., 1994; Ibarra-Molero y Sanchez-Ruiz, 1996; Ibarra-Molero et al., 1999a; Bolen y Yang, 2000; Garcia-Mira y Sanchez-Ruiz, 2001). En algunos casos las desviaciones han sido interpretadas en términos de uniones iónicas (Greene y Pace, 1974; Santoro y Bolen 1988; Pace et al., 1990; Hagihara et al., 1993; Mayr y Schmid, 1993; Makhatadze et al., 1998).

El estudio presentado aquí, está basado en la caracterización experimental del efecto de diferentes sales en la estabilidad termodinámica de tiorredoxina de *E. coli* y la variante T14K, diseñada, como veremos más adelante, mejorando las interacciones carga-carga en la superficie de la proteína, resultando ligeramente más estable que la forma silvestre. Como se verá, los resultados muestran un significativo apantallamiento de la sal desnaturizante, cloruro de guanidinio, al contrario de lo que ocurre con NaCl, sugiriendo que la eficiencia de diferentes sales para apantallar las interacciones carga-carga está correlacionada con la fuerza desnaturizante y en último extremo con la posición de los iones constituyentes en la serie de Hofmeister (Baldwin, 1996) que para aniones y cationes es:

- Aniones: $SO_4^{2-} > H_2PO_4^- > CH_3COO^- > Cl^- > Br^- > I^- > ClO_4^- > SCN^-$
- Cationes: $NH_4^+, Cs^+, K^+, Na^+ > Li^+ > Mg^{2+} > Ca^{2+} > Ba^{2+} > Gdn^+$

Además de cloruro sódico y cloruro de guanidinio se han realizado experimentos con tiocianato de guanidinio, una sal con un poder desnaturizante mayor al del cloruro de guanidinio.

El estudio de las interacciones electrostáticas y de su contribución a la estabilidad de tiorredoxina ha sido realizado empleando un modelo simple de cálculo que será descrito en la sección siguiente.

Para la estimación de la eficiencia de apantallamiento de diferentes sales se usa un proceso experimental basado en la premisa de que el apantallamiento de las

interacciones está reflejado en una clara dependencia no lineal del cambio de energía libre de desnaturalización en el rango $\sim 0-1$ M de concentración de sal. La comprobación experimental de esta dependencia es sencilla en el caso de las sales no desnaturalizantes como el NaCl. En el caso de las sales desnaturalizantes como el cloruro de guanidinio y el tiocianato de guanidinio, la contribución del apantallamiento al cambio de energía libre de desnaturalización se superpone a un gran descenso del cambio de energía libre de desnaturalización con la concentración de sal, asociado con el carácter desnaturalizante de estas sales. La detección del apantallamiento en estos casos puede ser más convenientemente llevada a cabo a partir del cálculo de valores de m , que no son más que las derivadas $-\partial\Delta G/\partial [\text{sal}]$. Estos valores se pueden obtener a partir de experimentos de calorimetría diferencial de barrido (Ibarra-Molero y Sanchez-Ruiz, 1996).

3.2 Estimación teórica de las interacciones carga-carga en la molécula de tiorredoxina.

Los cálculos electrostáticos fueron llevados a cabo con programas realizados en nuestro laboratorio. Estos programas están basados en el modelo simple de Tanford-Kirkwood (Tanford y Kirkwood, 1957; Matthews y Gurd, 1986) junto con la aproximación de Bashford-Karplus (1991), para el cálculo de fracciones de protonación.

Las energías de interacción entre cargas positivas unidad situadas en los sitios de protonación de grupos ionizables i y j vienen dadas por:

$$E_{ij} = \varepsilon^2 \left(\frac{A_{ij} - B_{ij}}{2b} - \frac{C_{ij}}{2a} \right) (1 - SA_{ij}) \quad (3.1)$$

donde ε es la carga unidad, A_{ij} , B_{ij} y C_{ij} son funciones de la posición de las cargas, las constantes dieléctricas de la proteína y el disolvente y en el caso de C_{ij} de la fuerza iónica, b es el radio de la esfera que representa la proteína, considerando que los iones de disolvente no pueden penetrar una esfera de radio mayor que a . Para los cálculos se ha tomado $a = b + 1.4$, siendo 1.4 el radio promedio en Å, para el catión y el anión de una sal típica como cloruro sódico. b se obtuvo a partir del volumen de la proteína calculado a partir de la masa molecular usando un valor típico para el volumen específico de 0.72 mL/g. Finalmente SA_{ij} representa la accesibilidad media al disolvente de los grupos i y j . La accesibilidad de un grupo se calcula como la relación entre el área superficial accesible al disolvente de la cadena lateral del grupo en la proteína nativa y en un tripéptido Gly-X-Gly en el cual la conformación de la cadena lateral es la misma que en la proteína nativa. Para los cálculos se empleó 78.5 y 4 como valores de constante dieléctrica para el disolvente y la proteína, respectivamente. Es importante hacer notar que en todos los cálculos se asume que las cargas están en posiciones superficiales en la proteína.

Para el cálculo de las fracciones de protonación de grupos ionizables se ha seguido el procedimiento descrito por Bashford y Karplus, el cual será expuesto a continuación.

Para una proteína con n grupos ionizables hay 2^n estados de protonación diferentes, los cuales están representados por los 2^n valores del vector de protonación χ , vector cuyos x_i elementos son 0 ó 1 dependiendo del estado de protonación del grupo correspondiente. El cambio de energía libre de Gibbs para un estado de protonación dado viene dado por:

$$\Delta G(\chi) = -RT(\ln 10) \sum_{i=1}^n (q_i + x_i) \cdot pK_{\text{int},i} + \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^n E_{ij} (q_i + x_i) \cdot (q_j + x_j) \quad (3.2)$$

donde q_i es la carga del grupo i en el estado no protonado y $pK_{\text{int},i}$ (pK intrínseco) es el pK del grupo i si todos los demás grupos tuvieran carga cero. Es importante hacer notar que de acuerdo con nuestro criterio, $\Delta G_N(\chi) = 0$ cuando las cargas de todos los grupos ionizables son cero, esto es, $q_i + x_i = 0$. Por lo tanto, se está considerando la proteína en estado neutro, es decir, con todos los grupos ionizables en su forma no cargada, para el cálculo del cambio de energía libre de Gibbs.

La fracción de proteína nativa presente en un estado de protonación dado viene dada por:

$$\rho_N(\chi) = \frac{1}{Z_N} \exp \left[-\frac{\Delta G_N(\chi)}{RT} - \nu(\chi) \cdot (\ln 10) \cdot pH \right] \quad (3.3)$$

siendo $\nu(\chi)$ el número de grupos ionizables protonados en ese estado de protonación y Z_N la función de partición de protonación de la proteína nativa:

$$Z_N = \sum_{\chi} \exp \left[-\frac{\Delta G_N(\chi)}{RT} - \nu(\chi) \cdot (\ln 10) \cdot pH \right] \quad (3.4)$$

donde la suma está extendida a los 2^n valores del vector de protonación χ .

La fracción de protonación de un grupo i en la proteína nativa (θ_i), la energía de interacción carga-carga entre dos grupos ionizables ($\langle W_{ij} \rangle$) y la energía de interacción total en la proteína nativa ($\langle W_{q-q} \rangle$) son promedios de todos los estados de protonación. El valor de la energía de interacción total viene dado por:

$$\langle W_{q-q} \rangle = \sum_{\chi} \left[\sum_{i,j=1}^n -E_{ij}(q_i + x_i) \cdot (q_j + x_j) \right] \cdot \rho_N(\chi) = \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^n \langle W_{ij} \rangle \quad (3.5)$$

Las ecuaciones (3.3) y (3.4) están referidas al estado nativo. Asumiendo que los valores de pK intrínseco son iguales en ambos estados, nativo y desplegado, entonces para el estado desplegado tenemos:

$$\Delta G_U(\chi) = -RT \cdot (\ln 10) \sum_{i=1}^n (q_i + x_i) \cdot pK_{\text{int},i} \quad (3.6)$$

ecuación muy similar a (3.2) pero en la cual no se ha incluido el término de interacción carga-carga. Entonces, la fracción de proteína desplegada presente en un estado de protonación determinado $[\rho_U(\chi)]$ y la función de partición de la proteína desplegada Z_U pueden ser calculadas como en las ecuaciones (3.3) y (3.4) pero usando ΔG_U . Finalmente, como las formas neutras son tomadas como referencia para las funciones de

partición Z_N y Z_U , la contribución de las interacciones carga-carga al cambio de energía de Gibbs de desplegamiento viene dada por:

$$\Delta G_{q-q} = -RT \cdot \ln \left(\frac{Z_U}{Z_N} \right) \quad (3.7)$$

Las ecuaciones anteriores implican sumatorias extendidas a los 2^n estados de protonación, lo cual supone una tarea prácticamente imposible. Para solucionar este problema se ha usado la aproximación de Bashford-Karplus con límites máximos y mínimos para las fracciones de protonación de 0.999 y 0.001, respectivamente.

Si hacemos el cálculo de las energías de interacción carga-carga para el caso de tiorredoxina a pH 7 obtenemos el resultado expuesto en la figura 3.1.

En la gráfica de barras de la figura 3.1 valores positivos de W_{q-q} indican que el residuo en cuestión está implicado en interacciones predominantemente destabilizantes con grupos de igual carga; por el contrario, valores negativos de energía de interacción indican interacciones estabilizantes con grupos de carga opuesta. A la vista de los resultados expuestos en la figura 3.1, la mayoría de las interacciones carga-carga son claramente estabilizantes a pH 7. Parece pues, que en este caso, la distribución de carga ha sido optimizada para estabilizar de forma significativa la proteína. La energía de interacción carga-carga, calculada como la suma de todas las parejas de energías de interacción, resulta ser para tiorredoxina nativa ~ -22 kJ/mol. Este es un valor significativo comparado con valores típicos de cambio de energía de Gibbs de

desnaturalización. Las interacciones electrostáticas pueden también ocurrir en el estado desnaturalizado (Pace et al., 2000; Guzman-Casado et al., 2003) y contribuir al cambio de energía libre de Gibbs de desnaturalización. Sin embargo, parece razonable asumir en este caso, que las interacciones electrostáticas en el estado desnaturalizado no cancelan completamente las fuertes interacciones estabilizantes en el estado nativo. Por tanto, podemos esperar una contribución significativa de las interacciones carga-carga a la estabilidad termodinámica de tiorredoxina.

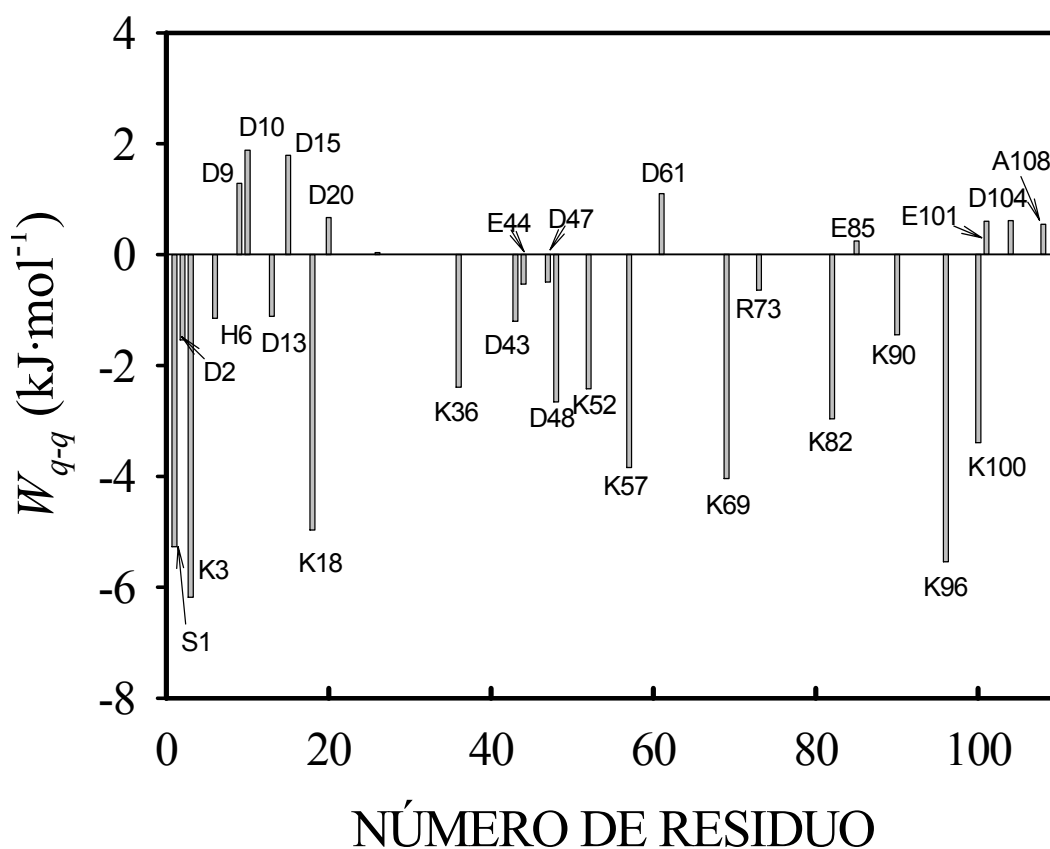


Figura 3.1. Gráfica de barras de las energías de interacción carga-carga para todos los grupos ionizables de tiorredoxina calculadas a pH 7. Los valores positivos, indican aminoácidos involucrados en interacciones desestabilizantes, por el contrario valores negativos, se refieren a aminoácidos que interactúan de forma estabilizante.

3.3 Diseño del mutante T14K.

El procedimiento de cálculo de interacciones electrostáticas puede ser utilizado con fines prácticos para diseñar distribuciones de carga estabilizantes. Para tal fin, se pueden llevar a cabo varias estrategias. Una puede ser la mutación de grupos cargados que estén involucrados en interacciones desestabilizantes introduciendo en su lugar residuos de inversión de carga. Otra estrategia sería la sustitución de residuos neutros por residuos cargados que produzcan interacciones estabilizantes.

Como se ha dicho antes, la distribución de cargas para el caso de tiorredoxina parece haber sido diseñada para estabilizar, por tanto, y a la vista de la figura 3.1 no encontramos ninguna posición en la que una inversión de carga produzca un efecto notable en la estabilidad. Es por ello por lo que decidimos crear interacciones nuevas mediante la mutación de residuos neutros por residuos cargados con el fin de producir un incremento en la estabilidad (Sanchez-Ruiz y Makhatadze, 2001). Para tal fin, la estrategia que se llevó a cabo fue la de mutar (primero de forma virtual), con ayuda del programa comercial Swiss Viewer v3.7b2, residuos polares neutros en posiciones superficiales por glutamato y lisina y hacer los cálculos de energías de interacción con objeto de comprobar cuales de todas las mutaciones realizadas eran estabilizantes. Los residuos polares neutros que se intercambian poseen en todos los casos un área superficial accesible al disolvente (ASA) superior a 0.5. El cálculo del ASA se realiza usando una modificación del algoritmo de Shrake-Rupley (Shrake y Rupley, 1973), el cual aleatoriamente coloca 2000 puntos en la esfera de van der Waals que representa cada átomo. En el cálculo de la energía de interacción se tuvieron en cuenta todos los

posibles rotámeros estéricamente permitidos de los nuevos residuos introducidos. El resultado de los cálculos se muestra en la figura 3.2, como la diferencia entre la energía de interacción carga-carga total calculada para la forma mutante y la correspondiente a la forma silvestre.

Como puede verse en la figura 3.2 los valores obtenidos son moderados, no obstante, la variante T14K presenta un valor de energía de interacción en el estado nativo de ~ 2.5 kJ/mol menor que el correspondiente a la forma silvestre, siendo esta variante la mejor candidata en términos de estabilización. Esta variante ha sido obtenida experimentalmente y caracterizada mediante calorimetría diferencial de barrido, resultando ser, de acuerdo con las predicciones teóricas, más estable que la forma silvestre, como puede verse en la figura 3.3. Los experimentos de calorimetría se realizaron en HEPES 5 mM pH 7 a concentración de proteína 0.5 mg/mL, y en ambos casos se encontró una alta reversibilidad, ~ 95 %, calentando hasta justo después de la transición. Para las formas WT y T14K las temperaturas de desnaturalización son 88.8 ± 0.4 °C y 89.9 ± 0.4 °C, respectivamente

La diferencia en la temperatura de desnaturalización entre T14K y WT es pequeña pero reproducible. Esta diferencia se calcula como $\Delta T_m = T_m(\text{T14K}) - T_m(\text{WT})$. Se llevaron a cabo tres experimentos con cada una de las formas y las diferencias encontradas estuvieron entorno a 1.1 K.

Es importante hacer notar que la lisina introducida en posición 14 está altamente expuesta al disolvente, con un valor de área expuesta a disolvente de 0.81 ± 0.04 , valor

calculado como media de todos los rotámeros. Por tanto la comparación de la estabilidad de la variante T14K con tiorredoxina WT ofrece un modelo apropiado para el estudio de la eficiencia de las sales en el apantallamiento de una carga expuesta.

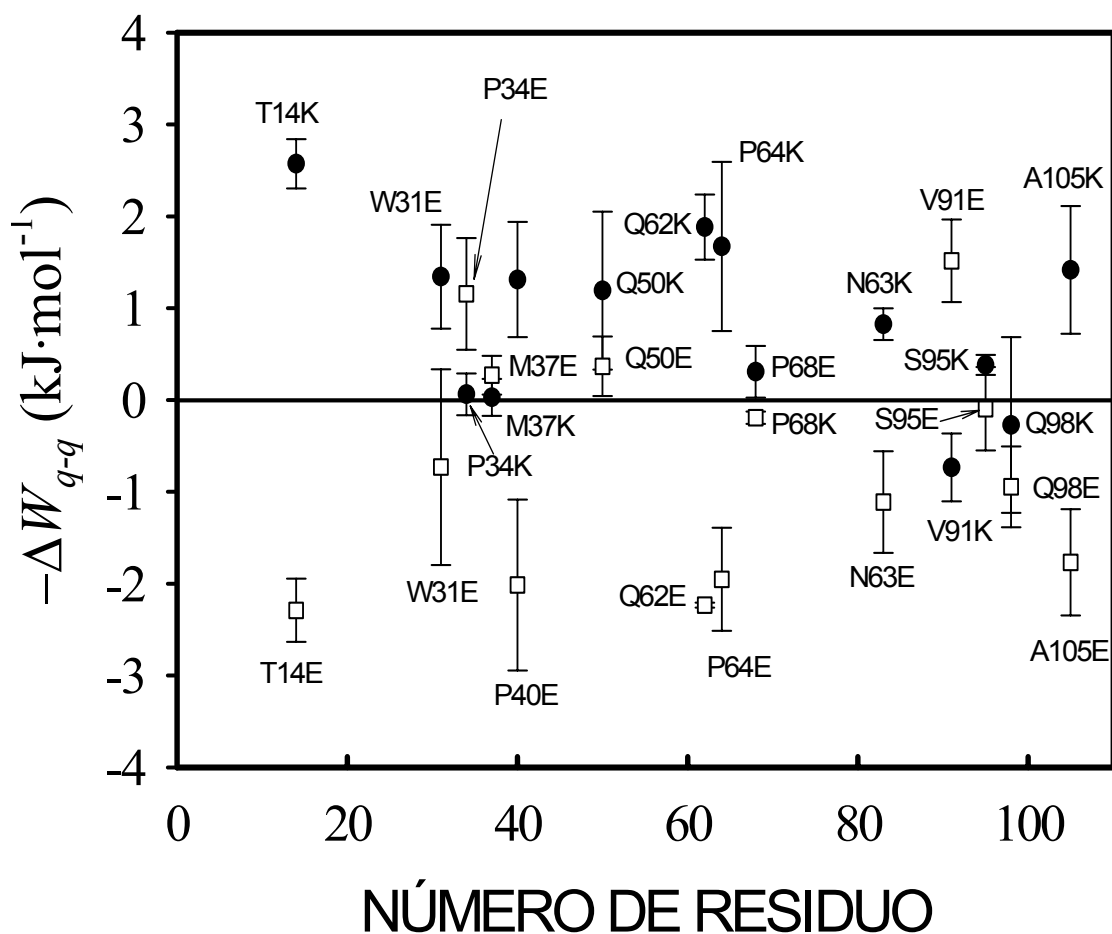


Figura 3.2. Diferencia en las energías de interacción carga-carga calculadas para mutantes de tiorredoxina en los cuales se han intercambiado residuos superficiales neutros por Lys y Glu. ΔW es la diferencia de energía entre la energía de interacción total calculada para los mutantes y la correspondiente a la forma silvestre. Los cálculos fueron llevados a cabo para todos los rotámeros estéricamente permitidos de la nueva cadena.

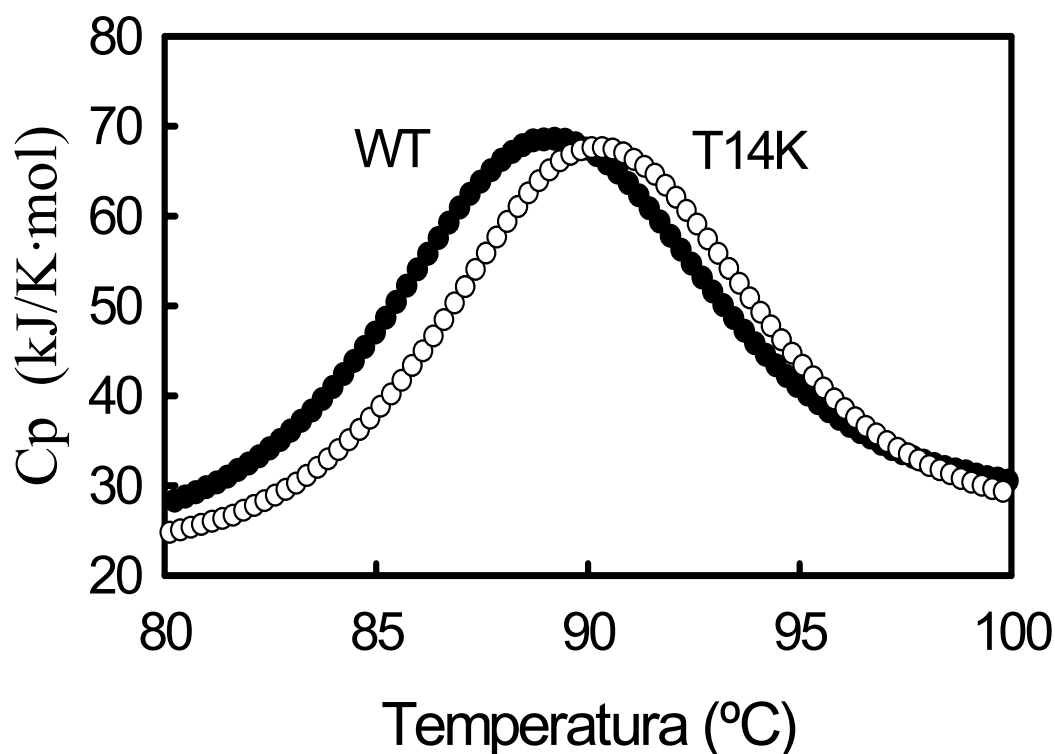


Figura 3.3. Perfiles de capacidad calorífica absoluta frente a temperatura para las desnaturalizaciones térmicas de tiorredoxina WT y mutante T14K a pH 7 en HEPES 5 mM y concentración de proteína 0.5 mg/mL. El desplazamiento en la temperatura de desnaturalización de T14K con respecto a WT es de 1.1 °C

Merece la pena destacar que la desnaturalización térmica de tiorredoxina WT se adapta a un escenario de dos macroestados basado en el análisis de barreras de energía variable recientemente propuesto por Muñoz y Sanchez-Ruiz (2004).

3.4 Estudios de Dicroísmo Circular de tiorredoxina WT y mutante T14K.

De ambas formas, tiorredoxina WT y mutante T14K, se realizaron experimentos de CD tanto en el ultravioleta cercano como en el lejano y en condiciones en las cuales

ambas proteínas se encontraban en estado nativo, pH 7 en HEPES 5 mM a 20 °C y concentración de cloruro de guanidinio en el rango 0-1.6 M. La concentración de proteína fue 0.8 mg/mL en el ultravioleta cercano y 0.2 mg/mL en el lejano. Como puede verse en la figura 3.4, parece que tanto la presencia del cloruro de guanidinio como el efecto de la mutación tienen un bajo efecto en los espectros en estado nativo.

Debido a limitaciones técnicas no se pudieron realizar espectros a temperaturas superiores a 90 °C. Los espectros de los estados desnaturalizados, tanto de la forma silvestre como de la variante T14K, fueron obtenidos a 85 °C y concentraciones de cloruro de guanidinio de 1M y 1.6 M, concentraciones a las cuales las temperaturas de desnaturalización en ambos casos se encuentran por debajo de los 70 °C (ver figura 3.5). Los espectros del estado desnaturalizado en el ultravioleta lejano son bastante similares para las dos formas y sugieren algún tipo de estructura residual en el estado desnaturalizado. Realmente sólo una pequeña diferencia entre el estado nativo y desnaturalizado puede ser observada en los espectros de ultravioleta lejano en la región comprendida entre 210-260 nm. En el caso de los espectros en la región del ultravioleta cercano, la señal está esencialmente ausente para el caso del estado desnaturalizado para ambas proteínas, como puede verse en la figura 3.4.

La medida del cambio en la elipticidad a 280 nm puede usarse para el seguimiento de la desnaturalización térmica (ver figura 3.5). Estos perfiles pueden analizarse de acuerdo con el modelo de dos estados, ecuaciones (2.40), (2.41) y (2.42), expuesto en el apartado 2.2.6.4.

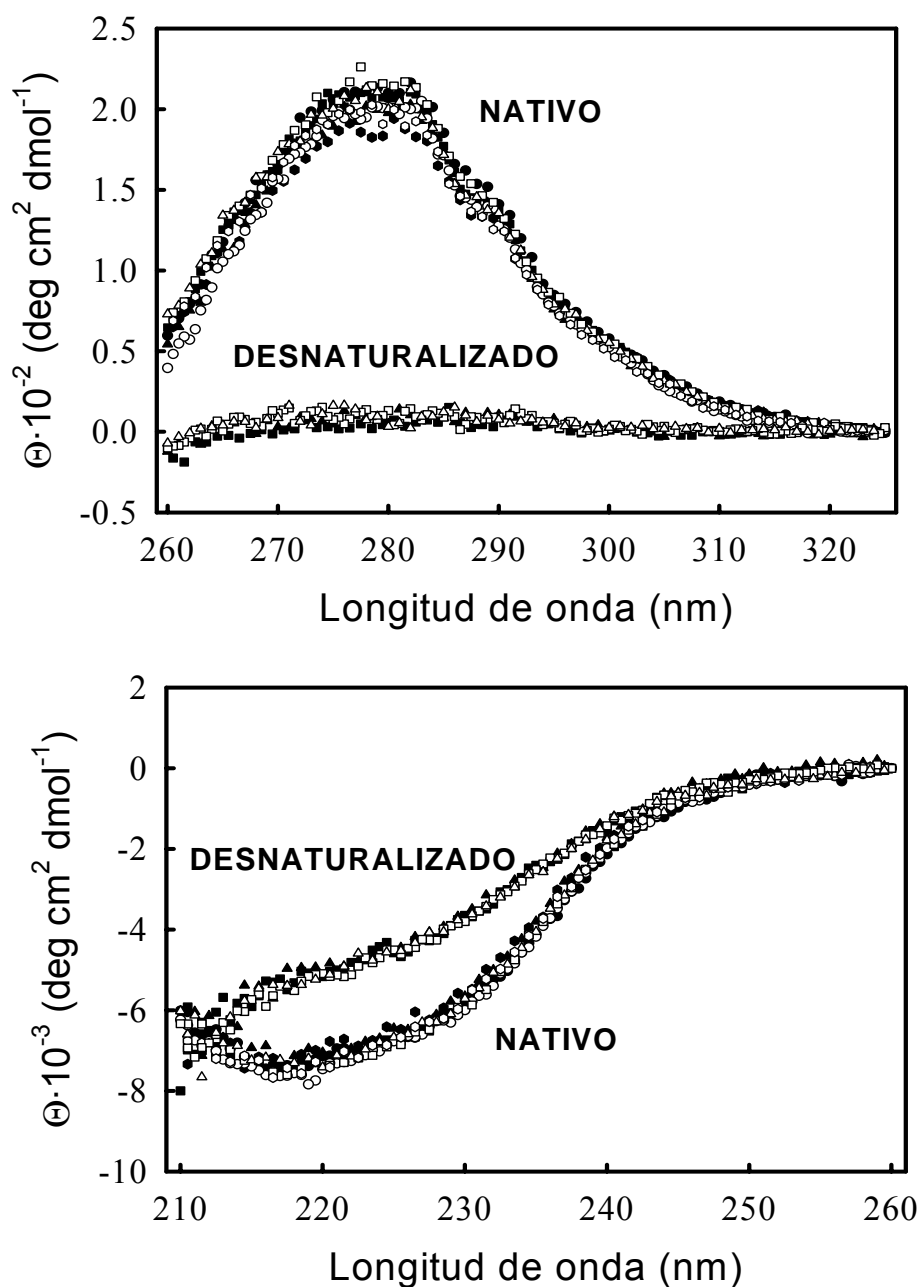


Figura 3.4. Espectros de CD, UV-cercano (arriba); UV-lejano (abajo), para tiorredoxina WT (símbolos rellenos) y mutante T14K (símbolos huecos) en estados nativo y desnaturalizado. Los diferentes símbolos se refieren a las concentraciones de cloruro de guanidinio: 0 M, círculos; 0.5 M, hexágonos; 1M, cuadrados y 1.6 M, triángulos. Los espectros del estado nativo fueron obtenidos a 20°C y los espectros de estado desnaturalizado a 85°C. El tampón empleado fue HEPES 5mM pH 7 y concentración de proteína 0.8 mg/mL en UV-cercano y 0.2 mg/mL en UV-lejano. La velocidad de barrido fue de 50 nm/min.

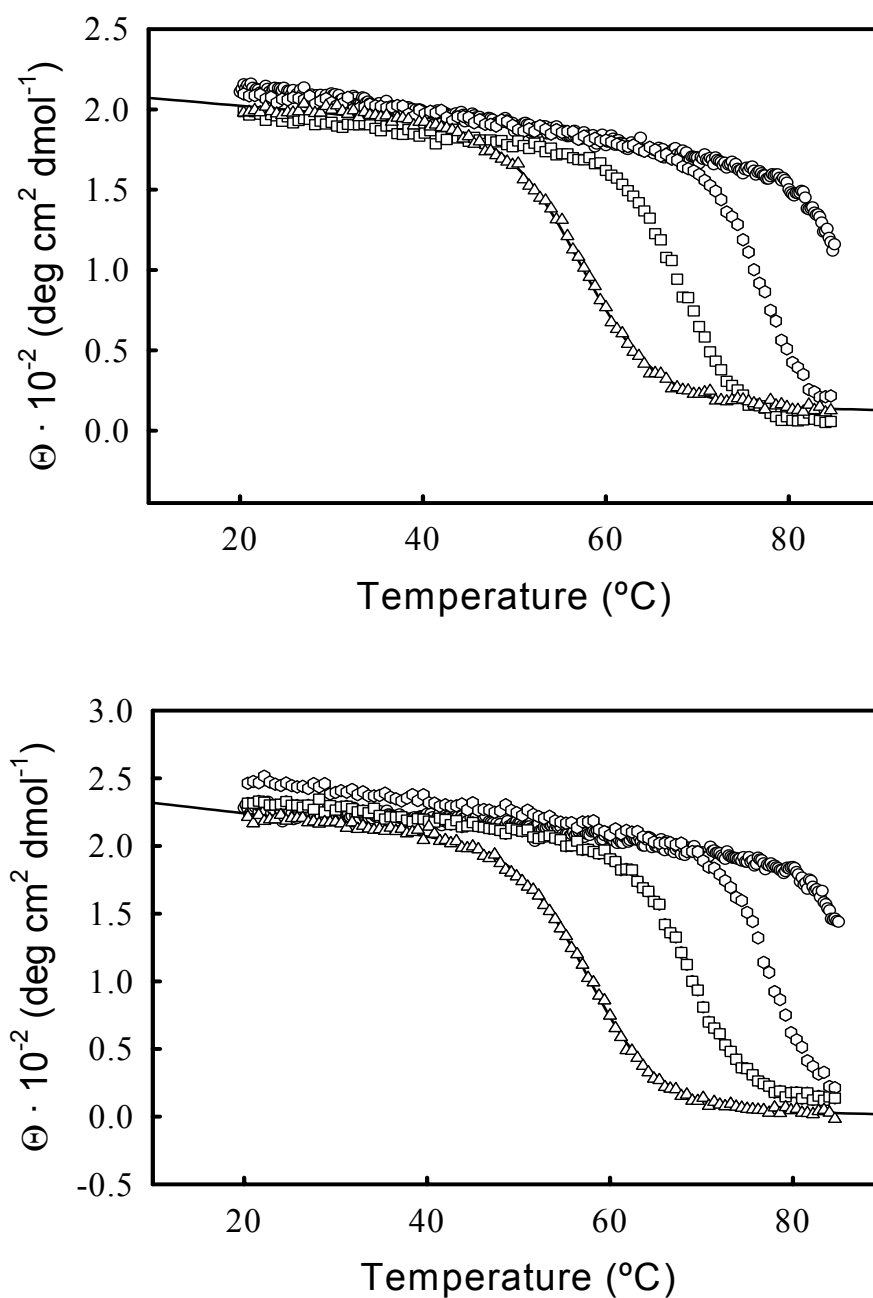


Figura 3.5. Desnaturalización térmica de tiorredoxina WT y mutante T14K a pH 7 seguidas mediante el cambio de la elipticidad a 280 nm. Las concentraciones de cloruro de guanidinio están indicadas. Las líneas continuas representan en ambos casos el mejor ajuste al modelo de dos estados para los perfiles de desnaturalización a 1.6 M guanidina, para los cuales se observan las líneas base de la pre- y post-transición. De estos ajustes, ecuaciones (2.40), (2.41) y (2.42), se obtuvieron $T_m = 58^\circ\text{C}$ y $\Delta H_m = 223 \text{ kJ/mol}$ para WT y $T_m = 58^\circ\text{C}$ y $\Delta H_m = 235 \text{ kJ/mol}$ para la forma T14K. El tampón empleado fue HEPES 5mM pH 7 y concentración de proteína 0.8 mg/mL.

3.5 Efecto del cloruro de guanidinio en la desnaturalización térmica de tiorredoxina WT y mutante T14K seguido por DSC.

Se han llevado a cabo experimentos de calorimetría diferencial de barrido con tiorredoxina WT y el mutante T14K a pH 7 y en presencia de cloruro de guanidinio a concentraciones comprendidas dentro del rango 0-2M y concentración de proteína 0.5 mg/mL. Las figuras 3.6 y 3.7 muestran los perfiles de DSC, para ambas proteínas a diferentes concentraciones de cloruro de guanidinio. Las tablas 3.1 y 3.2 muestran los valores de temperatura de desnaturalización y cambio de entalpía, obtenidos para estos experimentos. Los ajustes de todos los termogramas se realizaron siguiendo el modelo de dos estados expuesto en la sección 2.4. No obstante, la ecuación (2.8) da la dependencia de la capacidad calorífica de exceso, tomando el estado nativo como referencia, con la temperatura, de manera que si pasamos el término C_p^N al segundo miembro, resulta:

$$C_p = \frac{(\Delta_N^D H)^2}{RT^2} \cdot \frac{K}{(1+K)^2} + \frac{K}{1+K} \cdot \Delta_N^D C_p + C_p^N \quad (3.8)$$

Para los ajustes hemos considerado $C_p^N = a + b \cdot T$ y $C_p^D = c + d \cdot T$ además de la ecuación (2.9). Teniendo en cuenta estas consideraciones, se pueden realizar los ajustes de todas las trazas calorimétricas mediante la ecuación (3.8).

Los datos obtenidos de estos análisis fueron consistentes con los datos obtenidos mediante los experimentos de dicroísmo circular en la región de ultravioleta cercano.

En las condiciones estudiadas, las desnaturalizaciones térmicas de tiorredoxina WT y mutante T14K fueron altamente reversibles, por encima del 90 %, no obstante a concentraciones altas de cloruro de guanidinio el tanto por ciento de reversibilidad disminuye hasta ~ 80%.

Como es sabido (Plaza del Pino y Sanchez-Ruiz, 1995; Ibarra-Molero et al., 1999b), la reproducibilidad de líneas base instrumentales en presencia de codisolventes como cloruro de guanidinio es bastante pobre, por lo que el cálculo de capacidades caloríficas absolutas a partir de termogramas de DSC no es posible. No obstante, la reproducibilidad de las líneas base en tampones acuosos es bastante alta y para el caso de la mutación T14K no se encontró efecto de la mutación en los valores de capacidad calorífica absoluta de los estados nativo y desnaturalizado, si bien el mutante es ligeramente más estable que la forma silvestre, como se ha mostrado en la figura 3.3.

Más adelante, en la figura 3.11, se muestra una representación de temperatura de desnaturalización frente a concentración de desnaturalizante. Como era de esperar, el valor de T_m decrece de forma notable con la concentración de cloruro de guanidinio.

En la figura 3.12, se muestran valores de cambio de entalpía de desnaturalización, obtenidos de los ajustes, para ambas proteínas. Cada punto de esta representación corresponde a diferentes concentraciones de desnaturalizante. Es por esto que las pendientes de estas representaciones no deben ser relacionadas con los correspondientes cambios de capacidad calorífica.

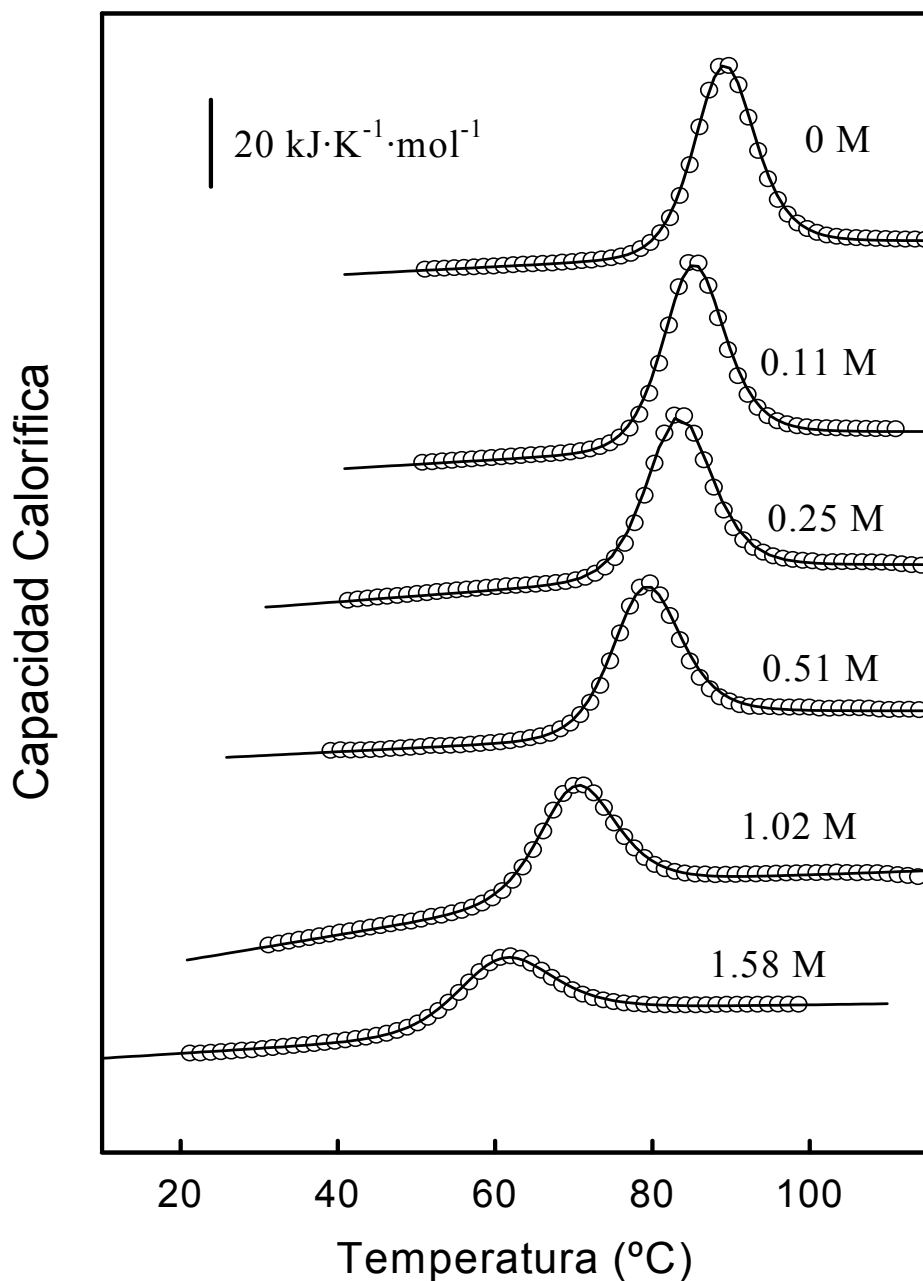


Figura 3.6. Perfiles de DSC de tiorredoxina WT a diferentes concentraciones de cloruro de guanidinio, en tampón HEPES 5 mM pH 7 y concentración de proteína 0.5 mg/mL. Los círculos representan los valores experimentales y las líneas el ajuste de los datos experimentales según el modelo de dos estados empleando la ecuación (3.8).

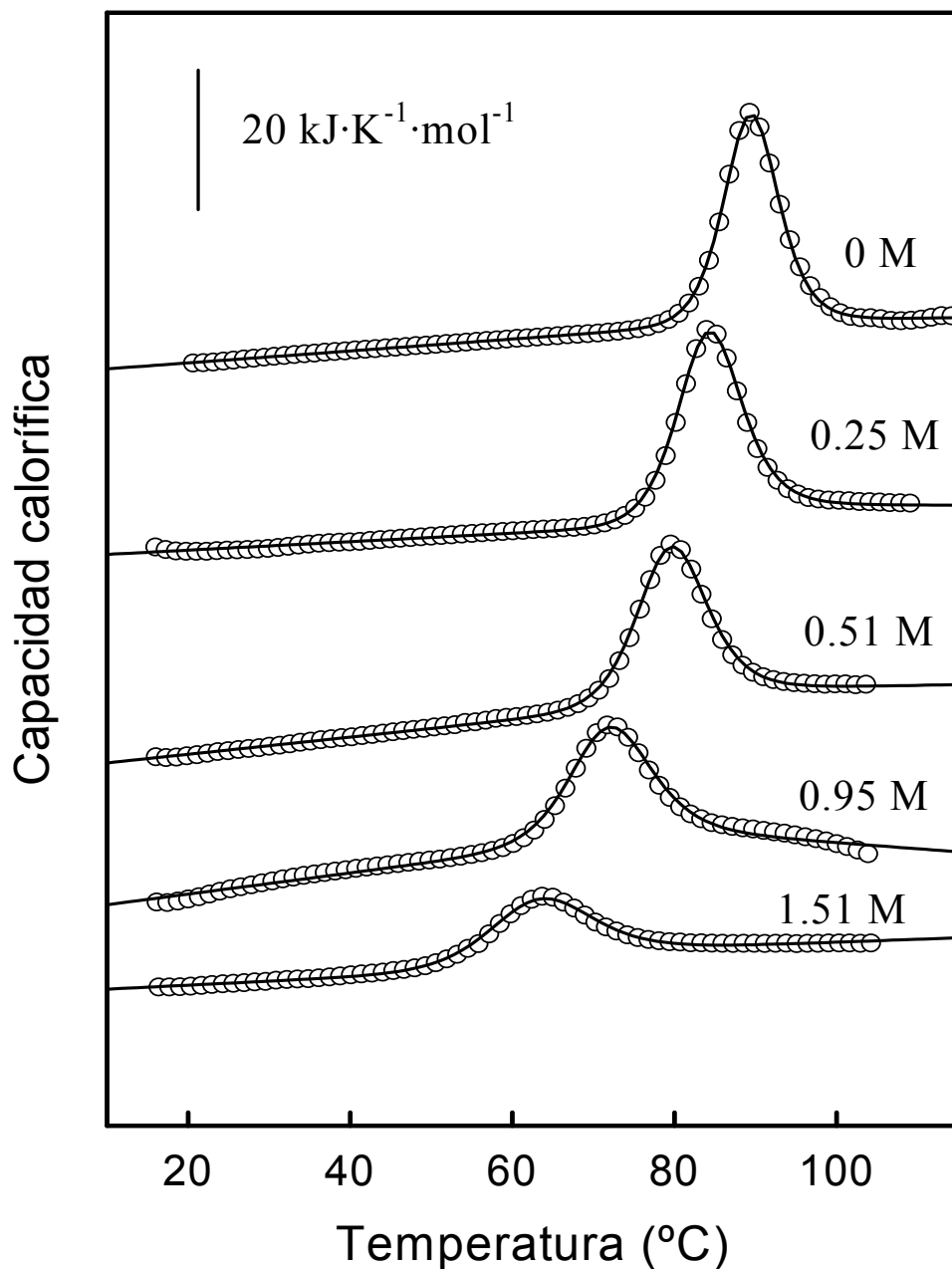


Figura 3.7. Perfiles de DSC de tioredoxina variante T14K a diferentes concentraciones de cloruro de guanidinio, en tampón HEPES 5 mM pH 7 y concentración de proteína 0.5 mg/mL. Los círculos representan los valores experimentales y las líneas el ajuste de los datos experimentales según el modelo de dos estados empleando la ecuación (3.8).

3. Interacciones electrostáticas

[GdnHCl] (M)	T_m (°C)	ΔH_m (kJ/mol)
0	88.8	427
0.11	85.3	421
0.25	83.2	386
0.51	79.4	360
1.02	70.5	305
1.58	61.1	232
1.98	50.3	169

Tabla 3.1. Valores de temperatura de desnaturalización y cambio de entalpía para WT en GdnHCl, determinados por calorimetría diferencial de barrido y ajustando los datos experimentales según el modelo de dos estados, ecuación (3.8). Asumimos ± 0.4 °C como error para T_m y ± 10 kJ/mol como error para ΔH_m .

[GdnHCl] (M)	T_m (°C)	ΔH_m (kJ/mol)
0	89.9	426
0.25	84.3	408
0.51	79.6	366
0.95	72.1	300
1.51	62.9	224

Tabla 3.2. Valores de temperatura de desnaturalización y cambio de entalpía para la forma T14K en GdnHCl, determinados por calorimetría diferencial de barrido y ajustando los datos experimentales según el modelo de dos estados, ecuación (3.8). Asumimos ± 0.4 °C como error para T_m y ± 10 kJ/mol como error para ΔH_m .

3.6 Efecto del tiocianato de guanidinio en la desnaturalización térmica de tiorredoxina WT seguido por DSC .

Al igual que con cloruro de guanidinio, para el caso de tiorredoxina WT se han realizado experimentos de desnaturalización térmica en presencia de tiocianato de guanidinio, en el rango de concentración 0-0.8 M. Los perfiles de DSC para tiorredoxina WT se muestran en la figura 3.8, los cuales también fueron ajustados según el modelo de dos estados empleando la ecuación (3.8). La tabla 3.3 muestra los parámetros termodinámicos obtenidos del ajuste.

El tiocianato de guanidinio posee un poder desnaturalizante muy superior al del cloruro de guanidinio. De hecho, concentraciones por encima de 1 M dan como resultado temperaturas de transición cercanas a la temperatura ambiente. Los cambios de entalpía de desnaturalización obtenidos son bastante pequeños, lo cual se refleja en transiciones bastante anchas, por lo que la información obtenida de los termogramas de calorimetría diferencial de barrido no es muy útil.

Por supuesto, todo lo anteriormente mencionado acerca de la reproducibilidad de líneas base es aplicable también con el tiocianato de guanidinio. En la figura 3.11 están representados los valores de temperatura de desnaturalización frente a concentración de desnaturalizante. Por otro lado, los valores de cambio de entalpía de desnaturalización frente a concentración se muestran en la figura 3.12.

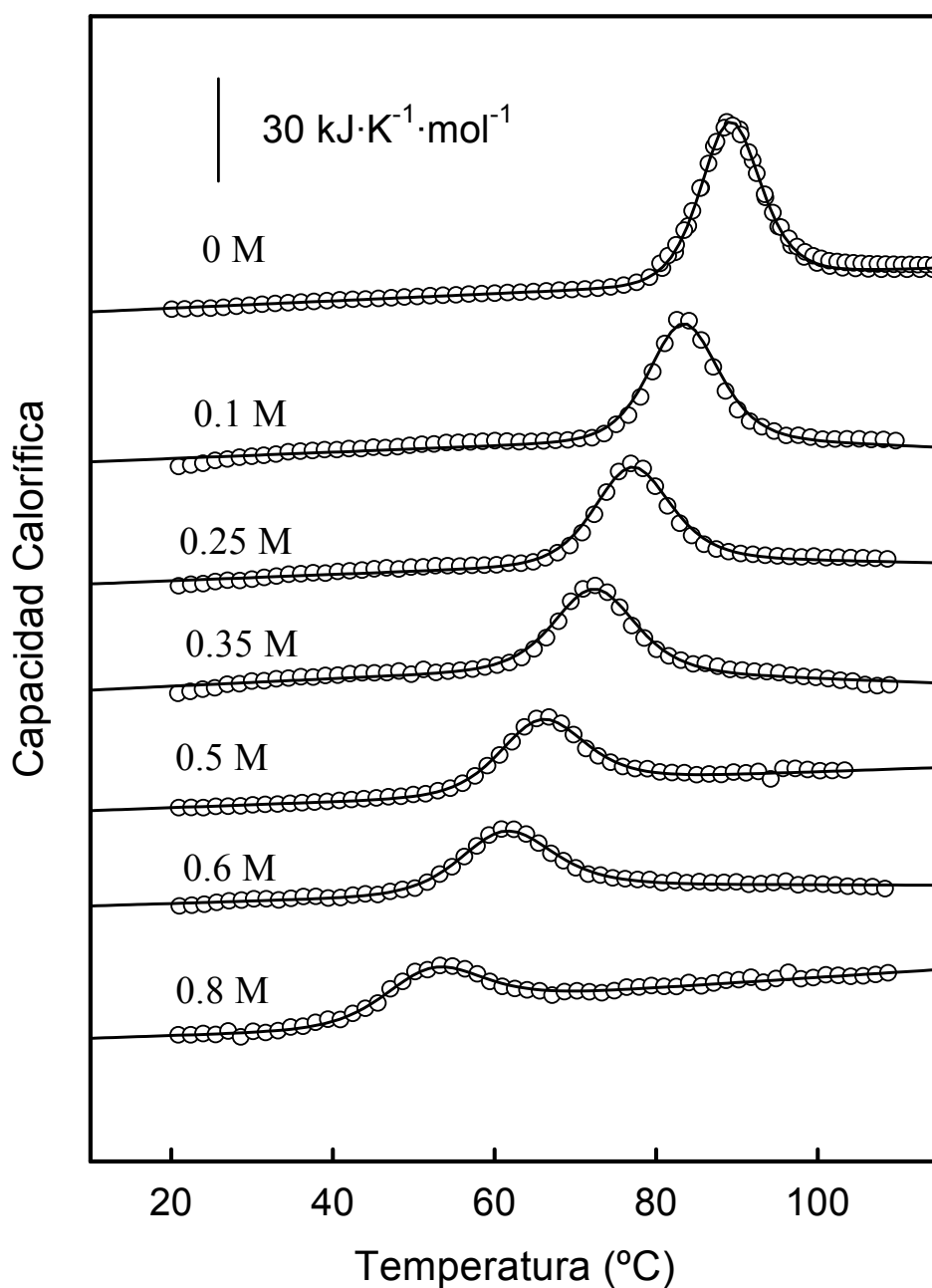


Figura 3.8. Perfiles de DSC de tiorredoxina WT a diferentes concentraciones de tiocianato de guanidinio, en tampón HEPES 5 mM pH 7 y concentración de proteína 0.5 mg/mL. Los círculos representan los valores experimentales y las líneas el ajuste de los datos experimentales según el modelo de dos estados empleando la ecuación (3.8).

[GdnSCN] (M)	T_m (°C)	ΔH_m (kJ/mol)
0.10	83.5	372
0.25	77.1	329
0.35	72.5	300
0.50	65.9	274
0.60	61.5	248
0.80	52.3	217

Tabla 3.3. Valores de temperatura de desnaturalización y cambio de entalpía para WT en GdnSCN, determinados por calorimetría diferencial de barrido y ajustando los datos experimentales según el modelo de dos estados, ecuación (3.8). Asumimos ± 0.4 °C como error para T_m y ± 10 kJ/mol como error para ΔH_m .

3.7 Efecto del cloruro sódico en la desnaturalización térmica de tiorredoxina WT y mutante T14K seguido por DSC.

Además de los experimentos anteriormente mencionados, también se llevaron a cabo experimentos en presencia de distintas concentraciones de cloruro sódico, tanto para tiorredoxina WT como para la variante T14K, también en HEPES 5mM a pH 7.

Las concentraciones de cloruro sódico empleadas estuvieron en el rango 0-2M, y al igual que en los casos anteriores, los ajustes también se realizaron según el modelo de dos estados, ecuación (3.8). En el caso del cloruro sódico la desnaturalización térmica se mostró altamente reversible, por encima del 90 %. Los perfiles de los termogramas se muestran en las figuras 3.9 y 3.10 y los valores de los parámetros

termodinámicos obtenidos, en la tabla 3.4. El efecto en los perfiles de DSC de la concentración de cloruro sódico, fue realmente pequeño. Como puede verse en la figura 3.11 el efecto en la temperatura de desnaturalización es poco apreciable, y puede traducirse en un pequeño incremento lineal. Los valores de cambio de entalpía de desnaturalización no sufren prácticamente cambio en el rango entre 0 y 1 M, si bien parecen decrecer ligeramente a concentraciones de cloruro sódico por encima de 1 M.

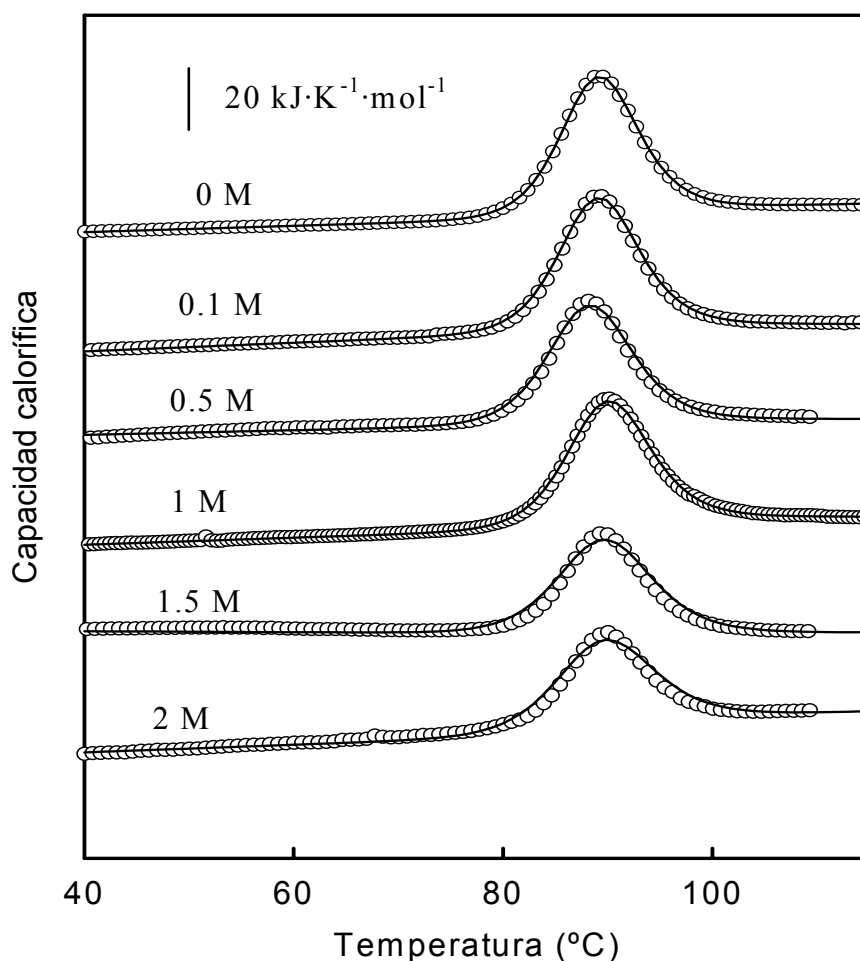


Figura 3.9. Perfiles de DSC de tiorredoxina WT a diferentes concentraciones de cloruro sódico, en tampón HEPES 5 mM pH 7 y concentración de proteína 0.5 mg/mL. Los círculos representan los valores experimentales y las líneas el ajuste de los datos experimentales según el modelo de dos estados empleando la ecuación (3.8)

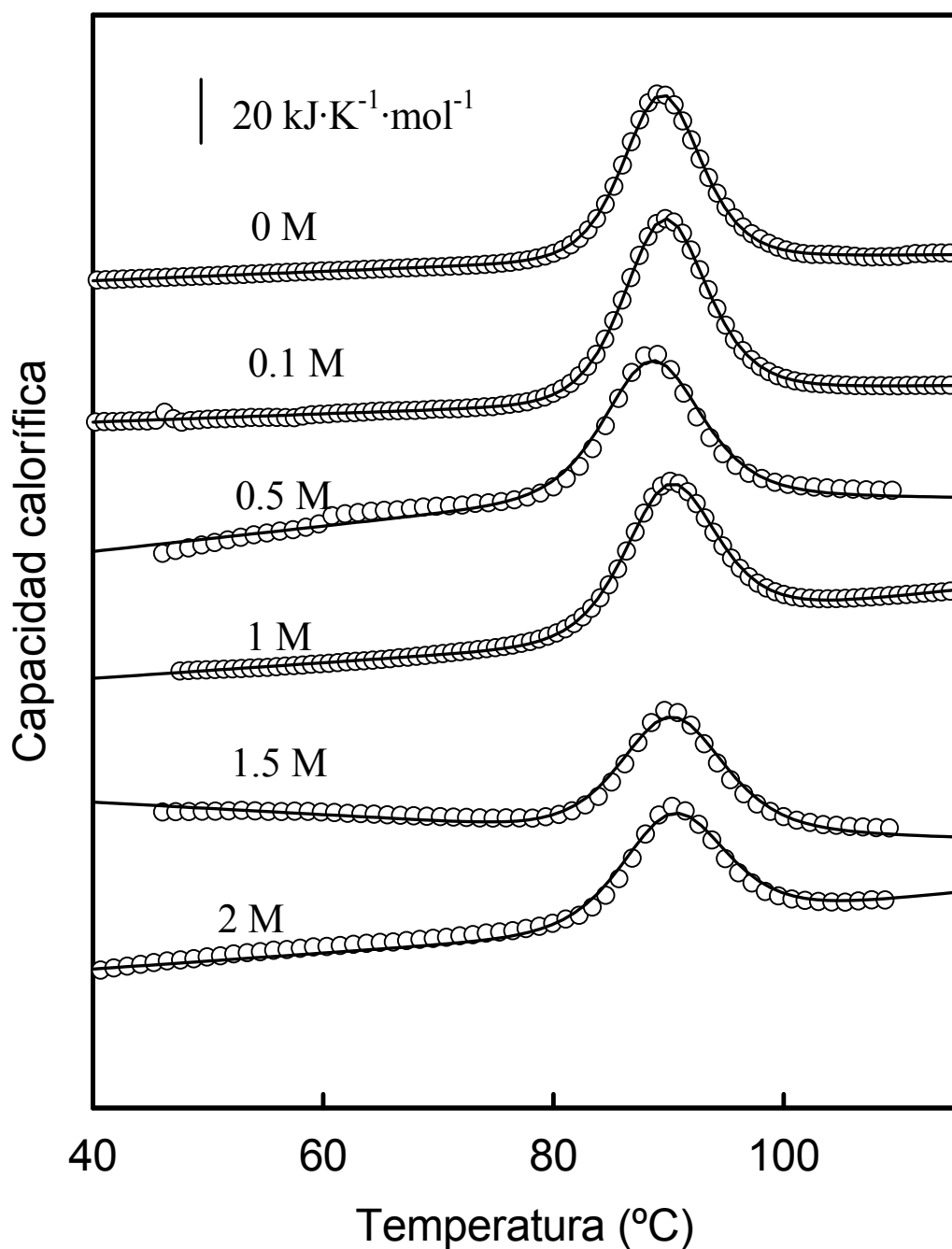


Figura 3.10. Perfiles de DSC de tiorredoxina variante T14K a diferentes concentraciones de cloruro sódico, en tampón HEPES 5 mM pH 7 y concentración de proteína 0.5 mg/mL. Los círculos representan los valores experimentales y las líneas el ajuste de los datos experimentales según el modelo de dos estados empleando la ecuación (3.8).

[NaCl] (M)	T _m (°C)		ΔH _m (kJ/mol)	
	WT	T14K	WT	T14K
0.1	89.2	89.7	433	460
0.5	88.8	88.6	409	419
1.0	89.9	90.2	420	421
1.5	89.8	90.3	378	371
2.0	89.9	90.4	382	380

Tabla 3.4. Valores de temperatura de desnaturalización y cambio de entalpía para WT y T14K en NaCl, determinados por calorimetría diferencial de barrido y ajustando los datos experimentales según el modelo de dos estados, ecuación (3.8). Asumimos ± 0.4 °C como error para T_m y ± 10 kJ/mol como error para ΔH_m .

3.8 Cálculo del cambio de energía libre de Gibbs.

Los experimentos de DSC realizados nos permitirán obtener parámetros termodinámicos para construir las curvas de estabilidad que, como se explicó en el apartado 2.2.3, son las representaciones de ΔG frente a temperatura. Para hacer estas representaciones se han hecho dos suposiciones diferentes. En primer lugar, que el cambio de capacidad calorífica de desnaturalización es independiente de la temperatura. Para el cálculo del cambio de energía libre, se usa la ecuación integrada de Gibbs-Helmholtz considerando ΔC_p constante. El cálculo de ΔC_p se realiza por extrapolación a la T_m de las líneas base de la pre- y post-transición. En segundo lugar, teniendo en cuenta la dependencia de ΔC_p con la temperatura, y asumiendo para el cálculo de ΔC_p (T), que la capacidad calorífica del estado desnaturalizado es igual a la esperada para un estado desplegado totalmente solvatado estimada a partir de las contribuciones de

grupos (Makhatadze y Privalov, 1990). Es importante señalar que los procedimientos señalados consideran dos suposiciones diferentes y que la comparación de las dos curvas de estabilidad obtenidas ofrece una estimación de la incertidumbre en el cálculo de ΔG a partir de datos de DSC.

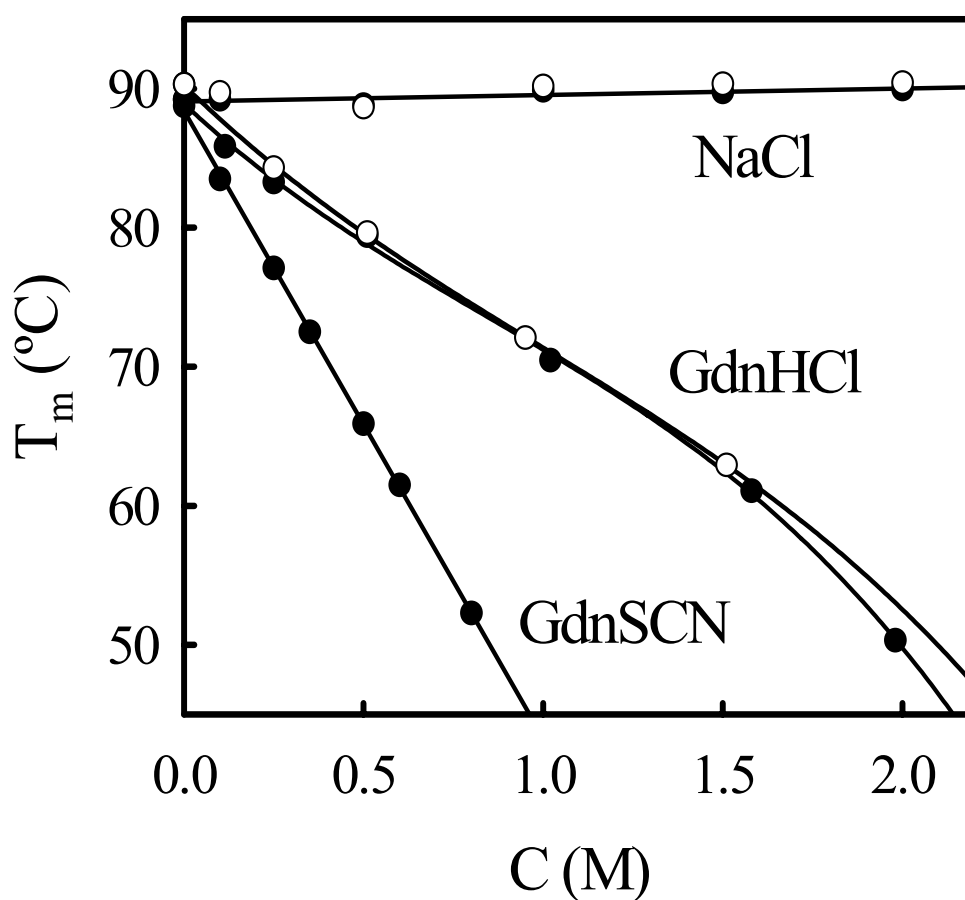


Figura 3.11. Temperatura de desnaturalización frente a concentración de sal (cloruro sódico, cloruro de guanidinio y tiocianato de guanidinio) a pH 7. Los círculos rellenos corresponden a WT y los huecos a T14K y son los datos experimentales obtenidos del ajuste de trazas de DSC. Las líneas representan, en cada caso, el mejor ajuste a los datos experimentales, a un polinomio de primer orden para cloruro sódico y tiocianato de guanidinio, y de tercer orden para cloruro de guanidinio.

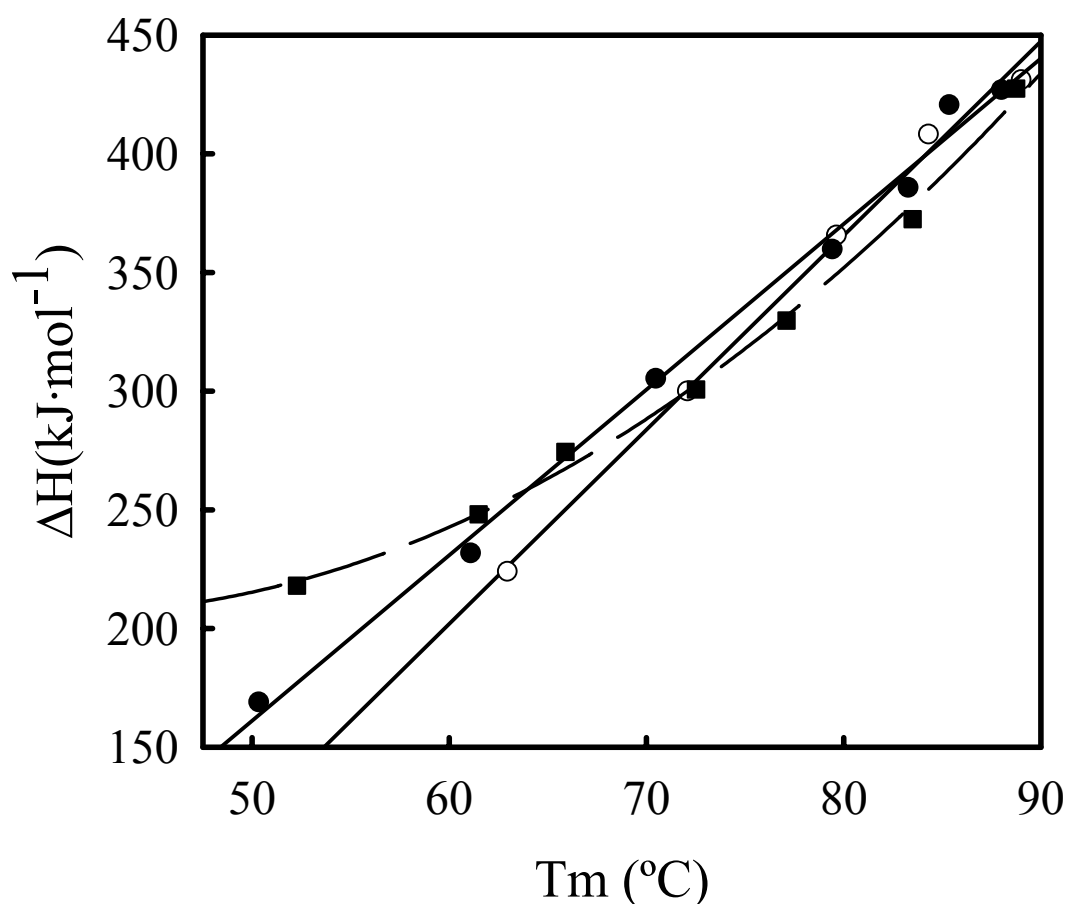


Figura 3.12. Representación de cambios de entalpías de desnaturalización, procedentes del ajuste de trazas de DSC, frente a concentración de desnaturalizante para tiorredoxina WT (símbolos rellenos) y variante T14K (símbolos huecos). Los círculos representan experimentos realizados con cloruro de guanidinio. Los valores obtenidos en presencia de cloruro de guanidinio para tiorredoxina WT y la variante T14K son muy similares dentro del rango de incertidumbre experimental (± 10 kJ/mol). Las líneas continuas son el ajuste lineal a los datos experimentales de WT y T14K. Los cuadrados representan experimentos realizados en presencia de tiocianato de guanidinio, y la línea discontinua es el mejor ajuste, a un polinomio de segundo grado, a estos datos. Las pendientes de estas representaciones no deben de ser asignadas a valores de ΔC_p , ya que cada punto corresponde a una concentración diferente de codisolvente.

Los efectos de la mutación T14K y de la concentración de cloruro sódico en ΔG de desnaturalización son realmente pequeños, por lo que se puede utilizar la ecuación de Schellman para calcular sin demasiado error dichos efectos. Podemos escribir la ecuación de Schellman como:

$$\Delta\Delta G = \Delta H_m^0 \frac{\Delta T_m}{T_m^0} \quad (3.9)$$

donde $\Delta\Delta G$ es la perturbación en el cambio de energía libre, T_m^0 y ΔH_m^0 son la temperatura de desnaturalización y el cambio de entalpía de desnaturalización a la temperatura de desnaturalización para la proteína no perturbada, y ΔT_m es el efecto de la perturbación en la temperatura de desnaturalización. Si se considera como perturbación la mutación T14K, la proteína no perturbada es WT y entonces $\Delta T_m = T_m(\text{T14K}) - T_m(\text{WT})$. Si se considera como perturbación la presencia de cloruro sódico, la proteína no perturbada es tiorredoxina WT en ausencia de cloruro sódico y ΔT_m es la diferencia $T_m(\text{WT en presencia de sal}) - T_m(\text{WT en ausencia de sal})$. La aplicación de la ecuación (3.9) permite calcular $\Delta\Delta G = \Delta G(\text{WT en presencia de sal}) - \Delta G(\text{WT en ausencia de sal})$. El cálculo produce valores de $\Delta G(\text{WT en presencia de sal})$, ya que a la temperatura de desnaturalización $\Delta G(\text{WT en ausencia de sal}) = 0$. La dependencia de ΔG con la concentración de cloruro sódico para la desnaturalización de tiorredoxina WT, fue obtenida de esta forma.

3.9 Determinación de los valores de m a partir de experimentos de DSC

La pendiente de la representación de ΔG de plegamiento frente a la concentración de desnaturizante es conocida como m (Greene y Pace, 1974; Myers et al., 1995). Este parámetro es de gran utilidad en el estudio de plegamiento de proteínas. Los valores de m pueden ser obtenidos a partir de experimentos de calorimetría diferencial de barrido a diferentes concentraciones de desnaturizante, usando un procedimiento sencillo cuyas características serán expuestas a continuación.

Si tomamos todos los cambios para un proceso de desnaturalización en equilibrio, como función de la temperatura (T) y la concentración de desnaturizante (C), entonces el cambio en la energía libre de Gibbs de desnaturalización puede expresarse como:

$$\Delta G(C,T) \tag{3.10}$$

Los valores de T y C para los cuales ΔG es cero, y por tanto la constante de equilibrio para el proceso es uno, definen una línea de equilibrio C frente a T o T frente a C . Esta línea de equilibrio puede ser vista de dos formas equivalentes: 1), como el efecto de la concentración de desnaturizante en la temperatura de desnaturalización, esto es, efecto de C en T_m ; y 2) como el efecto de la temperatura en la concentración de desnaturizante para la cual $\Delta G=0$, efecto de T en $C_{1/2}$.

La derivada parcial de ΔG respecto a la concentración es, por definición, el valor de m :

$$\left(\frac{\partial \Delta G}{\partial C}\right)_T = -m(C, T) \quad (3.11)$$

la cual es estrictamente función de C y T , como se indica en el término a la derecha de la ecuación (3.11). Si para un valor dado de temperatura, el valor de m no depende significativamente de la concentración de desnaturalizante, entonces la representación de ΔG frente a C para esa temperatura será lineal hasta $C = 0$, y el método de extrapolación lineal será válido. Es importante recalcar, que no se ha hecho ninguna suposición respecto a la dependencia de los valores de m con la concentración de desnaturalizante.

En adelante nos referiremos a los valores de m correspondientes a la línea de equilibrio como valores de $m_{1/2}$. Estos valores de $m_{1/2}$ pueden ser calculados a partir de datos experimentales de calorimetría usando la expresión (Ibarra-Molero y Sanchez-Ruiz; 1996):

$$m_{1/2} = -\frac{\Delta H_m}{T_m} \left(\frac{dT_m}{dC}\right) \quad (3.12)$$

La ecuación (3.12) es rigurosa y no está basada en la aproximación por extrapolación lineal. El cálculo de los valores de $m_{1/2}$ empleando la ecuación anterior sólo requiere valores de cambio de entalpía de desnaturalización a la temperatura de

desnaturalización y el efecto de la concentración de desnaturalizante en la temperatura de desnaturalización. Para este cálculo no se requiere el valor de capacidad calorífica.

La ecuación (3.12) puede ser usada para calcular valores de $m_{1/2}$ para diferentes concentraciones de desnaturalizante. Podemos encontrar en la bibliografía que para lisozima de clara de huevo los valores de $m_{1/2}$ son constantes, dentro de la dispersión experimental, para concentraciones de cloruro de guanidinio $> \sim 1$ M. Para concentraciones < 1 M los valores de $m_{1/2}$ se incrementan cuando la concentración de desnaturalizante se acerca a cero. Estos resultados indican que la dependencia de ΔG con la concentración de cloruro de guanidinio para lisozima a pH 4.5 es lineal en un amplio rango de concentración, y también que hay una fuerte desviación de la linealidad a bajas concentraciones de desnaturalizante debida al apantallamiento de las interacciones carga-carga (Ibarra-Molero y Sanchez-Ruiz, 1996; Ibarra-Molero et al., 1999a). Como veremos más adelante, un comportamiento similar ha sido observado en tiorredoxina.

3.10 Determinación de los valores de $m_{1/2}$ para tiorredoxina WT y el mutante T14K en presencia de cloruro de guanidinio y tiocianato de guanidinio.

Empleando la ecuación (3.12) y los valores de ΔH_m y T_m mostrados en la figura 3.12, se pueden calcular los valores de $m_{1/2}$ para tiorredoxina WT y la variante T14K. En ambos casos el cálculo de la derivada dT/dC está realizado a partir del ajuste polinómico de la representación de T_m frente a C , mostrado en la figura 3.11. Este

3. Interacciones electrostáticas

ajuste para WT y T14K se realizó a un polinomio de tercer grado cuya derivada $dT/dC=a+2bx+3cx^2$ tiene los coeficientes $a=-24.12\pm 0.50 \text{ K}\cdot\text{M}^{-1}$, $b=10.61\pm 3.47 \text{ K}\cdot\text{M}^{-2}$ y $c= -4.16\pm 1.15 \text{ K}\cdot\text{M}^{-3}$ para WT y $a=-25.15\pm 0.27 \text{ K}\cdot\text{M}^{-1}$, $b=9.39\pm 3.36 \text{ K}\cdot\text{M}^{-2}$ y $c= -3.12\pm 1.48 \text{ K}\cdot\text{M}^{-3}$ para T14K.

Los valores de $m_{1/2}$ se muestran en las tablas 3.5, 3.6 y 3.7 y una representación de ellos frente a $C_{1/2}$ en la figura 3.13. Como puede observarse los valores de $m_{1/2}$ cambian a lo largo de la línea de equilibrio, en particular para concentraciones de desnaturalizante inferiores a 1 M. Asimismo, es importante destacar que los valores de $m_{1/2}$ para altas concentraciones de desnaturalizante están en consonancia con el valor obtenido de la bibliografía a partir de estudios de desnaturalización química (Kelley et al., 1987; Santoro y Bolen, 1992), que es $13.85 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$.

Los valores de $m_{1/2}$ obtenidos para ambas proteínas, WT y T14K en cloruro de guanidinio, parecen ser muy parecidos, dentro de la dispersión experimental y pueden ser descritos a partir de la ecuación empírica:

$$m_{1/2} = \alpha + \beta \cdot \exp(-\gamma \cdot C_{1/2}) \quad (3.13)$$

con $\alpha = 13.6 \pm 1.2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$, $\beta = 13.7 \pm 3.6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$, y $\gamma = 2.3 \pm 0.6 \text{ M}^{-1}$.

[GdnHCl](M)	$m_{1/2}$ (kJ·mol ⁻¹ ·M ⁻¹)
0	26.87±3.59
0.25	21.57±1.10
0.51	17.14±0.57
1.02	13.83±1.04
1.58	15.07±1.10
1.98	16.18±1.35

Tabla 3.5. Valores de $m_{1/2}$ para tiorredoxina WT en GdnHCl determinados mediante la ecuación (3.12).

[GdnHCl](M)	$m_{1/2}$ (kJ·mol ⁻¹ ·M ⁻¹)
0	26.56±3.48
0.25	23.93±0.92
0.51	17.62±1.24
0.95	13.83±1.04
1.51	13.72±0.60

Tabla 3.6. Valores de $m_{1/2}$ para tiorredoxina T14K en GdnHCl determinados mediante la ecuación (3.12).

[GdnSCN](M)	$m_{1/2}$ (kJ·mol ⁻¹ ·M ⁻¹)
0.1	45.42±1.99
0.25	40.95±1.67
0.35	38.06±2.02
0.50	34.42±1.04
0.60	32.33±1.16
0.80	29.91±1.21

Tabla 3.7. Valores de $m_{1/2}$ para tiorredoxina WT en GdnSCN determinados mediante la ecuación (3.12).

Es importante destacar de nuevo que $C_{1/2}$ cambia con la temperatura, como muestra la figura 3.11, y por lo tanto, podría dudarse si la ecuación (3.13) refleja la dependencia de los valores de $m_{1/2}$ con la concentración de cloruro de guanidinio, o más bien, el efecto de la temperatura en ellos. Esta última interpretación está desfavorecida por el siguiente razonamiento:

Asumamos que la ecuación (3.13) refleja exclusivamente un efecto de la temperatura y por tanto los valores de m son independientes de la concentración de desnaturizante a una temperatura dada. Entonces el método de extrapolación lineal será válido y el cambio de energía de Gibbs de desnaturización a concentración cero de desnaturizante puede ser calculada como $m_{1/2} \times C_{1/2}$:

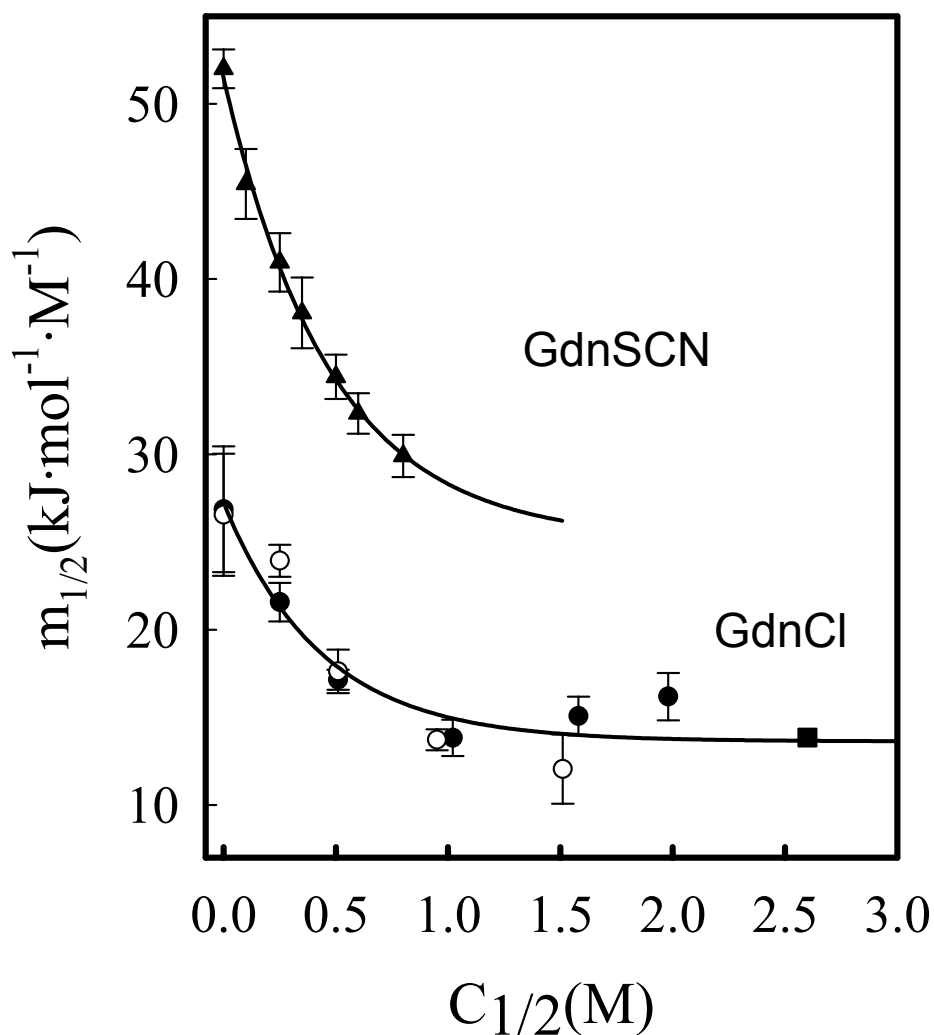


Figura 3.13. Representación de valores de m frente a concentración de desnaturante para tiorredoxina WT (símbolos rellenos), y variante T14K (símbolos huecos). Los círculos están referidos a experimentos de DSC realizados con cloruro de guanidinio, los triángulos están referidos a experimentos con tiocianato de guanidinio. Las líneas representan los ajustes de la ecuación (3.13) a los datos experimentales. El cuadrado es el valor de m para tiorredoxina WT obtenido de la bibliografía (Kelley et al., 1987; Santoro y Bolen, 1992).

$$\Delta G^{LEM}(T, C = 0) = C_{1/2}(T) \times [\alpha + \beta \times \exp(-\gamma \times C_{1/2}(T))] \quad (3.14)$$

donde $\Delta G^{LEM}(T, C = 0)$ es la extrapolación lineal de ΔG a la temperatura T y concentración cero de desnaturalizante, y $C_{1/2}(T)$ es el valor de $C_{1/2}$ a la temperatura T .

Asumamos ahora que la ecuación (3.13) representa el efecto de la concentración de desnaturalizante; entonces el efecto de la temperatura no es significativo y los valores de $m_{1/2}$ y $C_{1/2}$ en la ecuación (3.13) pueden ser simplemente tomados como m y C y la integración de ΔG sería:

$$\Delta G(T, C) = -\int_{C_{1/2}(T)}^C m \times dC = -\alpha \times (C - C_{1/2}(T)) + \frac{\beta}{\gamma} [\exp(-\gamma \times C) - \exp(-\gamma \times C_{1/2}(T))] \quad (3.15)$$

y sustituyendo $C = 0$ en esta ecuación obtenemos ΔG a concentración cero de desnaturalizante:

$$\Delta G(T, C = 0) = \alpha \times C_{1/2}(T) + \frac{\beta}{\gamma} [1 - \exp(-\gamma \times C_{1/2}(T))] \quad (3.16)$$

Las ecuaciones (3.14) y (3.16) ofrecen valores de ΔG de desnaturalización a concentración cero de desnaturalizante, y ambas están basadas en suposiciones diferentes. La validez de estas suposiciones puede ser comprobada comparando los valores de ΔG calculados con estas ecuaciones con los valores obtenidos a partir de experimentos de calorimetría en ausencia de desnaturalizante, utilizando procedimientos termodinámicos comunes. Estas comparaciones se muestran en la figura 3.14 y como

puede verse, se demuestra la validez de la suposición que genera la ecuación (3.16). En el apéndice A1 se hace un análisis más riguroso acerca del efecto de la concentración de desnaturalizante en los valores de m .

3.11 Estimación de los errores de los parámetros termodinámicos mediante el método *Monte Carlo*.

Todos los intervalos de error presentados en el análisis de datos se calcularon usando el método Monte Carlo. De forma aleatoria, se generaron varias réplicas de cada conjunto de datos usando funciones de distribución adecuadas para los errores asociados a los datos originales. Cada una de las réplicas generadas, se procesa de la misma forma que los datos originales y el análisis estadístico de los resultados obtenidos lleva a los errores asociados a los parámetros energéticos. Como ejemplo se explicará la obtención del error asociado a la determinación de los valores de $m_{1/2}$ para cloruro de guanidinio. Los datos originales de $m_{1/2}$ se obtienen a partir de los valores de T_m y ΔH_m a diferentes concentraciones de cloruro de guanidinio. Los valores de T_m frente a C y los valores de ΔH_m frente a C pueden ser adecuadamente descritos por polinomios de tercer y primer grado, respectivamente. Estos polinomios se toman como punto de partida para la generación de réplicas. Con estos polinomios generamos valores de T_m y ΔH_m , para cada valor de C . A estos valores se les añaden errores generados aleatoriamente de acuerdo a una distribución Gaussiana, tomando para la T_m una desviación estándar de 0.4 °C y para ΔH_m de 10 kJ/mol, valores obtenidos a partir de varios experimentos de calorimetría sin desnaturalizante.

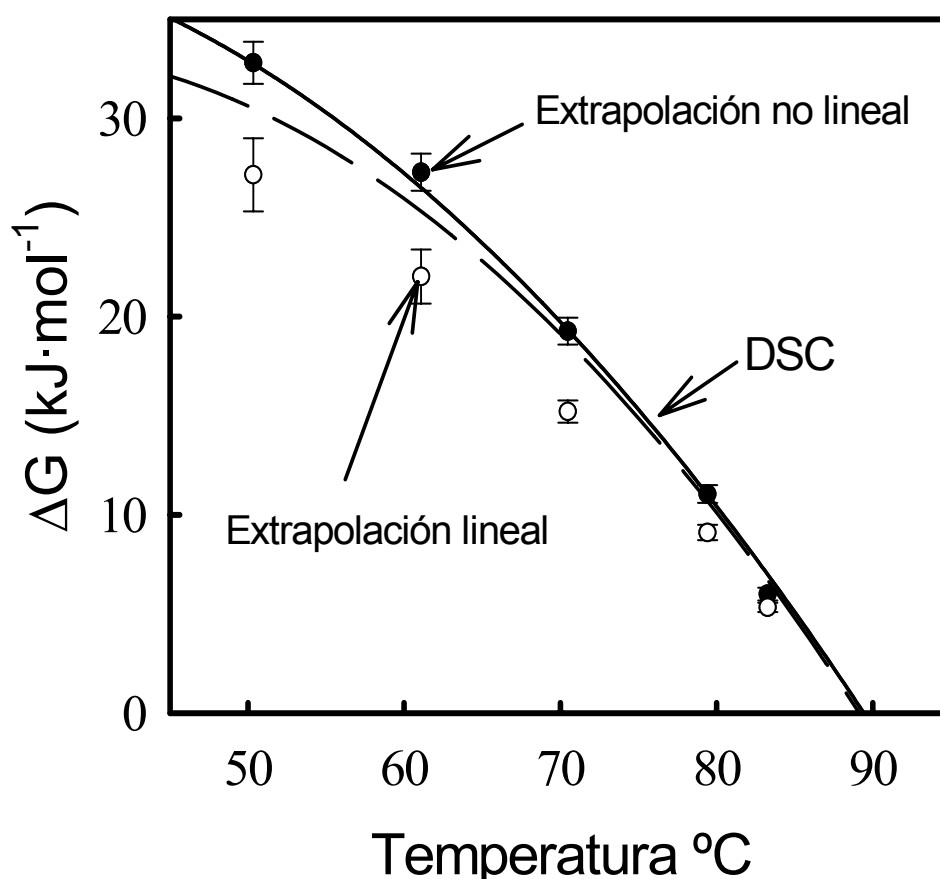


Figura. 3.14. Dependencia con la temperatura de ΔG de desnaturalización en ausencia de desnaturalizante. Las líneas etiquetadas DSC son las curvas de estabilidad calculadas a partir de datos calorimétricos usando dos suposiciones diferentes para la dependencia con la temperatura del cambio de capacidad calorífica. La línea continua es la curva de estabilidad calculada con valores de ΔC_p independientes de la temperatura. La línea discontinua es la curva de estabilidad teniendo en cuenta la dependencia con la temperatura de ΔC_p y usando como valores de capacidad calorífica para el estado desplegado los valores calculados como suma de las contribuciones de los grupos. Los círculos representan los valores de ΔG obtenidos de los valores de $m_{1/2}$ y $C_{1/2}$ usando dos suposiciones diferentes: los círculos huecos son valores calculados asumiendo que m es constante con la temperatura, “extrapolación lineal”. Los círculos rellenos son los valores calculados asumiendo que m cambia con la concentración de desnaturalizante.

De los ajustes a un polinomio de tercer orden de la dependencia de T_m con C , se pueden obtener las derivadas dT_m/dC , las cuales junto con los valores de T_m y ΔH_m se usan para obtener los valores de $m_{1/2}$, de acuerdo con la ecuación (3.12). De esta forma se obtuvieron 20 valores de $m_{1/2}$ para cada concentración de desnaturizante, de los cuales se puede obtener las desviaciones estándar, que son los errores dados para los valores originales de $m_{1/2}$.

3.12 Dependencia del cambio de energía de Gibbs de desnaturalización para tiorredoxina con la concentración de cloruro de guanidinio.

De los cálculos realizados en la sección 3.10 podemos concluir, con aceptable grado de aproximación, que la dependencia de $m_{1/2}$ con $C_{1/2}$ mostrada en la figura 3.13, refleja la dependencia de los valores de m con la concentración de desnaturizante. Por tanto, podemos emplear la ecuación (3.15) para calcular la dependencia de ΔG con la concentración de desnaturizante a temperatura constante. Los resultados de este cálculo se muestran en la figura 3.15 (parte superior), para la temperatura de desnaturalización a concentración cero de desnaturizante ($C_{1/2} = 0$). Como era de esperar a partir de los datos de $m_{1/2}$, la dependencia de ΔG con C es lineal en un amplio rango de concentración de desnaturizante, pero hay una clara desviación de la linealidad para concentraciones por debajo de 1 M. Un comportamiento similar ha sido observado ya previamente para otras proteínas (Ibarra-Molero y Sanchez-Ruiz, 1996; Ibarra-Molero et al., 1999a).

Las desviaciones de la linealidad a bajas concentraciones de cloruro de guanidinio pueden ser también observadas a partir de los valores de T_m . Así, de la ecuación (3.12) el efecto de la concentración de desnaturizante en la temperatura de desnaturización viene dado por:

$$\frac{dT_m}{dC} = -\frac{m_{1/2} \times T_m}{\Delta H_m} \quad (3.17)$$

Como muestra la figura 3.12, el cambio de la entalpía de desnaturización a lo largo de la línea de equilibrio puede ser descrito como una dependencia lineal con la temperatura de desnaturización:

$$\Delta H_m = \delta \times (T_m - T_H) \quad (3.18)$$

con $\delta = 7.0 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ y $T_H = 300 \text{ K}$. T_H se interpreta como la temperatura a la cual ΔH_m es cero a una concentración de desnaturizante, C_H . Por otro lado, no se interpreta δ como un cambio en la capacidad calorífica, ya que, tanto la temperatura como la concentración de cloruro de guanidinio cambian a lo largo de la línea de equilibrio, y los codisolventes pueden afectar el valor de entalpía de desnaturización. Sustituyendo la ecuación (3.18) en la ecuación (3.17), separando variables e integrando desde (T_H, C_H) a cualquier punto en la línea de equilibrio (T_m, C) , tenemos:

$$\delta \times \int_{T_H}^{T_m} \frac{T_m - T_H}{T_m} dT_m = -m \int_{C_H}^C dC \quad (3.19)$$

donde se ha introducido la aproximación lineal, es decir, se ha asumido que m es constante y por eso aparece fuera de la integral en el miembro derecho de la ecuación y se ha llamado simplemente m , en lugar de $m_{1/2}$. El resultado de la integral anterior es:

$$\delta \times \left[T_m - T_H - T_H \times \ln \left(\frac{T_m}{T_H} \right) \right] = m \times C_H - m \times C \quad (3.20)$$

Nos referiremos al miembro izquierdo de la ecuación (3.20) como $F(T_m)$. Debido a que conocemos los valores de δ y de T_H , podemos calcular $F(T_m)$ para varios valores experimentales de T_m y representar la gráfica $F(T_m)$ frente a C . De acuerdo con la ecuación (3.20), si la dependencia lineal de ΔG frente a C se mantiene, esta representación debe ser lineal con pendiente igual o menor que m . La representación de $F(T_m)$ frente a C para tiorredoxina WT se muestra en la figura 3.15 (parte central). Los datos corresponden a tres concentraciones altas de cloruro de guanidinio. La pendiente de la representación es $-14.6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ que está en consonancia con el valor de m obtenido a altas concentraciones de desnaturizante, como muestra la figura 3.13 y con los valores de m obtenidos de la bibliografía.

La extrapolación lineal en la grafica de la figura 3.15 (parte central) da un valor de $F(T_m)$ de 35.3, consistente con una temperatura de desnaturalización de 84°C , mientras que el valor de T_m es de 88.8°C en ausencia de desnaturizante. Esto es, la extrapolación lineal subestima el valor de T_m .

De todo lo anterior no hay duda de que hay una desviación de la linealidad de ΔG con la concentración de cloruro de guanidinio a concentraciones inferiores a 1 M, y que esta desviación es tal que la extrapolación lineal desde altas concentraciones de desnaturizante subestima la estabilidad de tiorredoxina en ausencia de desnaturizante. En 1992, Santoro y Bolen presentaron un trabajo en el que exponían un comportamiento opuesto para tiorredoxina en similares condiciones. Mostraban una desviación de la linealidad en la representación de ΔG frente a C , pero en este caso la extrapolación lineal sobrestimaba la estabilidad de la proteína en ausencia de desnaturizante. No está clara la razón de esta discrepancia, pero puede ser debida al hecho de que Santoro y Bolen llevaron a cabo una extrapolación larga usando la ecuación de Gibbs-Helmholtz con ΔC_p constante para obtener los valores de ΔG a 25°C y valores bajos de C , y también al hecho de que ellos tomaron una estimación de ΔC_p basada en la dependencia con la temperatura de los valores de ΔH_m obtenidos cambiando la composición del disolvente.

Es importante destacar, que los cálculos de $m_{1/2}$ dados en esta tesis no se basan en las extrapolaciones de Gibbs-Helmholtz y no requieren el uso de valores de ΔC_p .

La desviación de la linealidad de ΔG frente a C encontrada, no puede ser explicada en términos de uniones específicas de los iones del agente desnaturizante a la proteína nativa ya que debería incrementar los valores de ΔG en ausencia de desnaturizante obtenidos como extrapolación lineal desde altas concentraciones de desnaturizante, lo cual es el efecto opuesto a lo que observamos en la figura 3.15 (parte superior).

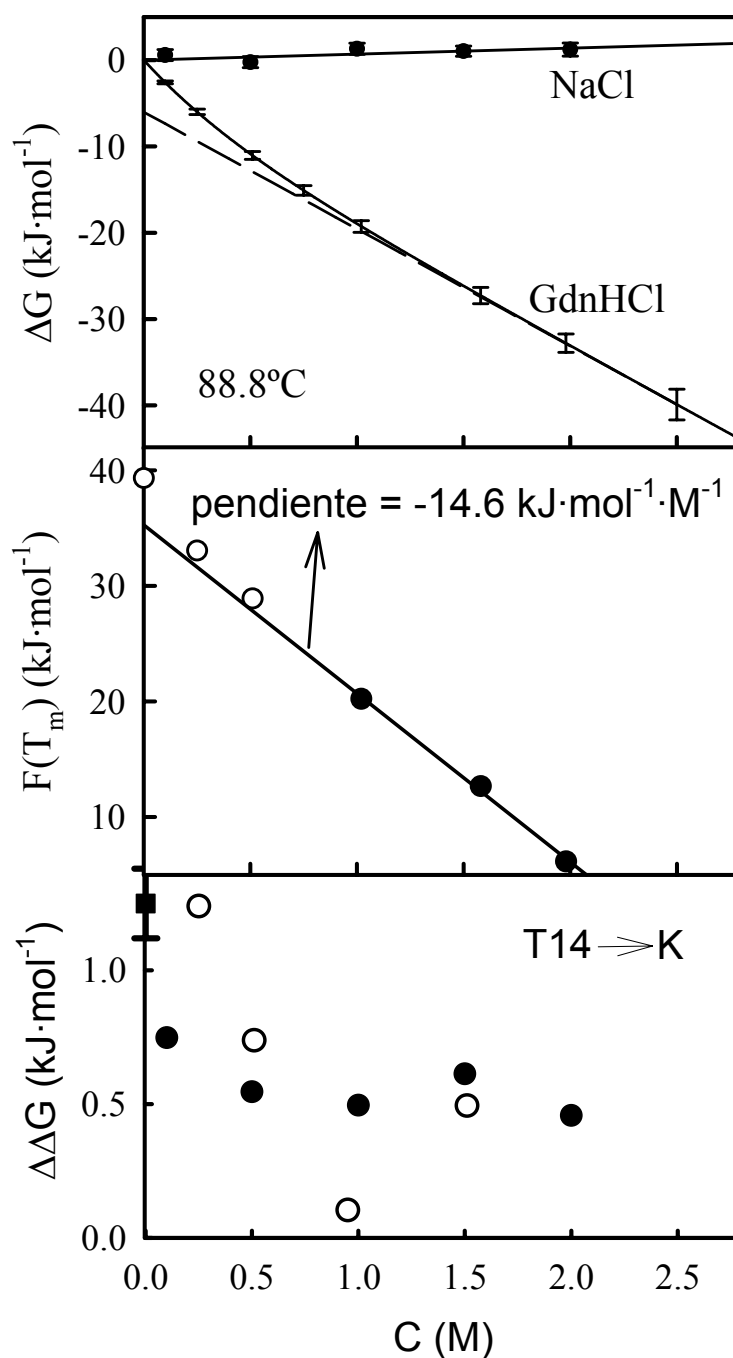


Figura 3.15. (Parte superior), representación de ΔG a 88.8 °C frente a concentración de sal. Para NaCl, los símbolos rellenos representan los datos experimentales y la línea es el ajuste lineal. Para cloruro de guanidinio la línea continua representa ΔG frente a C calculado usando la ecuación (3.15) y basada en los datos de $m_{1/2}$ frente a C , figura 3.13. También se muestra para cloruro de guanidinio la dependencia dada por la extrapolación lineal desde altas concentraciones de desnaturante (línea discontinua). (Parte central), representación de $F(T_m)$ frente a concentración de cloruro de guanidinio para tiorredoxina WT. Los símbolos

3. Interacciones electrostáticas

rellenos representan concentraciones de cloruro de guanidinio de 1M o superiores; la línea continua representa el ajuste lineal a los datos. Los tres valores correspondientes a concentraciones de desnaturizante <1M se muestran con círculos huecos. (Parte inferior), efecto del NaCl (círculos rellenos) y cloruro de guanidinio (círculos huecos) en el efecto de la mutación T14K en la estabilidad de tiorredoxina. El error asociado con el valor de $\Delta\Delta G$ en ausencia de sal (cuadrado relleno) se obtuvo a partir de tres experimentos de calorimetría con las dos proteínas y es representativo para los otros valores de $\Delta\Delta G$ en presencia de sal.

El decrecimiento de los valores de ΔG podría ser, en principio, explicado mediante el modelo de unión desnaturizante:

$$\Delta G = \Delta G(C = 0) - \Delta nRT \ln(1 + K_b C) \quad (3.21)$$

donde Δn es la diferencia en el número de sitios de unión entre los estados nativo y desnaturizado, y K_b es la constante de unión. De todas formas, este modelo no es consistente con los datos experimentales de m para la desnaturización de tiorredoxina. Usando la definición de m y la ecuación (3.21) es fácil llegar a la expresión que da la dependencia de m con C predicha por el modelo de unión de desnaturizante:

$$m = \frac{\Delta nRT}{1 + K_b C} \quad (3.22)$$

Esta ecuación predice que los valores de m se acercan a cero a elevadas concentraciones de desnaturizante, lo cual está en desacuerdo con las evidencias experimentales que muestran que el valor de m se acerca a $\sim 15 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ a altas

concentraciones de desnaturizante. No obstante, se muestra un análisis más riguroso acerca de las uniones específicas en el apéndice A2

Por supuesto, el análisis realizado no considera todos los posibles modelos de acción de desnaturizantes. El hecho de que estos modelos no concuerden con nuestros resultados experimentales sugiere que la desviación de la linealidad de ΔG frente a C a bajas concentraciones de desnaturizante, está probablemente asociada al apantallamiento de las interacciones carga-carga. Esta suposición está apoyada por dos hechos: 1), para varias proteínas se han observado cambios en los valores de m determinados por calorimetría a bajas concentraciones de cloruro de guanidinio, pero no en la desnaturalización inducida por urea (Ibarra-Molero et al., 2004) y 2), para ubiquitina las desviaciones de la linealidad de ΔG frente a C a bajas concentraciones de cloruro de guanidinio cambian con el pH de la forma esperada para una contribución carga-carga a la estabilidad de proteínas (Ibarra-Molero et al 1999a).

No obstante, el valor de la desviación de ΔG es ~ 7 kJ/mol, bastante menor que la energía total de las interacciones carga-carga en la estructura nativa de tiorredoxina que es de ~ 22 kJ/mol, obtenida mediante el modelo de Tanford-Kirkwood (figura 3.1). Varias razones pueden ser atribuidas a esta discrepancia: 1), el modelo de Tanford-Kirkwood es realmente un modelo muy simple, y quizás sólo podemos esperar predicciones cualitativas o semicualitativas. 2), Las interacciones electrostáticas pueden ser considerables en el estado desnaturizado (Pace et al., 2000; Guzman-Casado et al., 2003). Por lo tanto, si aceptamos como exacto el valor total de la energía de interacción carga-carga calculado mediante este modelo, este valor ofrecería sólo un límite superior

de la contribución de las interacciones carga-carga al cambio de energía de Gibbs de desnaturalización. 3), El cloruro de guanidinio puede no apantallar todas las interacciones carga-carga. Esta posibilidad está apoyada por el análisis del efecto del tiocianato de guanidinio que veremos más adelante.

3.13 Dependencia del cambio de energía de Gibbs de desnaturalización para tiorredoxina con la concentración de cloruro sódico.

Los experimentos realizados con cloruro sódico en el rango de concentración entre 0-2 M muestran un pequeño efecto en la entalpía de desnaturalización y en la temperatura de desnaturalización para tiorredoxina WT y la variante T14K, como se puede ver en las figuras 3.11 y 3.12. El cálculo de ΔG frente a concentración de cloruro sódico para una temperatura igual a la temperatura de desnaturalización en ausencia de sal, se realiza según se describe en la sección 3.8. El resultado se representa en la parte superior de la figura 3.15 y como puede verse no hay prácticamente efecto del cloruro sódico en ΔG y, en particular, hay un pequeño cambio a concentraciones por debajo de 1 M que podría ser asociado al apantallamiento de las interacciones carga-carga. Por tanto, parece claro que el efecto del cloruro sódico en la estabilidad de tiorredoxina a pH 7 no ofrece evidencia de un apantallamiento significativo de las interacciones carga-carga.

3.14 Efecto de la mutación T14K en la estabilidad de tiorredoxina.

El efecto del cloruro sódico y el cloruro de guanidinio en el valor de $\Delta\Delta G$ para la mutación T14→K ($\Delta\Delta G = \Delta G(\text{T14K}) - \Delta G(\text{WT})$) puede ser calculado de los datos experimentales de temperatura y entalpía de desnaturalización usando el procedimiento descrito en la sección 3.8. El resultado de estos cálculos se muestra en la parte inferior de la figura 3.15. Parece que ambas sales pueden apantallar gran parte de la estabilización producida por la mutación T14K, y que ambas son igual de efectivas, reflejando el hecho de que la lisina introducida en la posición 14 está muy expuesta al disolvente.

La estabilización producida por la mutación T14K en ausencia de sales es $\Delta\Delta G = 1$ kJ/mol, que es menos de la mitad de la predicha por los cálculos realizados usando el modelo de Tanford-Kirkwood, que como se muestra en la figura 3.2 es de ~ 2.5 kJ/mol. Esta discrepancia es aproximadamente del mismo factor que la mencionada anteriormente (apartado 3.12) entre la estimación de la contribución total de las interacciones carga-carga a la energía de Gibbs de desnaturalización y la correspondiente predicha por los cálculos basados en el modelo de Tanford-Kirkwood, y probablemente sea debida a las mismas razones, excepto, claro está, a la referente al apantallamiento del cloruro de guanidinio.

Por último, destacar que un valor de $\Delta\Delta G$ de ~ 1 kJ/mol, en ausencia de sal, se traduce en un aumento de la temperatura de desnaturalización de sólo 1°. Con un buen

grado de aproximación los efectos de la mutación en ΔG y T_m están relacionados mediante la ecuación de Schellman (Schellman, 1987):

$$\Delta T_m = \frac{\Delta\Delta G}{\Delta S_m^{WT}} = \frac{T_m^{WT} \cdot \Delta\Delta G}{\Delta H_m^{WT}} \quad (3.23)$$

donde el superíndice WT se refiere al valor para tiorredoxina forma silvestre y el subíndice m se refiere a los valores de ΔH y ΔS a la temperatura de desnaturalización. De acuerdo con la ecuación (3.23) el valor pequeño de ΔT_m está asociado a un alto valor de cambio de entalpía a la temperatura de desnaturalización, que para tiorredoxina es ~ 430 kJ/mol. Realmente, es sabido que proteínas con un valor pequeño de cambio de entalpía de desnaturalización, son más sensibles a los efectos producidos por mutaciones y con frecuencia muestran altos valores de T_m (Alexander et al., 1992; Ibarra-Molero et al., 2000). Por tanto, la obtención de altos incrementos en el valor de T_m en proteínas no demasiado pequeñas mediante la optimización de las interacciones carga-carga debe producirse mediante la acumulación de varias mutaciones (Sanchez-Ruiz y Makhatadze, 2001), es decir, mediante el diseño de la distribución superficial de carga (Ibarra-Molero y Sanchez-Ruiz, 2002).

3.15 Valores de $m_{1/2}$ para tiorredoxina WT en presencia de tiocianato de guanidinio.

Originalmente sólo cloruro de guanidinio y cloruro sódico fueron empleados para la caracterización energética de sus efectos en la desnaturalización de tiorredoxina

para determinar la eficiencia relativa en el apantallamiento de las interacciones carga-carga. No obstante, y debido a que los resultados mostraron una relación entre la eficiencia en el apantallamiento y el poder desnaturizante, se creyó conveniente realizar experimentos para la caracterización del efecto del tiocianato de guanidinio en la estabilidad de tiorredoxina.

La determinación de los valores de $m_{1/2}$ para la desnaturización de tiorredoxina WT con tiocianato de guanidinio, se hizo de la misma manera que en el caso de cloruro de guanidinio. Estos valores están representados en la figura 3.13. Debido al pequeño rango de concentración estudiado, por dificultades técnicas, no se puede caracterizar completamente la dependencia de m frente a C . No obstante, parece claro, que los valores de m para tiocianato de guanidinio son mucho mayores que para el caso del cloruro de guanidinio y que éstos decrecen notablemente, lo cual sugiere una alta eficiencia en el apantallamiento.

3.16 Conclusiones

Las representaciones del cambio de energía de Gibbs de desnaturización frente a concentración de cloruro sódico con frecuencia muestran una dependencia exponencial en el rango de concentraciones entre 0 y 1 M, atribuida al apantallamiento de las interacciones carga-carga por las sales, y una gradual y casi lineal dependencia a altas concentraciones. En el caso de tiorredoxina a pH 7 sólo se observa un moderado incremento lineal en ΔG al incrementar la concentración de cloruro sódico, es decir, no se ha encontrado evidencia experimental de un significativo apantallamiento de las

interacciones carga-carga. La explicación más simple para esto es que no existe realmente apantallamiento en este caso. No obstante existe una explicación alternativa. En 2002 Dominy y colaboradores, apuntaron que el cloruro sódico apantalla más eficientemente las interacciones de largo alcance que las interacciones de corto alcance y esto está relacionado con la carga total de la proteína, que en el caso de tiorredoxina a pH 7 es ~ -5 unidades. El desigual apantallamiento de las interacciones de corto alcance, predominantemente estabilizantes, y las interacciones de largo alcance, predominantemente desestabilizantes, puede producir un balance de energía libre cercano a cero en el rango de bajas concentraciones de cloruro sódico, de manera tal que el apantallamiento no sería aparente en la dependencia con el cloruro sódico de la estabilidad termodinámica.

Nuestros resultados mantienen una relación entre el apantallamiento y la accesibilidad al disolvente de los grupos cargados. Así, una concentración 1M de cloruro sódico, así como de cloruro de guanidinio, parece apantallar las interacciones de la lisina introducida en la variante T14K. Como ya se ha dicho antes, la lisina en posición 14 de esta variante está altamente expuesta al disolvente, con una accesibilidad mayor que la de los otros grupos inmersos en fuertes interacciones estabilizantes en tiorredoxina (las accesibilidades de K3, K18, K36, K57, K69, K82, K90, K96 y K100 en la estructura nativa de tiorredoxina WT son, 0.34, 0.67, 0.59, 0.19, 0.58, 0.39, 0.41, 0.37 y 0.41, respectivamente).

Finalmente, en la presente tesis se sugiere que la eficiencia de las sales estudiadas en el apantallamiento de las interacciones carga-carga sigue el orden

tiocianato de guanidinio > cloruro de guanidinio > cloruro sódico, que es también el orden del poder desnaturizante de estas sales. Cabría esperar una alta eficiencia en el apantallamiento para las sales desnaturizantes debido al hecho de que éstas tienden a interaccionar preferentemente con la superficie de las proteínas, mientras que las estabilizantes tienden a quedar excluidas de la superficie. (Es importante enfatizar que no se está proponiendo que el efecto desnaturizante de determinadas sales es debido a su carácter apantallante de las cargas, sino que la eficiencia en el apantallamiento es alta para sales desnaturizantes). De hecho, Courtenay y colaboradores (2001) propusieron que la serie de Hofmeister de cationes y aniones tiene su origen en el grado de acumulación o exclusión del soluto en la superficie de la proteína (por ejemplo, para SCN^- es mayor que para Cl^- en la serie de Hofmeister para aniones). Esto sugiere que la eficiencia de diferentes sales para apantallar interacciones carga-carga en proteínas puede también reflejar la posición de los iones constituyentes en la serie de Hofmeister.

4. Empleo de la información obtenida del alineamiento de secuencias en el diseño de proteínas

4.1 Introducción

Los alineamientos de secuencias son una poderosa fuente de información, que podemos emplear en el diseño de proteínas. Una de las preguntas que podemos hacernos, es si podemos obtener información acerca de la estabilidad a partir de los alineamientos de secuencias. Recientemente se ha sugerido (Godoy-Ruiz et al., 2004) que existe una correlación entre el efecto en la estabilidad producido por mutaciones conservativas, con la frecuencia de aparición de residuos en el alineamiento de secuencias y que estos efectos pueden estar relacionados con el hecho de que la naturaleza distingue entre residuos, es decir, conserva los ambientes de cada residuo, de forma que la mutación produce un efecto en la estabilidad.

Como veremos a continuación, de los alineamientos de secuencias, además de la información anterior, que se daría por contactos entre residuos, es posible obtener información sobre acoplamiento a larga distancia entre residuos.

La existencia de acoplamiento cooperativo entre mutaciones distantes, ha sido ya observada y se piensa que está implicada en procesos moleculares. Así, este acoplamiento se ha empleado en la obtención de fármacos contra el VIH-1 (Ohkata et al., 2003). Además, estudios de intercambio hidrógeno/deuterio muestran que el efecto de una mutación en el núcleo de ribonucleasa HI de *E. coli* se comunica a regiones fuera

del núcleo (Spudich et al., 2002). Otro ejemplo, es el hecho de que la señalización intramolecular en el complejo tRNA sintetasa se extiende a distancias de 40 Å (Uter y Perona, 2004). Podemos encontrar otros muchos ejemplos de comunicaciones a larga distancia en proteínas nativas en un trabajo de Clarkson y Lee (2004). Además, otros trabajos recientes muestran que los procesos cooperativos y las interacciones a larga distancia pueden darse incluso en el estado desnaturalizado (Klein-Seetharaman et al., 2002; Guzman-Casado et al., 2003; Robic et al., 2003) y de hecho, se ha propuesto que la estructura residual en el estado desnaturalizado tiene influencia en la estabilidad de proteínas (Robic et al., 2003). Por tanto, se podría considerar posible que algunas mutaciones correlacionadas en el alineamiento de secuencias reflejen efectos en el estado desnaturalizado y ofrezcan información sobre estructura residual en el estado desnaturalizado (Godoy-Ruiz et al., 2004).

A pesar de su origen, estado nativo o desnaturalizado, de los mecanismos moleculares involucrados y su función (regulación alostérica, por ejemplo), la comunicación a larga distancia puede conducir a mutaciones correlacionadas entre grupos alejados. De hecho, se ha detectado acoplamiento a larga distancia en el análisis de alineamientos de secuencias dirigido a la determinación de caminos de conectividad energética en proteínas (Lockless y Ranganathan, 1999; Süel et al., 2003).

Sin embargo, de nuevo podríamos preguntarnos si existe efecto en la estabilidad de las mutaciones correlacionadas a larga distancia que se deducen del alineamiento de secuencias y, en caso de tenerlo, si ese efecto sería en el estado nativo o desnaturalizado.

La manera de comprobar si el acoplamiento a larga distancia tiene efecto en la estabilidad es mediante la realización de los llamados ciclos de dobles y triples mutantes (Horovitz y Fersht, 1990), que conllevan la realización de numerosas formas mutantes, simples, dobles y triples.

Como veremos a continuación, determinaremos para el caso de tiorredoxina, y mediante un análisis estadístico de covarianzas, la existencia de mutaciones correlacionadas a larga distancia. Su efecto en la estabilidad se caracterizó mediante experimentos de calorimetría diferencial de barrido. Asimismo, se realizaron medidas de la actividad de las formas mutantes obtenidas.

4.2 Análisis de covarianza del alineamiento de secuencias de tiorredoxina.

Para realizar el alineamiento de secuencias se usó el programa BLAST 2 (Gish W. (1996-2003) <http://blast.wustl1.edu>) para buscar en la base de datos Uniprot/TrEMBL (<http://www.ebi.ac.uk/trembl>) con la secuencia de la proteína, que puede ser tiorredoxina, o cualquier otra como veremos más adelante. Las opciones del programa se dejaron en los valores que por defecto se ofrecen. Las secuencias encontradas son alineadas individualmente con la secuencia dada usando el algoritmo Smith-Waterman y con una similaridad con la secuencia de partida superior a 0.25. La similaridad se calcula como el número de coincidencias entre las secuencias de la base de datos y la secuencia de partida dividida por el número de residuos en ésta última.

Para el caso de tiorredoxina, el alineamiento de secuencias produjo un set de 490 secuencias (sin contar la secuencia de tiorredoxina) (ver figura 4.1). Partiendo de este set de secuencias y con la ayuda de programas informáticos creados para facilitar el cálculo, podemos calcular el valor de covarianza para cada pareja de posiciones (X, Y), que viene dado por la expresión:

$$\sigma_{XY} = \sum_{\text{secuencias}} \frac{(\delta_X - \langle \delta_X \rangle)(\delta_Y - \langle \delta_Y \rangle)}{N_S} = \langle \delta_X \cdot \delta_Y \rangle - \langle \delta_X \rangle \cdot \langle \delta_Y \rangle \quad (4.1)$$

donde δ_P (con P igual a X o Y) toma valor 1 para la secuencia dada si el aminoácido en la posición P en la secuencia es el mismo que en la secuencia de tiorredoxina (y toma obviamente un valor de 0 en el caso contrario), $\langle \delta_P \rangle$ es el valor medio de δ_P ($\sum \delta_P / N_S$), N_S es el número total de secuencias y la suma es sobre todas las secuencias. Los valores de covarianza pueden ser positivos o negativos. Se toman valores suficientemente grandes de σ_{XY} , independientemente de su signo, como indicación de mutaciones correlacionadas en las posiciones X e Y.

Es importante destacar, que los valores de covarianza calculados de acuerdo con la ecuación (4.1) son cero si una de las posiciones está perfectamente conservada, es decir, no cambia a lo largo del alineamiento.

El cálculo anterior produce 5778 valores de covarianza correspondientes, claro está, a 5778 parejas de residuos posibles en tiorredoxina que posee 108 aminoácidos ($108 \cdot 107 / 2 = 5778$). En la figura 4.2 se muestra la representación de la distancia entre

residuos frente a valores de covarianza ($|\sigma|$). La figura 4.2 A es para distancias entre residuos medidas entre átomos más cercanos; por su parte, la figura 4.2 B, muestra las distancias medidas entre carbonos- α . Si nos fijamos, las representaciones de la figura 4.2 tienen forma triangular, es decir, para un valor de covarianza dado, se observa un cierto rango de distancias entre residuos; la distancia promedio y el rango muestra una tendencia a decrecer cuando los valores de covarianza crecen por encima de 0.08, aproximadamente. Este resultado sugiere que, al menos en este caso, la relación entre la estructura y el alineamiento de secuencias está determinada de forma significativa, por un acoplamiento a larga distancia. Es importante destacar, que si la relación entre estructura-alineamiento estuviera dominada por interacciones de contacto (típicamente ~ 5 Å), deberíamos esperar que la representación de la distancia residuo-residuo frente a la covarianza (en valor absoluto) tuviera forma de “L”, con la mayoría de las distancias entre residuos cortas para un valor de covarianza.

Otra característica sorprendente que surge al examinar las representaciones de distancia entre residuos frente a valor absoluto de covarianza, en particular la representación basada en las distancias entre carbonos- α , es que distancias correspondientes a altos valores de covarianza parecen estar organizadas en capas correspondientes a distancias de 6, 12, 18, 24 y 30 Å.

```
SDKI IHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAIEWCGPCKMIAP ILDEIADEYQ GK...
SDKI IHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAIEWCGPCKMIAP ILDEIADEYQ GK...
SDKI IHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAIEWCGPCKMIAP ILDEIADEYQ GK...
SDKI IHLSDDSFDTDVLKASGLVLVDFWAIEWCGPCKMIAP ILDEIAEEYEGR...
SDKILQLTDDGFENDV IKAAGP VLVDFAIEWCGPCKMIAP ILDEVADEYAGK...
SDKILQLTDDGFENDV INAAGP VLVDFAIEWCGPCKMIAP ILDEIAEEYEGR...
SDKILQLSDEGFENDV INAAGP VLVDFAIEWCGPCKMIAP ILDEIAEEYEGR...
SDKI IYLSDDSFENDVLKADLP VLVDFAIEWCGPCKMIAP ILDDVAEEYAGR...
SEHIVNVTDA SF EQDVLKADGP VLVDYWAIEWCGPCKMIAP VLDEVARDYQ GK...
NDLIKHVTDASFEADV LKADGAVLVDYWAIEWCGPCKMIAP VLDEIATTYAGK...
SDLIKHVTDASFEADV LKAEGAVLVDYWAIEWCGPCKMIAP VLDDIASTYEGR...
SDAILYVSDDSFETDVLKS SKP VLVDFAIEWCGPCKMIAP ILEEIADEYADR...
SDSIVHVTDDSFEEEVXKS PDP VLVDYWADWC GPCKMXAP VXDEIADEYAGR...
SEQIKYVSDASFEADV LKSDKP VLVDFAIEWCGPCKMIAP ILDEVSKDYGDK...
SELIVHTSDAAFEKDV LNADIP VLLDFWAPWC GPCKMIAP ILDDIAAEFEGR...
SELIVHTGDAAFEQDVLKS DLP VLLDFWAPWC GPCKMIAP ILDDIAAEFEGR...
SQHIHYVTDASFESEVLQCPVP VLVDYWAIEWCGPCKMIAP LLEIASEYGDR...
SDKVQHVGDADFDTAVLQAGEP VLVDFAIEWCGPCKMIAP VLDDLADTYQGR...
SDKVQHVGDADFDTAVLQSGEP VLVDFAIEWCGPCKMIAP VLDDLADTYQ GK...
*NKI IELTDQNFEEQVLNS KSFFLVDFWAQWCNPCKILAP ILEEISKEYSNK...
*NKI IELTDQNFEEVLEHKS FVLVDFAIEWCNPCKILAP ILEEIAQEYFNK...
***IVELTDGIFKQYILESKKAVLVDFAIEWCNPCKILAP ILEDIAKEYEHK...
**KI INVNEENFEKNILQEKNF ILVDFAIEWCNPCKILAP ILEEIANEYQDK...
SEHVHTASDENFETEVLQADMP VLVDFAIEWCQPCKMISP VVEEIAKEYAGR...
SDSIVHVTDDSFEDEV LKSLP VLVDYWADWC GPCKMIAP VLDEIAGEYAGR...
*****VSDASFEEDVLKADGP NXVDFWAIEWCGP CRQXAP ALEELATALGDK...
**EVLHSTDATEFTADV VNS DVP VLLDFWAPWC GPCKMISP ILDEIAAEFSGK...
```

Figura 4.1 Fragmento del alineamiento de secuencias para tiorredoxina de *E. coli* realizado mediante BLAST 2 (Gish W. (1996-2003) <http://blast.wustl.edu>) y tomando secuencias de la base de datos Uniprot/TrEMBL (<http://www.ebi.ac.uk/tr embl>). Para el caso de tiorredoxina se obtuvieron 490 secuencias, tomando como límite de similaridad 0.25.

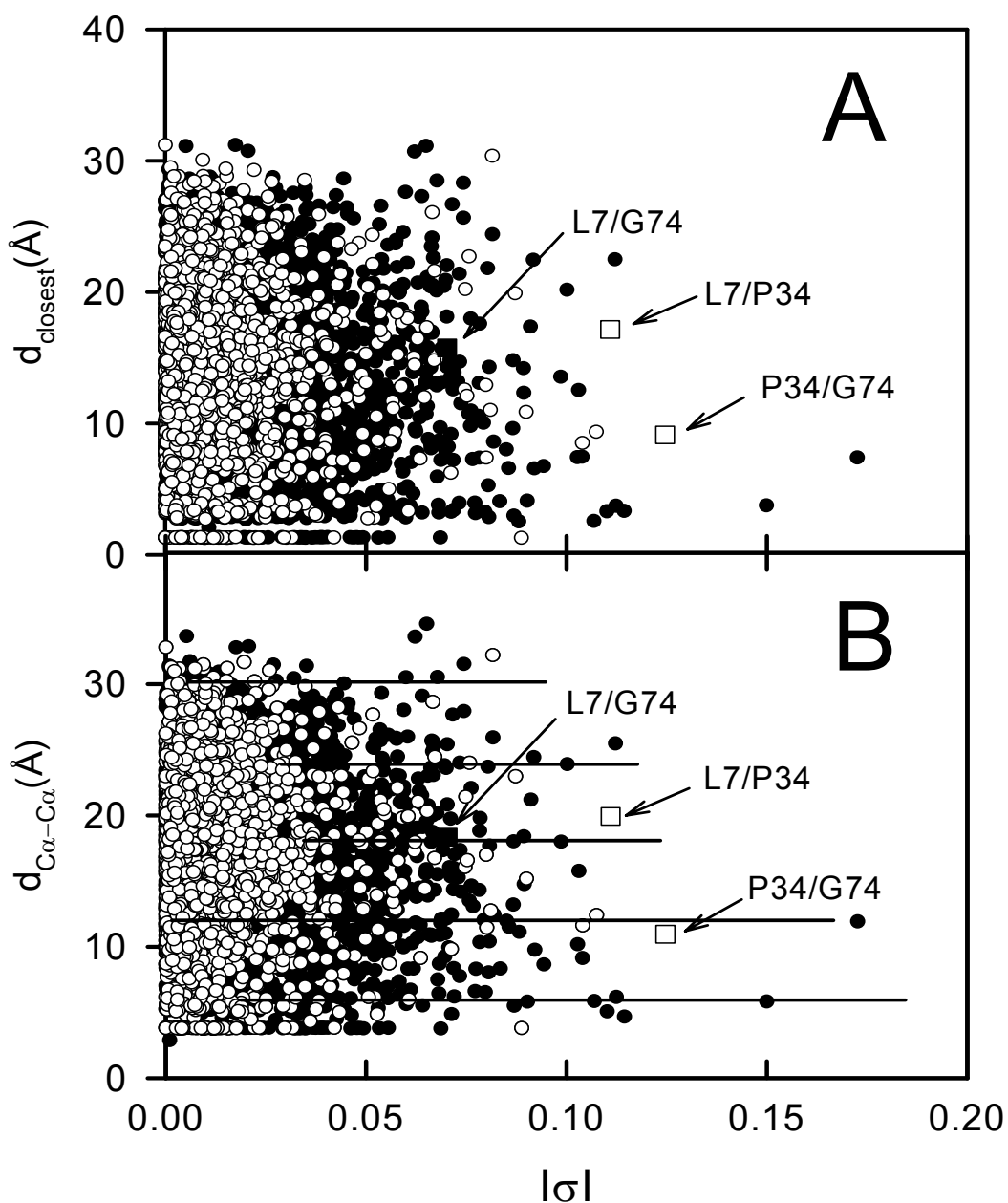


Figura 4.2. Representación de distancias entre residuos frente a valor absoluto de covarianza para tiorredoxina. Los valores de covarianza están calculados a partir del alineamiento de secuencias empleando la ecuación 4.1. Los valores negativos de covarianza se muestran con símbolos huecos, los valores positivos con símbolos rellenos. Las distancias entre residuos están medidas entre átomos más cercanos, A; y entre carbonos- α , B. Las líneas horizontales en el panel B son para valores de distancia de: 6, 12, 18, 24 y 30 Å. En ambas gráficas se indican las parejas que implican a los residuos 7, 34 y 74.

Estas distancias entre residuos podrían verse como múltiplos de distancias típicas entre carbonos- α para residuos en contacto (5-6 Å), lo cual sugiere una comunicación a larga distancia a través de una red lineal de residuos conectados en el estado nativo, o quizás en el estado desnaturalizado, con alguna estructura residual.

4.3 Análisis de la estabilidad mediante los ciclos de dobles y triples mutantes.

El análisis anterior sugiere un acoplamiento a larga distancia entre residuos. Como se ha dicho antes, para comprobar esto experimentalmente se pueden realizar los ciclos de dobles mutantes. En concreto, para este caso vamos a realizarlos para las interacciones 34-74 y 34-7. El valor absoluto de covarianza para estas parejas de residuos es alto, 0.125 y 0.110, respectivamente, y como puede verse en la figura 4.3, están en posiciones alejadas espacialmente, con lo cual no hay contacto en la estructura nativa.

Además de los anteriormente mencionados, se realizó el análisis de la interacción 7-74 así como el triple mutante, pudiendo completar así el ciclo de triple mutante. Todas las mutaciones se realizaron según los procedimientos descritos en el apartado 2.2.1. En todos los casos, las mutaciones realizadas fueron al aminoácido que con más frecuencia aparecía en la posición dada en el alineamiento de secuencias, que como puede verse en la figura 4.4, para las posiciones en estudio son: P34→H, G74→S, L7→V.

Es importante destacar que, la vista de la figura 4.2 podemos ver que existen otros acoplamientos que poseen valores de covarianza mayores a los acoplamientos señalados

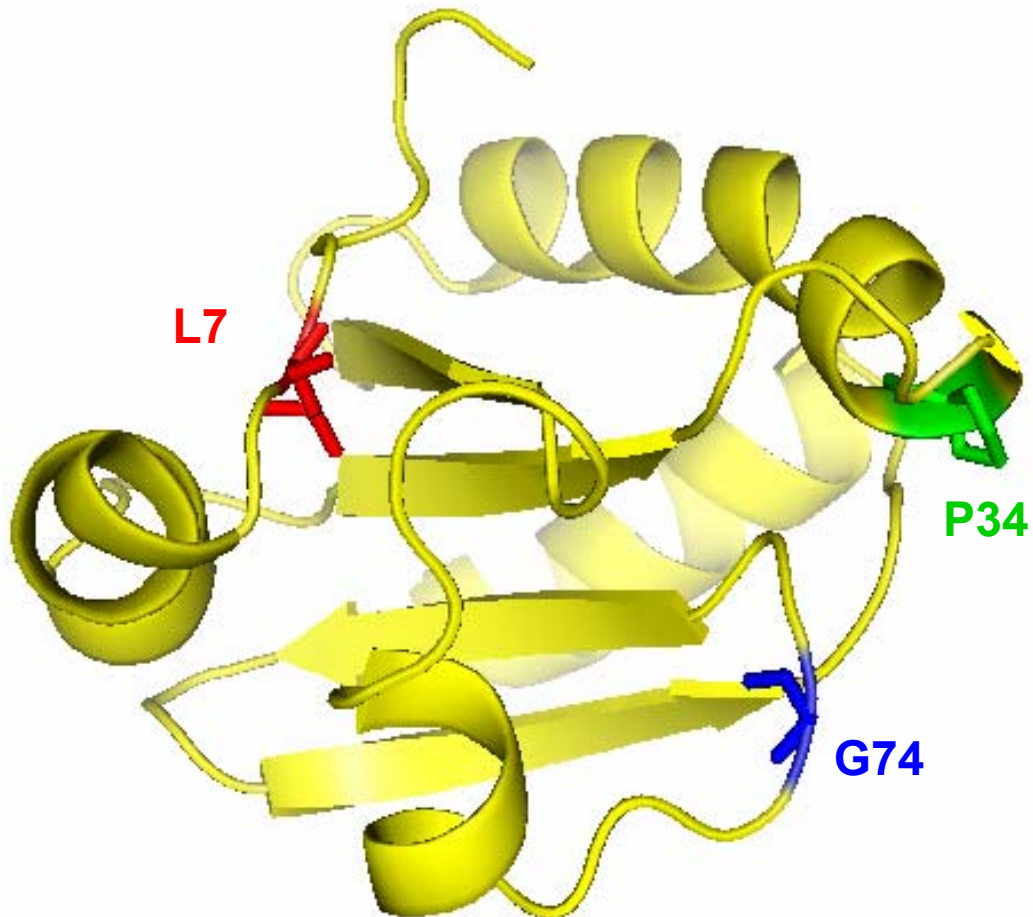


Figura 4.3. Representación de la estructura de rayos X de tiorredoxina WT (2trx.pdb) mostrando los tres residuos usados en el análisis de covarianzas, L7, P34 y G74

y que se encuentran en posiciones también alejadas. No obstante, estos acoplamientos implican al residuo aspartato 26 que es un residuo catalítico y se tomó la decisión de no modificarlo.

La estabilidad de todos los mutantes realizados para completar el ciclo de triple mutante (L7V, P34H, G74S, L7V/P34H, L7V/G74S, P34H/G74S y L7V/P34H/G74S) se determinó por calorimetría diferencial de barrido. Los experimentos se realizaron de la misma forma que se ha descrito en la sección 3, en HEPES 5 mM pH 7. Se realizaron experimentos a diferentes concentraciones de proteína en el rango 0.1-0.5 mg/mL con objeto de comprobar si existe efecto de concentración en la temperatura de desnaturalización, el cual no fue detectado.

La desnaturalización térmica de todos los mutantes se mostró altamente reversible, por encima del 90% cuando la muestra se calienta hasta justo después de la transición, y todos los perfiles se ajustaron perfectamente siguiendo el modelo de dos estados mediante la ecuación (3.8).

Los perfiles de DSC se muestran en la figura 4.5 Los valores de temperatura de desnaturalización y cambio de entalpía obtenidos del ajuste, se recogen en la tabla 4.1. A partir de todos los experimentos hechos a diferentes concentraciones para cada proteína, se obtienen los parámetros termodinámicos y los valores de error estándar. Como puede verse el valor de T_m de WT difiere ligeramente del expuesto en la sección 3. Estos experimentos fueron realizados en un calorímetro diferente y una variación de 0.3-0.4 °C es normal. No obstante, los valores son iguales considerando los errores.

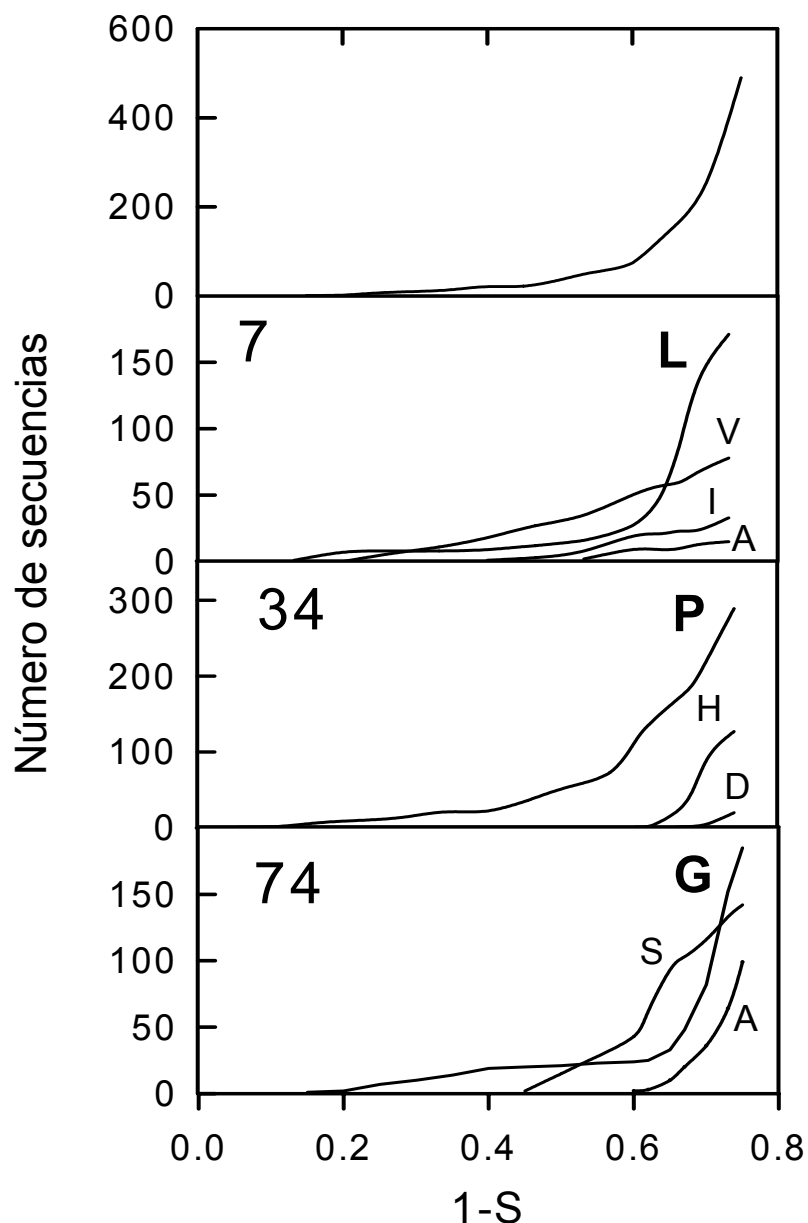


Figura 4.4. Distribución por similitud con la secuencia de partida de las 491 secuencias alineadas con tiorredoxina usando el programa BLAST2 y empleando como base de datos UniProt/TrEMBL (<http://www.ebi.ac.uk/trembl>). Las representaciones dan los números de secuencias por debajo de un valor umbral de similitud (s), frente a 1 menos la similitud. La parte de arriba da el número total de secuencias por debajo de la similitud umbral, mientras que en las otras representaciones el número de secuencias está clasificado de acuerdo al aminoácido presente en la posición indicada (7, 34 ó 74). En cada caso, el tipo de aminoácido presente en la secuencia de tiorredoxina se muestra con letra en negrita y de mayor tamaño. Con estas gráficas se deciden las mutaciones a realizar, que son: L7V, P34H y G74S.

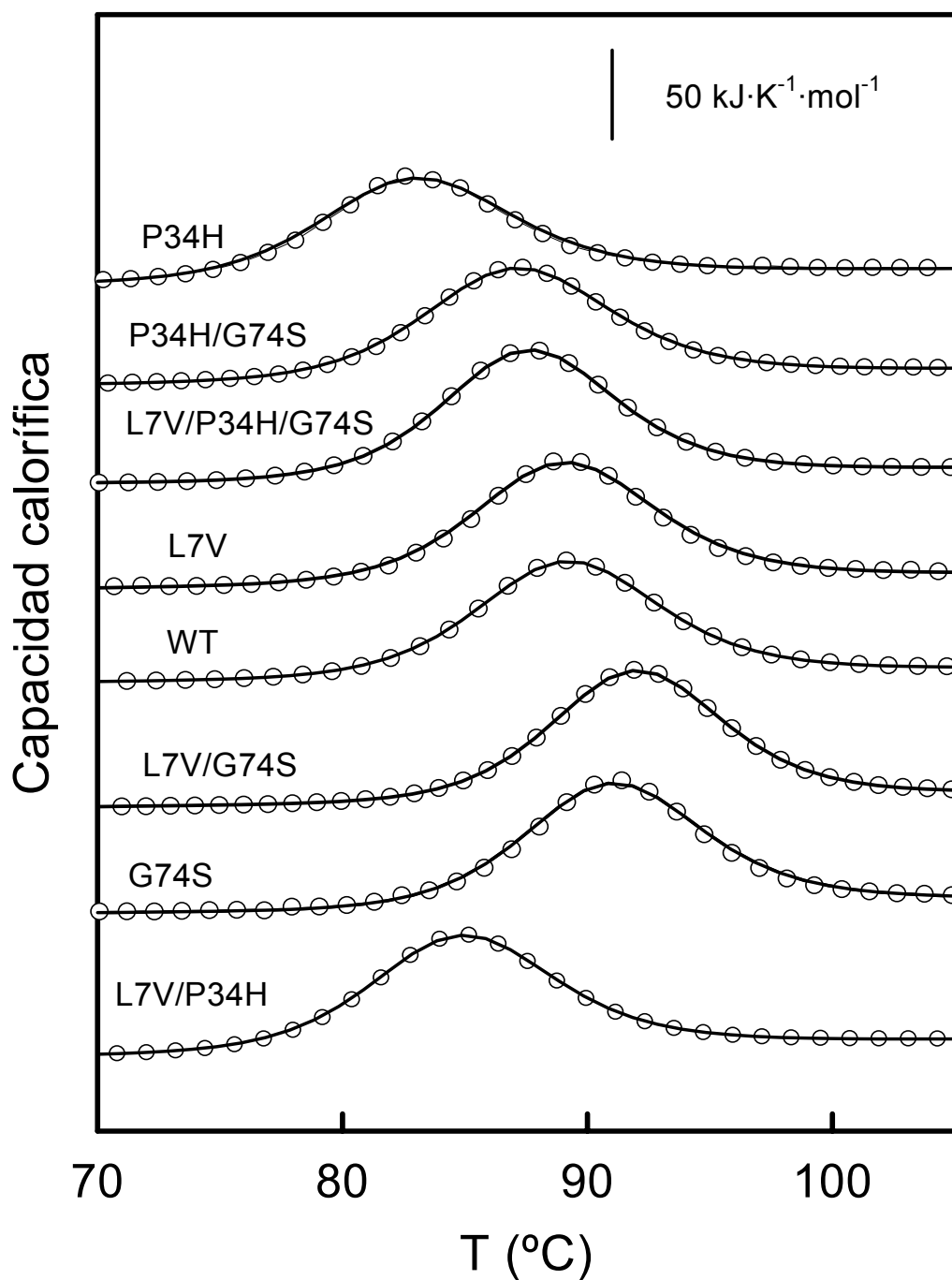


Figura 4.5. Perfiles de DSC para los mutantes simples L7V, P34H y G74S, los mutantes dobles y el mutante triple que generan en tampón HEPES 5 mM pH 7 y concentración de proteína 0.5 mg/mL. Los círculos representan datos experimentales y las líneas son los ajustes de los datos experimentales según el modelo de dos estados empleando la ecuación (3.8).

VARIANTE	$T_m(^{\circ}\text{C})$	$\Delta H_m(\text{kJ/mol})$
WT	89.2±0.1	430±10
P34H	83.6±0.2	409±1
G74S	91.6±0.1	461±2
L7V	89.7±0.1	461±14
L7V/P34H	85.0±0.1	479±1
P34H/G74S	87.6±0.1	435±3
L7V/G74S	92.4±0.1	430±5
L7V/P34H/G74S	87.6±0.1	469±2

Tabla 4.1. Relación de temperaturas de desnaturalización y cambios de entalpía de desnaturalización para WT, los mutantes simples L7V, P34H y G74S, así como los mutantes dobles y el mutante triple que generan, obtenidos mediante experimentos de DSC. Los valores se han obtenido a partir del análisis según el modelo de dos estados empleando la ecuación (3.8). Para todos los casos se realizaron varios experimentos en el rango de concentración 0.1-0.5 mg/mL. Los errores se obtienen a partir de todos los experimentos como desviación estándar.

La figura 4.6 muestra una representación de entalpía de desnaturalización frente a temperatura de desnaturalización para todos los mutantes en estudio. La pendiente obtenida es el cambio de capacidad calorífica, obteniendo un valor de $6.2 \pm 2.2 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$, consistente con el valor de ΔC_p de $6.1 \pm 0.4 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ que fue determinado de manera precisa a partir de medidas de capacidad calorífica absoluta de los estados nativo y desnaturalizado de tiorredoxina WT (Georgescu et al., 2001).

Para obtener el efecto de las mutaciones en la estabilidad termodinámica (valores de $\Delta\Delta G$) primero obtenemos el cambio de energía libre a 361 K mediante la extrapolación de Gibbs-Helmholtz:

$$\Delta G(361K) = \Delta H_m \cdot \left(1 - \frac{361}{T_m}\right) + \Delta C_p \left\{361 - T_m - 361 \cdot \ln\left(\frac{361}{T_m}\right)\right\} \quad (4.2)$$

El hecho de que tomemos 361 K como temperatura de referencia hace más bien corta la extrapolación de temperaturas para todas las variantes en estudio. De la misma forma que ya vimos para el caso del mutante T14K (sección 3.14), los valores de $\Delta\Delta G$ se calculan como:

$$\Delta\Delta G = \Delta G_{\text{VARIANTE}}(361K) - \Delta G_{\text{WT}}(361K) \quad (4.3)$$

Para los cálculos se empleó un valor de ΔC_p de $6.1 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$; no obstante se realizaron cálculos cambiando el valor de ΔC_p en $\pm 2 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$, encontrando en efecto muy pequeño en los valores de $\Delta\Delta G$, de aproximadamente una décima de kJ/mol. De la misma manera se modificaron los valores de ΔH_m , en este caso en $\pm 20 \text{ kJ/mol}$, y los efectos fueron similares en $\Delta\Delta G$. Como test adicional de la precisión de nuestros cálculos, se determinaron los valores de $\Delta\Delta G$ a partir de la ecuación de Schellman, ecuación (3.9), la cual sólo requiere valores de cambio de entalpía de desnaturalización y temperatura de desnaturalización de WT y valores del efecto de la mutación en la temperatura de desnaturalización. Los resultados así obtenidos diferían en unos 0.2 kJ/mol de los valores de ΔG obtenidos a partir de la extrapolación de Gibbs-Helmholtz.

Por tanto, el valor de 0.2 kJ/mol es razonable como error asociado a los valores de $\Delta\Delta G$ obtenidos.

Las energías de acoplamiento se calcularon a partir de los valores de $\Delta\Delta G$ (Horovitz y Fersht, 1990):

$$\Delta G_f(i, j) = \Delta\Delta G(i, j \rightarrow 0, j) - \Delta\Delta G(i, 0 \rightarrow 0, 0) \quad (4.4)$$

donde $i, j \rightarrow 0, j$ se refiere a la mutación en i cuando j no ha sido cambiado, $i, 0 \rightarrow 0, 0$ se refiere a la misma mutación cuando el sitio j ha sido previamente mutado, y $\Delta G_f(i, j)$ es el cambio de energía libre de acoplamiento entre los sitios i y j .

En la figura 4.7 se muestran los efectos de las mutaciones, valores de $\Delta\Delta G$, correspondientes al ciclo del triple mutante que generan las mutaciones en las posiciones 7, 34, 74. Las energías de acoplamiento obtenidas de todos los ciclos de dobles mutantes se muestran en la figura 4.8, calculados mediante la ecuación (4.4) para dos posibles casos: 1) el tercer residuo permanece en el forma WT (figura 4.8 A); 2) el tercer residuo ha sido mutado (figura 4.8 B).

Se obtienen valores de entorno a - 0.8 kJ/mol y 0.5 kJ/mol para $\Delta G_f(7,34)$, $\Delta G_f(7,74)$, respectivamente y -1.7 kJ/mol para $\Delta G_f(34,74)$ cuando el tercer residuo en cada caso no está mutado (figura 4.8 A). Estos valores son significativos en este contexto, ya que se ha encontrado efectos de mutaciones en la estabilidad

termodinámica del mismo orden de magnitud, que correlacionan con la frecuencia de aparición de residuos en el alineamiento de secuencias (Godoy-Ruiz et al., 2004).

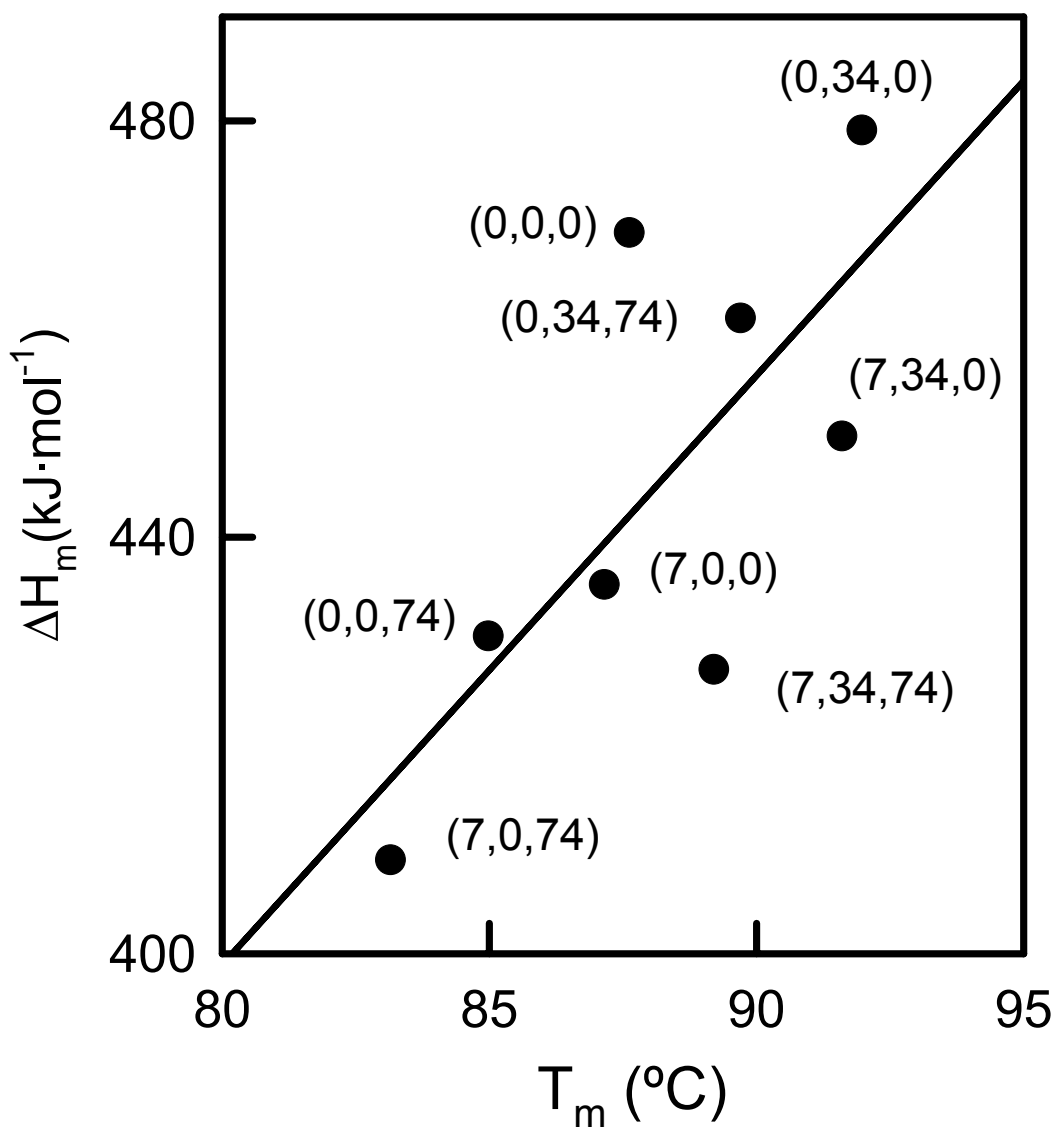


Figura 4.6. Representación de ΔH_m frente a T_m para todas las formas mutantes sugeridas en el alineamiento de secuencias. La línea representa el ajuste lineal de estos datos, dando una pendiente de $6.2 \pm 2.2 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$, consistente con el valor de ΔC_p de $6.1 \pm 0.4 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ de la bibliografía (Georgescu et al., 2001).

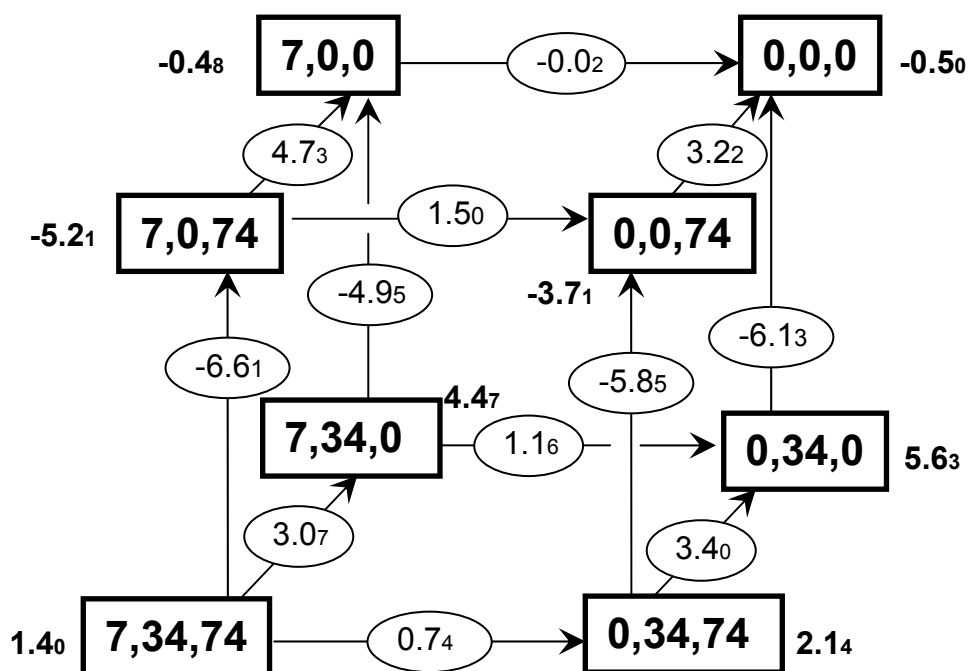


Figura 4.7. Cubo con los resultados del análisis del triple mutante a partir de los residuos 7, 34 y 74. Las diferentes variantes se especifican dando el número de residuo o ceros en caso de que el residuo haya sido mutado. Los números cerca de cada variante, en negrita, son los cambios de energías libres a 361 K en kJ/mol. El efecto de las mutaciones en la energía libre (valores de $\Delta\Delta G$ en kJ/mol) está dado en las flechas que conectan las variantes. Para los valores de $\Delta\Delta G$ asumimos un error de 0.2 kJ/mol.

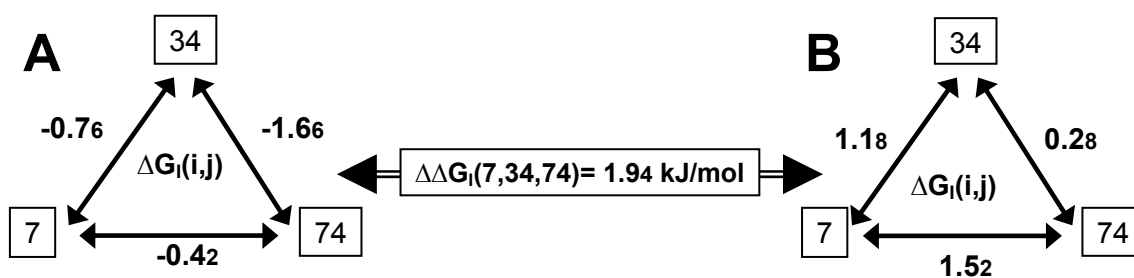


Figura 4.8. Energías de acoplamiento (en kJ/mol) calculadas a partir de los 6 ciclos de dobles mutantes que conforman el ciclo de triple mutante, para dos posibles casos: 1) el tercer residuo permanece igual que en WT (A); 2) el tercer residuo está mutado (B). El número en la doble flecha que conecta A y B es el efecto de la mutación en un residuo en la energía de acoplamiento de los otros dos.

Las energías de acoplamiento entre dos residuos se hacen positivas cuando el tercer residuo está mutado (figura 4.8 B) y el efecto de mutar un residuo en la energía de acoplamiento entre los otros dos (diferencia entre valores de $\Delta G_I(i,j)$), $\Delta\Delta G_I(i,j,k)$ es 1.94 ± 0.40 kJ/mol, lo cual es un valor significativo.

Por lo tanto, como sugiere el análisis de covarianza, existe un acoplamiento entre los residuos 7, 34 y 74, a pesar de que no se encuentran en contacto en la estructura nativa. Es concebible que este acoplamiento esté relacionado, al menos en parte, con efectos en el estado desnaturalizado, una posibilidad sustentada por el hecho de que las mutaciones en posición 34 y 74 eliminan una prolina y una glicina, respectivamente. Es importante destacar que el residuo en posición 34 se encuentra en un pequeño giro cerca del puente disulfuro entre las cisteínas 32 y 35, por lo que los efectos en la entropía conformacional del estado desnaturalizado asociados a la eliminación de la prolina no son esperados en este caso. En cualquier caso, estamos llevando a cabo experimentos de cristalización para determinar la estructura por rayos X de las variantes implicadas en el ciclo de triple mutante. Así se podrá determinar si existen cambios conformacionales en la estructura del estado nativo.

4.4 Caracterización estructural de las formas mutantes mediante CD y cristalografía de rayos X.

La integridad estructural de los mutantes L7V, P34H, G74S y de los dobles y el triple que generan, se determinó mediante dicroísmo circular de la misma forma y en las mismas condiciones en las que se determinó para tiorredoxina WT y la variante T14K

(apartado 3.4). Como puede verse en la figura 4.9 sólo se detectan cambios moderados en la señal de elipticidad con respecto a la forma WT, que también está incluida en esta figura.

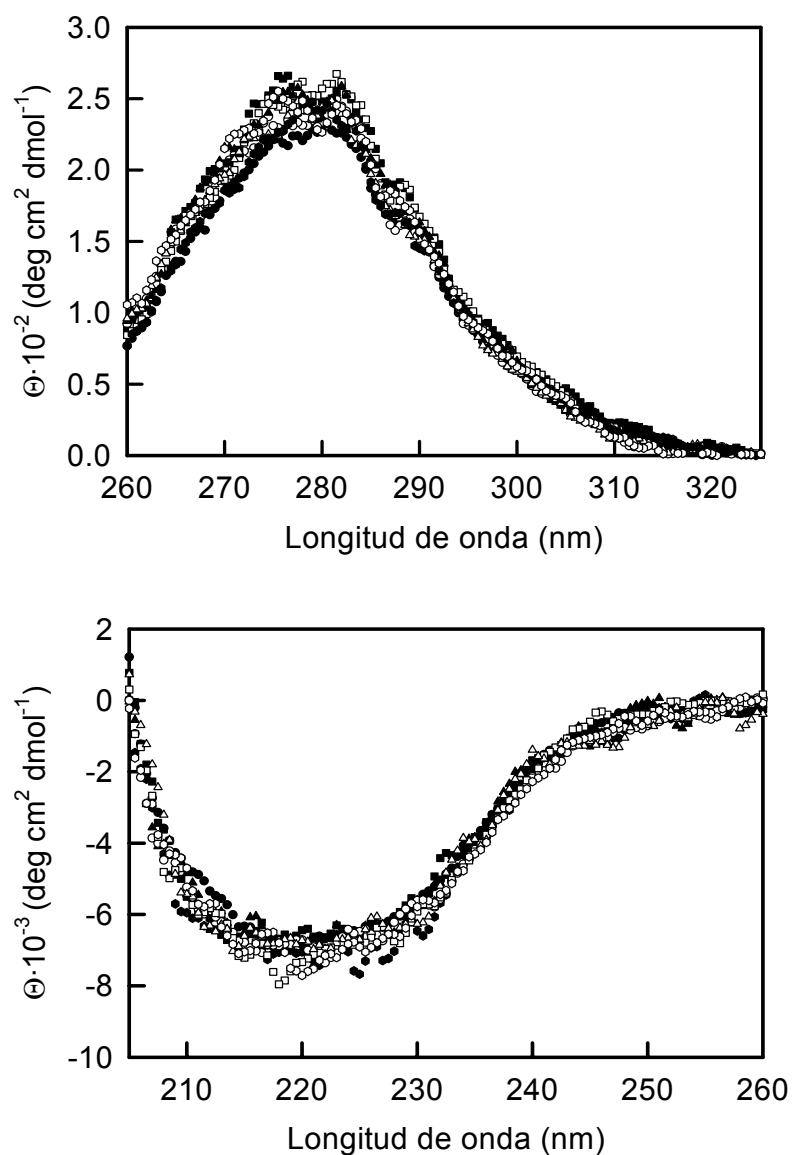


Figura 4.9. Espectros de CD, cercano (arriba) y lejano (abajo), para tiorredoxina WT y las variantes en estudio en tampón HEPES 5 mM pH 7 y concentración de proteína 0.8 mg/mL para UV-cercano y 0.2 mg/mL para UV-lejano. El significado de los símbolos es: WT (círculos rellenos), L7V (cuadrados rellenos), P34H (triángulos rellenos), G74S (hexágonos rellenos), L7V/P34H (círculos huecos), L7V/G74S (cuadrados huecos), P34H/G74S (triángulos huecos), L7V/P34H/G74S (hexágonos huecos). La velocidad de barrido fue de 50 nm/min.

Para obtener información estructural a nivel atómico vamos a emplear la cristalografía de rayos X. Como ya se comentó en el apartado 2.2.8, la obtención de cristales de proteína de calidad suficiente para ser difractados es compleja y requiere numerosos experimentos. Hasta el momento se han obtenido cristales de los tres mutantes simples. La obtención de las estructuras de estos tres mutantes, debería de ser suficiente para constatar que estas mutaciones no producen efectos considerables en el estado nativo, tal y como sospechamos. No obstante, sólo los cristales del mutante L7V, tienen, en el momento de escribir esta tesis, la calidad suficiente para ser difractados. En la figura 4.10 podemos ver la estructura del mutante L7V, obtenida por reemplazamiento molecular a partir de datos de difracción del cristal mostrado en la figura 2.13. La figura 4.11 muestra la estructura del mutante L7V junto con la de tiorredoxina WT, obtenida del Protein Data Bank.

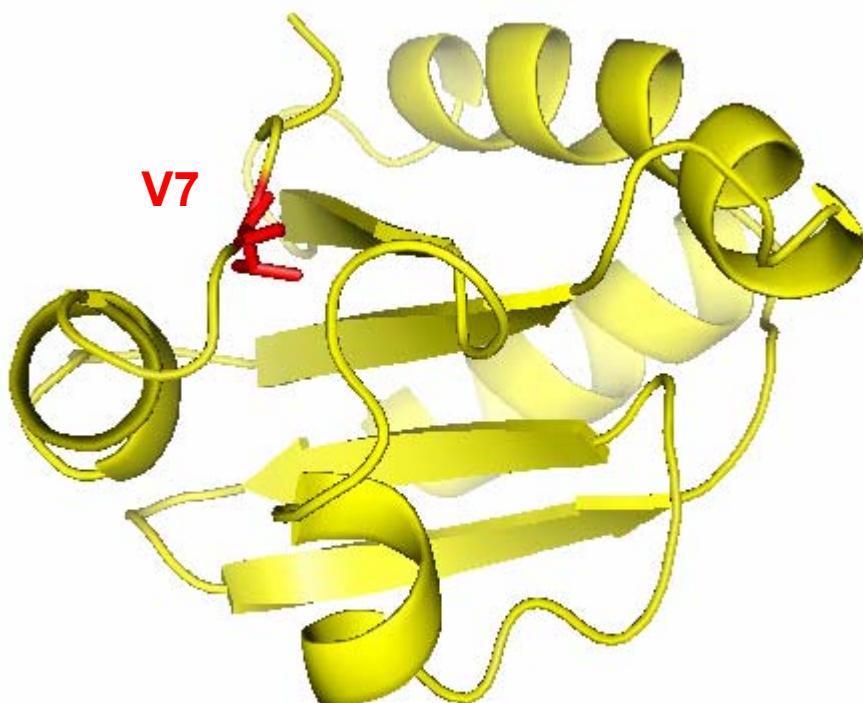


Figura.4.10. Representación de la estructura de rayos X de tiorredoxina mutante L7V.

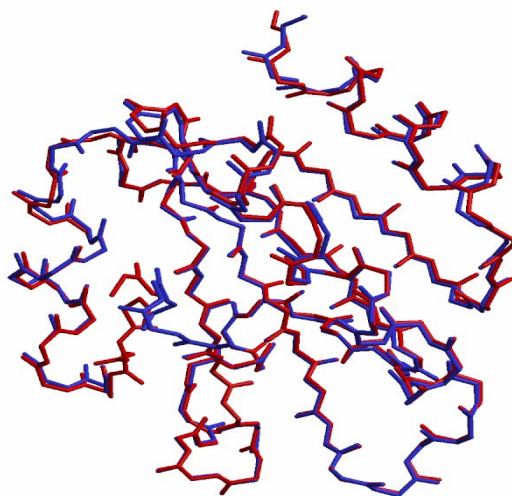


Figura. 4.11 Comparativa de estructuras de rayos X de tiorredoxina WT (azul), 2trx.pdb, y mutante L7V (rojo). Los efectos de la mutación parecen no afectar al estado nativo.

A partir de las estructuras de tiorredoxina WT y la variante L7V se ha determinado el valor RMSD (desviación estándar), mediante el programa *Xtalfit*, resultando ser de 0.5 Å para todos los carbonos α y 1.0 Å para todos los átomos, demostrando que ambas estructuras son muy similares. Esto sugiere que los efectos de esta mutación, y posiblemente de las mutaciones P34H y G74S, no afectan a la estructura del estado nativo.

4.5 Ensayos de actividad de los mutantes sugeridos por el alineamiento de secuencias.

Uno de los factores que se pueden ver influenciados al realizar estas mutaciones y que es de importancia en el diseño de proteínas, es la actividad. Para todos los mutantes implicados en los acoplamientos a larga distancia sugeridos por el

alineamiento de secuencias, se han hecho medidas de actividad de la forma descrita en el apartado 2.2.3. Se puede determinar mediante el ensayo con DTNB (Slaby y Holgrem, 1979) que la actividad de todos los mutantes es similar a la actividad de WT, excepto en el caso del mutante P34H y las variantes que lo contienen, las cuales muestran unos valores significativamente mayores. Este incremento de actividad de la forma mutante P34H, ya había sido observado con anterioridad (Lundström et al., 1992). Se ha propuesto que la introducción de la histidina juega un papel importante desde un punto de vista catalítico aumentando la actividad. La figura 4.12 muestra una representación de la actividad frente a los mgs de proteína, de cuya pendiente podemos obtener la actividad específica de cada mutante (ver tabla 4.2).

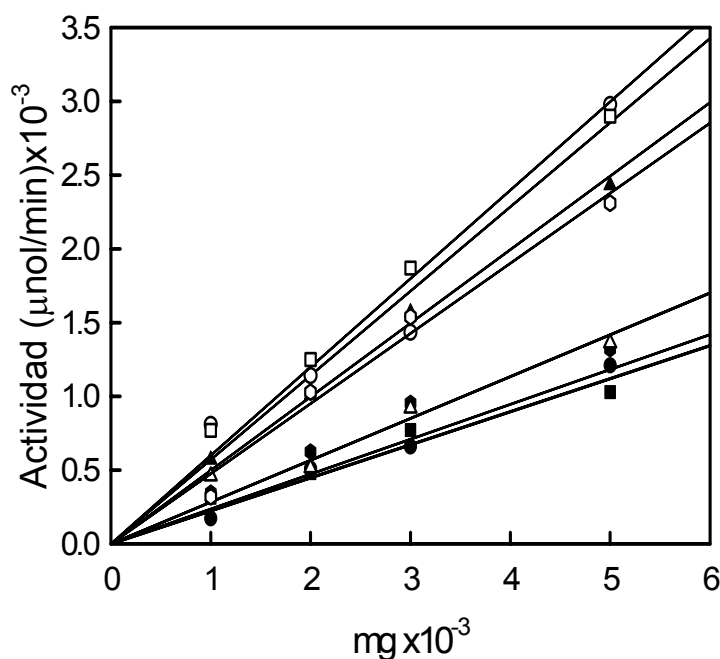


Figura 4.12. Actividad de tiorredoxina WT y formas mutantes a diferentes concentraciones de proteína. Los símbolos representan los datos experimentales: WT (círculos rellenos), y formas mutantes, L7V (cuadrados rellenos), P34H (triángulos rellenos), G74S (hexágonos rellenos), L7V/P34H (círculos huecos), P34H/G74S (cuadrados huecos), L7V/G74S (triángulos huecos) y L7V/P34H/G74S (hexágonos huecos). Las líneas representan los ajustes a un polinomio de primer grado, en cada caso.

VARIANTE	Actividad/mg
WT	0.238±0.007
P34H	0.494±0.008
G74S	0.277±0.012
L7V	0.220±0.008
L7V/P34H	0.569±0.002
P34H/G74S	0.594±0.011
L7V/G74S	0.297±0.010
L7V/P34H/G74S	0.476±0.011

Tabla 4.2. Actividades de tiorredoxina WT y formas mutantes por mg de proteína, determinadas mediante ensayos con DTNB (Slaby y Holgrem, 1979).

4.6 Empleo de mutaciones no sugeridas por el alineamiento de secuencias como control.

Una duda que puede surgir es si existe acoplamiento entre residuos en el caso de que alguna pareja de residuos no presente un alto valor de covarianza, es decir, que existan acoplamientos no sugeridos por el alineamiento de secuencias. Para comprobar esto, se ha realizado el análisis del ciclo del triple mutante introduciendo la mutación T14K en combinación con los mutantes L7V y G74S. EL valor de covarianza de las parejas 7-14 y 14-74 es 0.0051 y 0.0057, respectivamente, que es considerablemente más bajo que en el caso de las parejas 7-34, 34-74 y 7-74.

El hecho de elegir la mutación T14K, además de por el bajo valor de covarianza que presenta la posición 14 con las otras posiciones, es porque tenemos la sospecha de

que esta mutación de carga puede estar afectando a la electrostática del estado desnaturalizado. Esta variante fue ampliamente caracterizada en la sección 3. Si consideramos el hecho de que las mutaciones sugeridas por el alineamiento de secuencias también pueden estar afectando al estado desnaturalizado, la combinación de ambos tipos de mutaciones, por un lado nos puede ayudar al estudio del estado desnaturalizado y, por otro lado y desde un punto de vista práctico, también puede ser útil en el diseño de proteínas de alta estabilidad.

Es importante destacar que los residuos en las posiciones 7, 14 y 74 se encuentran alejados en la estructura nativa, a distancias superiores a 10 Å, evitando así cualquier posible interacción en el estado nativo. La figura 4.13 muestra la estructura de tiorredoxina WT indicando los residuos en las posiciones 7, 14 y 74

De la misma forma que para las mutaciones sugeridas por el alineamiento de secuencias, podemos realizar un estudio de estabilidad de los mutantes simples, dobles y el triple que generan las mutaciones en los residuos especificados L7V, T14K, G74S, L7V/T14K, L7V/G74S, T14K/G74S y L7V/T14K/G74S. Los valores de temperatura de desnaturalización y cambio de entalpía se recogen en la tabla 4.3, obtenidos mediante experimentos de DSC y analizados según el modelo de dos estados mediante la ecuación (3.8).

El tratamiento de los datos obtenidos para el cálculo de valores de energía libre necesarios para la elaboración del cubo de triple mutante se hace de la misma forma que en el caso anterior (apartado 4.3), se calcula el cambio de energía libre según la

extrapolación de Gibbs-Helmholtz a 361 K usando como valor de ΔC_p $6.1 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$, y el efecto de las mutaciones en la estabilidad termodinámica (valores de $\Delta\Delta G$), como la diferencia entre el valor del cambio de energía libre para el mutante y la forma sin mutar.

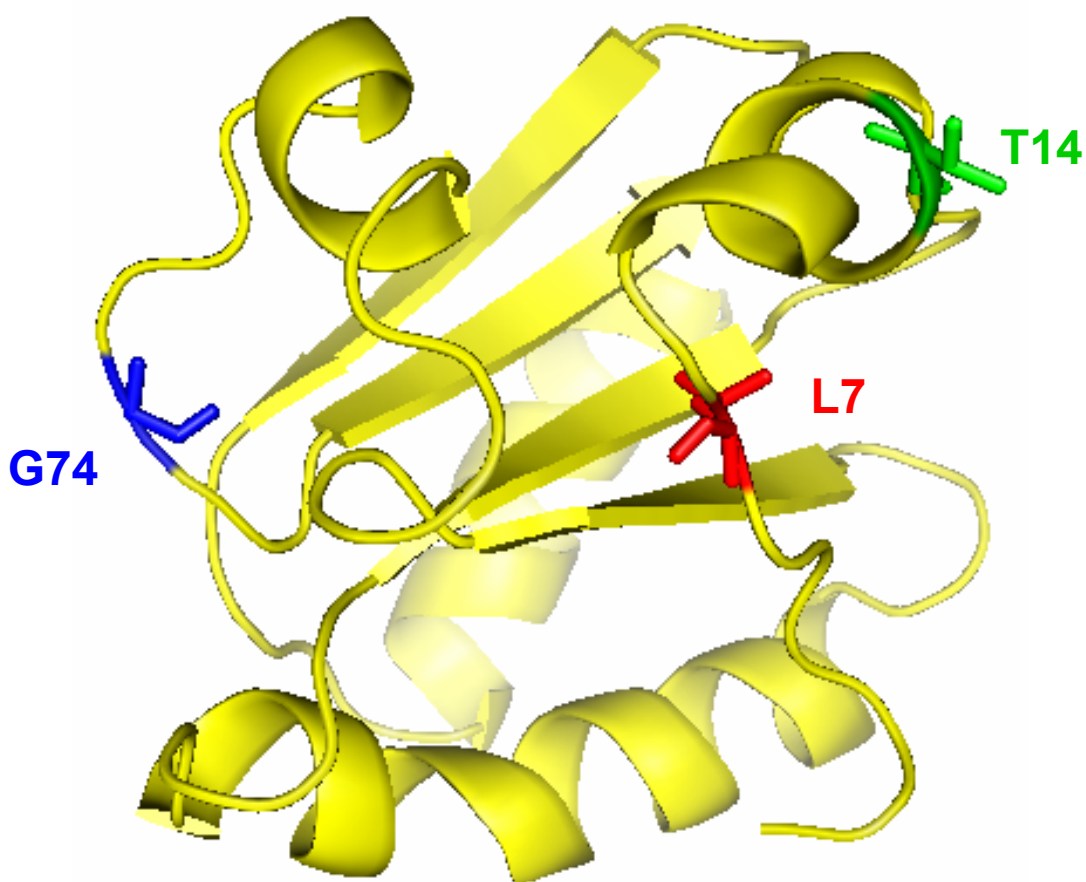


Figura 4.13 Representación de la estructura de rayos X de tiorredoxina WT mostrando los residuos en posiciones 7, 14, 74.

4. Alineamiento de secuencias

El nuevo ciclo de triple mutante se representa en la figura 4.14 y los valores de energía de acoplamiento en la figura 4.15. Es importante destacar, que todo lo que se dijo anteriormente acerca del ciclo y de las energías de acoplamiento es aplicable en este caso.

VARIANTE	$T_m(^{\circ}\text{C})$	$\Delta H_m(\text{kJ/mol})$
WT	89.2±0.1	430±10
L7V	89.7±0.1	461±14
T14K	90.3±0.1	426±8
G74S	91.6±0.1	461±2
L7V/T14K	90.8±0.1	493±9
L7V/G74S	92.4±0.1	430±5
T14K/G74S	94.0±0.1	490±6
L7V/T14K/G74S	93.6±0.1	499±6

Tabla 4.3 Relación de temperaturas de desnaturalización y entalpía de desnaturalización obtenidos mediante experimentos de DSC, de WT, T14K, los mutantes simples y dobles y el mutante triple generados a partir de los mutantes simples L7V, T14K y G74S. Los datos se han obtenido a partir del análisis según el modelo de dos estados empleando la ecuación (3.8).

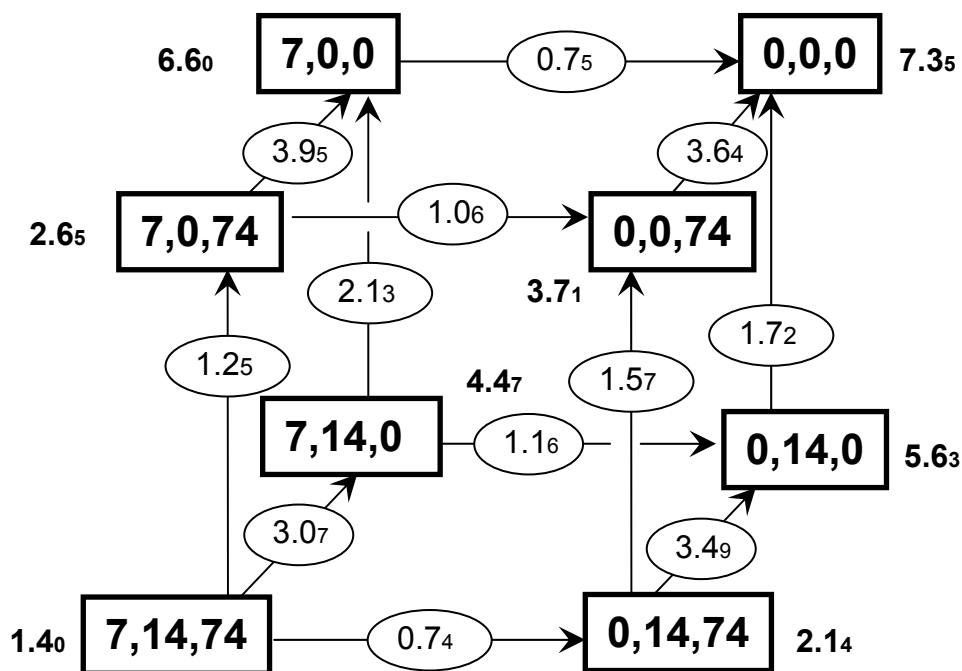


Figura 4.14. Cubo con los resultados del análisis del triple mutante a partir de los residuos 7, 14 y 74. Las diferentes variantes se especifican dando el número de residuo o ceros en caso de que el residuo haya sido mutado. Los números cerca de cada variante, en negrita, son las energías libres a 361 K en kJ/mol. El efecto de las mutaciones en los cambios de energía libre (valores de $\Delta\Delta G$ en kJ/mol) está dado en las flechas que conectan las variantes. Asumimos un error de 0.2 kJ/mol para los valores de $\Delta\Delta G$.

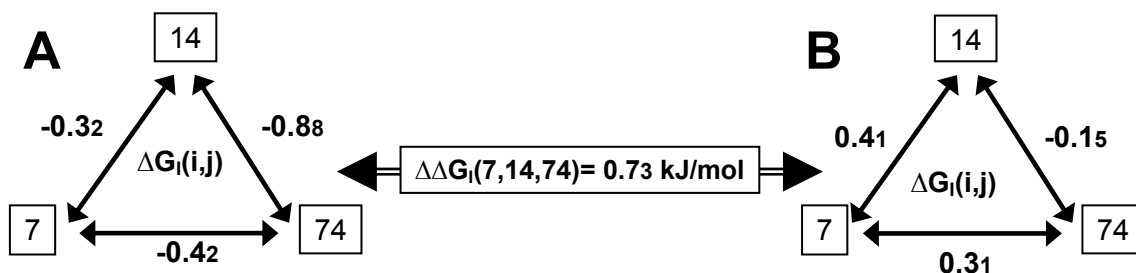


Figura 4.15. Energías de acoplamiento (en kJ/mol) calculadas a partir de los 6 ciclos de dobles mutantes que conforman el ciclo de triple mutante generado a partir de las mutaciones simples L7V, T14K y G74S, para dos posibles casos: 1) el tercer residuo permanece igual que en WT (A); 2) el tercer residuo está mutado (B). El número en la doble flecha que conecta A y B es el efecto de la mutación en un residuo en la energía de acoplamiento de los otros dos.

Como puede verse en la figura 4.15, el efecto de mutar un residuo en la energía de acoplamiento entre los otros dos, $\Delta\Delta G_I(i,j,k)$ es 0.73 ± 0.40 kJ/mol. Este resultado apoya, en cierta medida, que sería posible detectar acoplamiento a larga distancia a partir de los alineamientos de secuencias por comparación con el valor de 1.94 para $\Delta\Delta G_I(i,j,k)$ obtenido anteriormente. No obstante, llama la atención el hecho de que el valor de $\Delta\Delta G_I(i,j,k)$, empleando T14K como control, no es cero, dentro del error experimental, como cabría esperar, lo cual será discutido en el siguiente apartado.

4.7 Conclusiones

De los datos expuestos en las tablas 4.1 y 4.2, podemos deducir que a partir de la información obtenida de los alineamientos de secuencias, hemos obtenido formas mutantes más estables que tiorredoxina WT como G74S y L7V/G74S en las cuales la actividad respecto a WT no se ve afectada. Además, hemos visto que la mutación P34H produce un aumento notable de la actividad con respecto a WT si bien, es menos estable que WT y que es posible recuperar gran parte de esa estabilidad perdida combinando la mutación P34H con las mutaciones L7V y G74S sin que la actividad de se vea perjudicada. Por tanto, esto sugiere que sería posible emplear los alineamientos de secuencias para el diseño de proteínas de alta estabilidad sin perjudicar la actividad. Este es uno de los objetivos más ampliamente perseguidos en el diseño de proteínas con aplicaciones biotecnológicas. En nuestro caso, lo novedoso es que partimos del alineamiento de secuencias para el diseño de proteínas de alta estabilidad.

Asimismo, la información obtenida en los alineamientos de secuencias puede ayudarnos a estudiar el estado desnaturalizado ya que es posible que estas interacciones estén presentes en dicho estado. En la siguiente sección se realizará una caracterización cinética de los procesos de repliegamiento y desplegamiento de tiorredoxina WT y de las formas mutantes con objeto de determinar cambios estructurales producidos por las mutaciones tanto en el estado desnaturalizado como en el estado de transición.

Por otro lado, y en relación a la mutación T14K realizada como control, si tomamos el ciclo de doble mutante que conforman las mutaciones T14K y G74S (figura 4.16), podemos comprobar que la mutación T14K estabiliza más en presencia de la mutación G74S, llevando el valor de $\Delta\Delta G$ desde 1.25 ± 0.2 kJ/mol hasta 2.13 ± 0.2 kJ/mol, siendo la energía de acoplamiento de este ciclo de -0.88 ± 0.28 kJ/mol. El valor de $\Delta\Delta G$ de 2.13 está más cercano al valor teórico de la mutación individual T14K, que es aproximadamente 2.5 kJ/mol (figura 3.2)

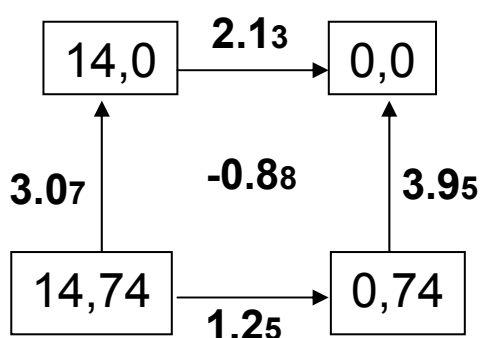


Figura 4.16. Ciclo de doble mutante para las mutaciones en los residuos 14, 74. Los números a lo largo de las líneas son los valores de $\Delta\Delta G$ y el valor en el centro es la energía de acoplamiento, ambos en kJ/mol. Asumimos un error de ± 0.2 kJ/mol para los valores de $\Delta\Delta G$.

Estos resultados sugieren que es posible que la mutación G74S pueda estar modificando las interacciones electrostáticas y que esta modificación se puede estar produciendo en el estado desnaturalizado, ya que son residuos que se encuentran alejados en la estructura nativa y según los alineamientos de secuencias no existe acoplamiento. Es posible que esta modificación se esté dando por la alteración de algún tipo de estructura residual en el estado desnaturalizado.

No obstante, los efectos observados son pequeños, apenas 1 kJ/mol, así, la idea sería combinar diferentes mutaciones tanto de carga como sugeridas por el alineamiento de secuencias para intentar conseguir efectos mayores en la estabilidad, lo cual ha abierto una nueva vía de investigación que actualmente es seguida en nuestro grupo por otros miembros.

A la vista de los resultados experimentales, podemos concluir que sería posible utilizar la información obtenida en el alineamiento de secuencias para el diseño de proteínas y que esta información puede ser utilizada desde el punto de vista de la estabilidad.

5. Estudios cinéticos de tiorredoxina y formas mutantes

5.1 Estudio mediante medidas de fluorescencia de las cinéticas de replegamiento y desplegamiento inducido por urea.

En esta sección se realizará un estudio cinético para completar el análisis de las formas mutantes sugeridas por los alineamientos de secuencias. A partir de cinéticas de replegamiento y desplegamiento podremos conocer como afectan las mutaciones realizadas, entre otras cosas, la estructura del estado de transición.

5.1.1 Análisis de los perfiles cinéticos de los ensayos de replegamiento y desplegamiento.

En la sección 2.2.7 de materiales y métodos se describió el procedimiento experimental para llevar a cabo las cinéticas de plegamiento y desplegamiento seguidas por medidas de fluorescencia y de cómo a partir de estas cinéticas se podían obtener los valores de τ mediante el ajuste de los perfiles cinéticos a las ecuaciones (2.43) y (2.45). Allí se realizó la descripción para tiorredoxina WT. De la misma forma se pueden realizar las cinéticas de desplegamiento y replegamiento para todas las formas mutantes sugeridas por los alineamientos de secuencias, obteniendo similares perfiles que se deben de analizar con las mismas ecuaciones.

En las figuras 5.1 a 5.7 podemos ver algunas cinéticas de plegamiento y desplegamiento seguidas mediante medidas de fluorescencia para todas estas formas mutantes, así como los correspondientes ajustes.

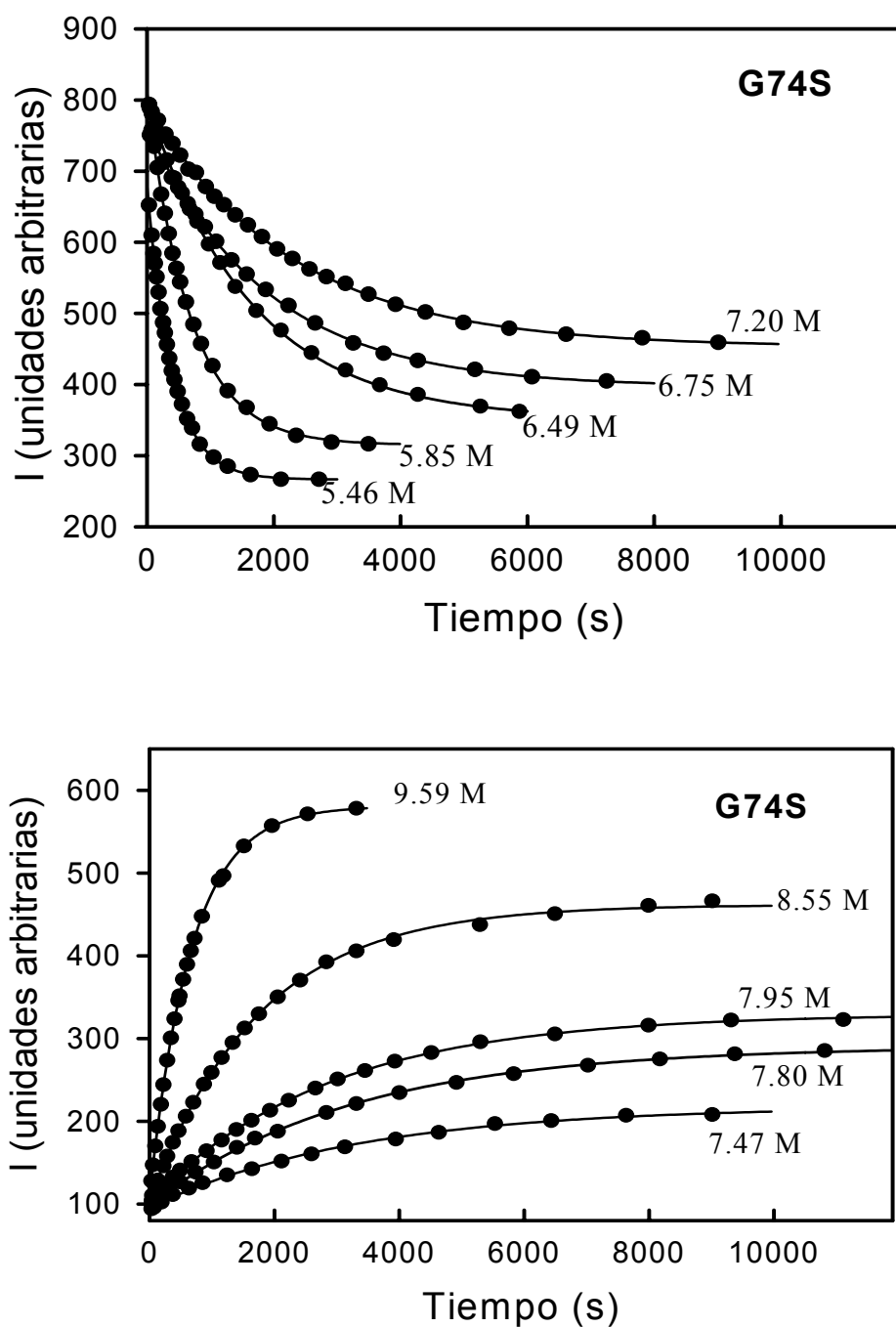


Figura.5.1 (Arriba). Perfiles cinéticos a 25 °C de replegamiento para G74S después de transferir una alícuota incubada en 9 M urea a las disoluciones de urea indicadas. (Abajo).Perfiles de despleamiento a 25 °C después de transferir una alícuota de proteína en condiciones nativas (tampón acuoso HEPES 5mM pH 7) a las disoluciones de urea indicadas. En ambos casos la concentración de proteína fue de 0.05 mg/mL, la longitud de onda de excitación 276 nm y la de emisión 350 nm. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas los ajustes a las ecuaciones (2.43) y (2.45).

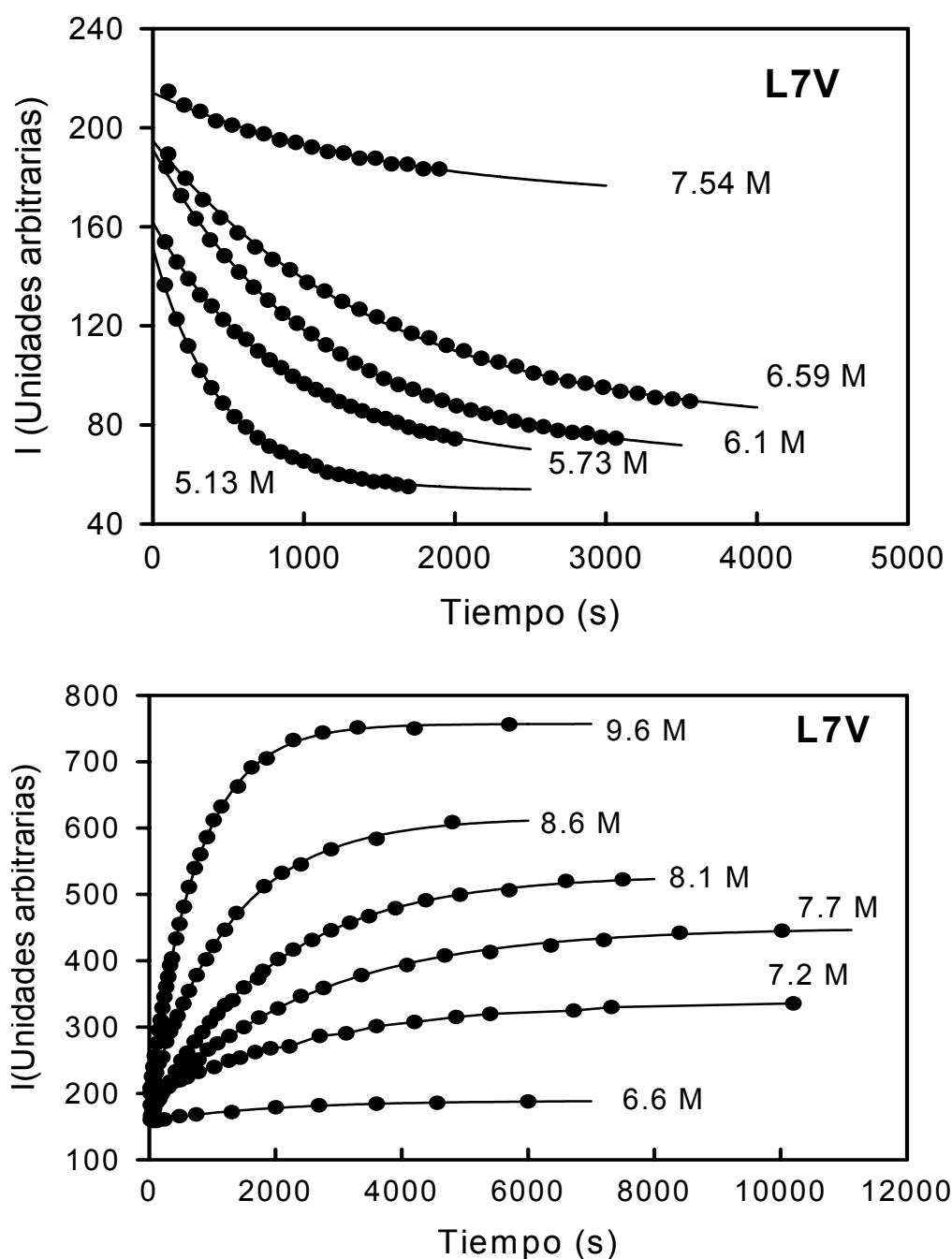


Figura 5.2 (Arriba). Perfiles cinéticos a 25 °C de replegamiento para L7V después de transferir una alícuota incubada en 9 M urea a las disoluciones de urea indicadas. (Abajo). Perfiles de desplegamiento a 25 °C después de transferir una alícuota de proteína en condiciones nativas (tampón acuoso HEPES 5mM pH 7) a las disoluciones de urea indicadas. En ambos casos la concentración de proteína fue de 0.05 mg/mL, la longitud de onda de excitación fue 276 nm y la de emisión 350 nm. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas los ajustes a las ecuaciones (2.43) y (2.45).

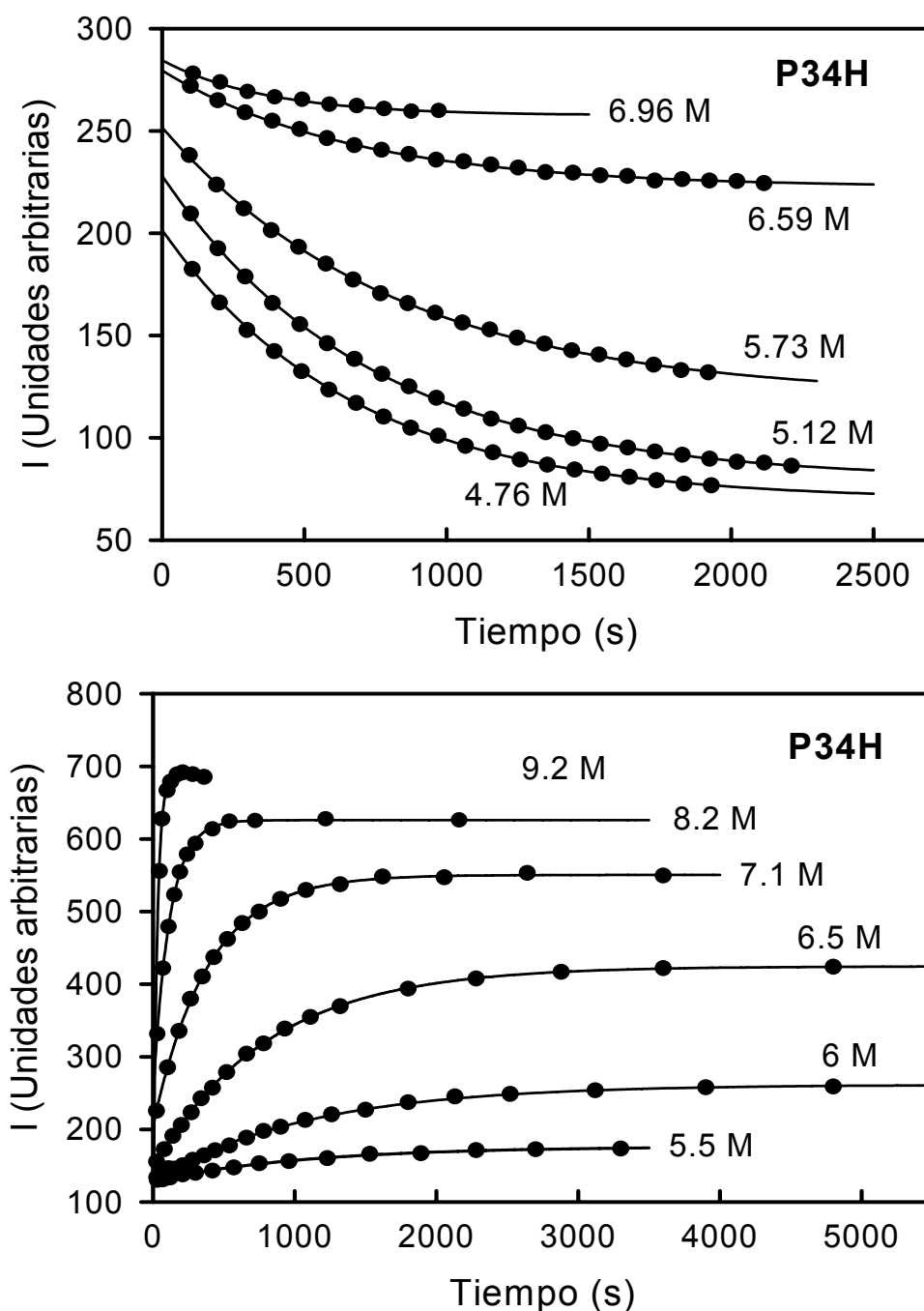


Figura 5.3 (Arriba). Perfiles cinéticos a 25 °C de replegamiento para P34H después de transferir una alícuota incubada en 9 M urea a las disoluciones de urea indicadas. (Abajo). Perfiles de desplegamiento a 25 °C después de transferir una alícuota de proteína en condiciones nativas (tampón acuoso HEPES 5mM pH 7) a las disoluciones de urea indicadas. En ambos casos la concentración de proteína fue de 0.05 mg/mL, la longitud de onda de excitación fue 276 nm y la de emisión 350 nm. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas los ajustes a las ecuaciones (2.43) y (2.45).

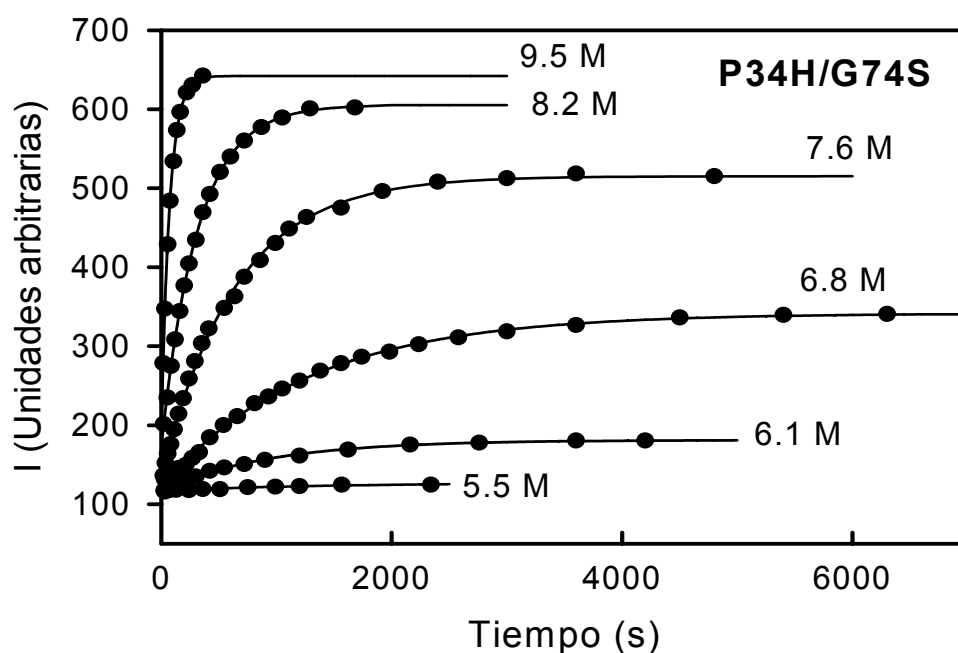
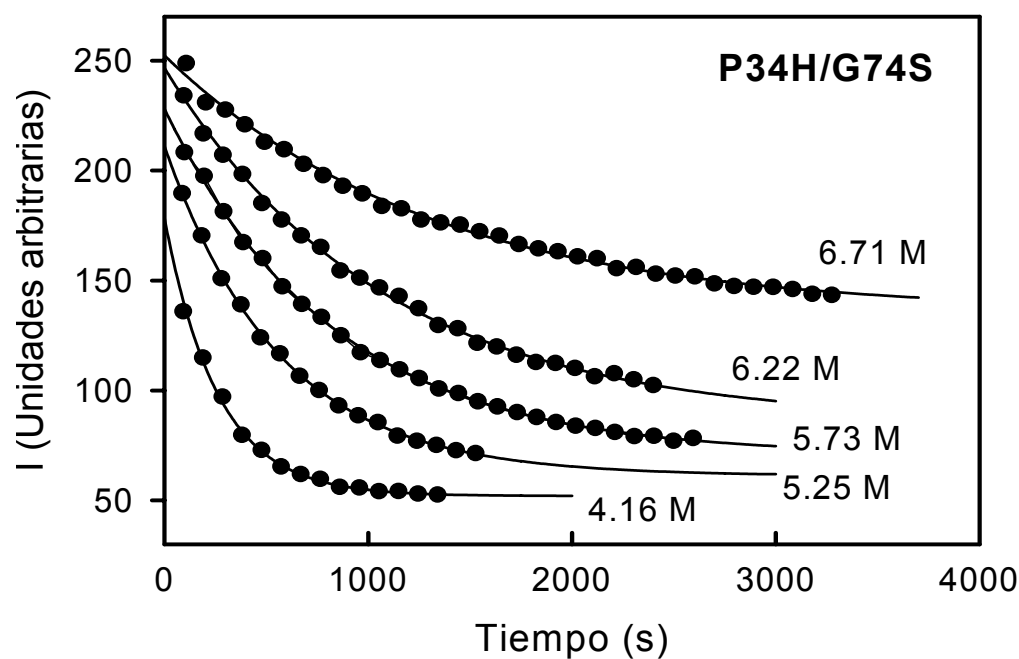


Figura 5.4 (Arriba). Perfiles cinéticos a 25 °C de replegamiento para P34H/G74S después de transferir una alícuota incubada en 9 M urea a las disoluciones de urea indicadas. (Abajo). Perfiles de desplegamiento a 25 °C después de transferir una alícuota de proteína en condiciones nativas (tampón acuoso HEPES 5mM pH 7) a las disoluciones de urea indicadas. En ambos casos la concentración de proteína fue de 0.05 mg/mL, la longitud de onda de excitación fue 276 nm y la de emisión 350 nm. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas los ajustes a las ecuaciones (2.43) y (2.45).

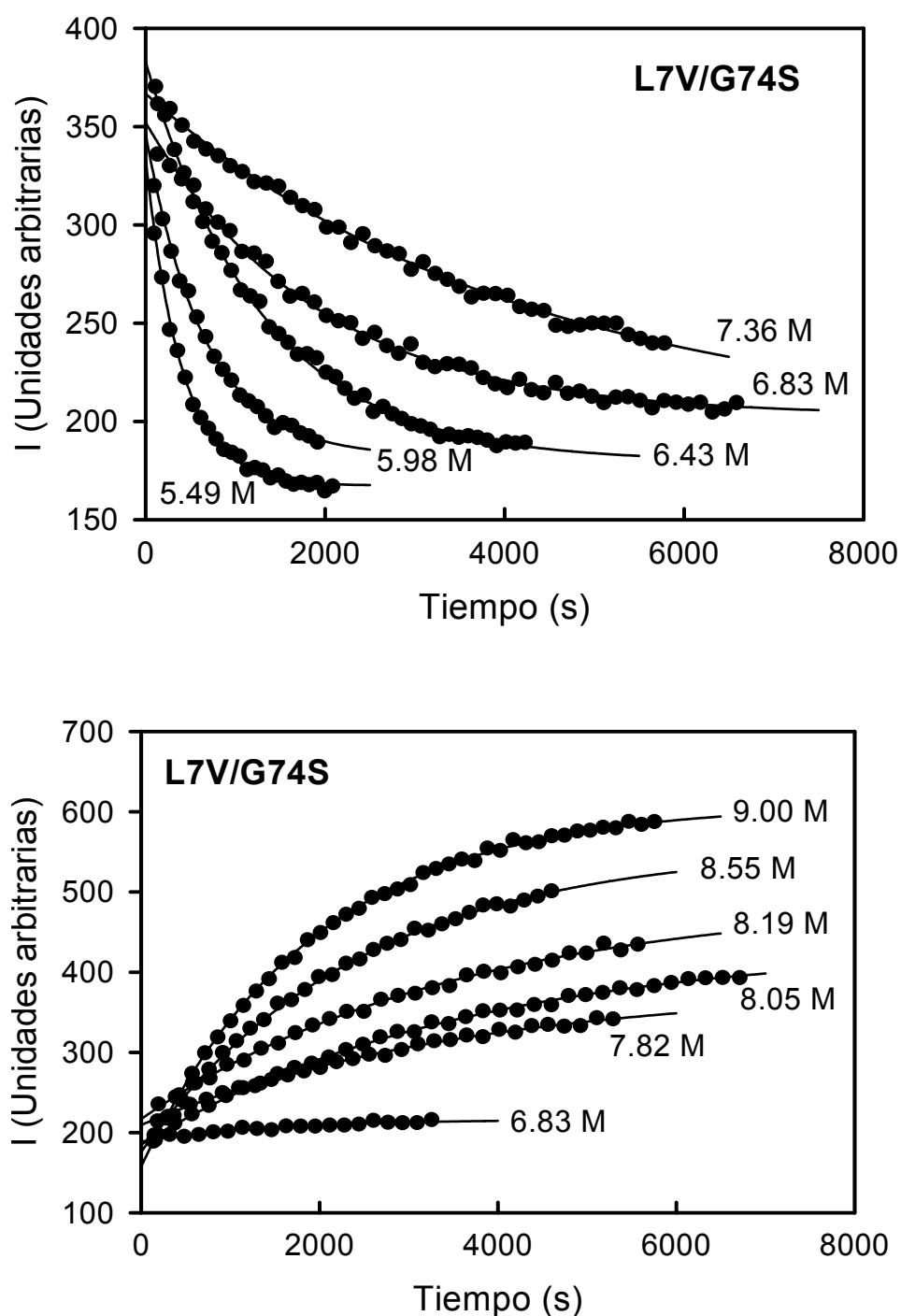


Figura 5.5 (Arriba). Perfiles cinéticos a 25 °C de replegamiento para L7V/G74S después de transferir una alícuota incubada en 9 M urea a las disoluciones de urea indicadas. (Abajo). Perfiles de desplegamiento a 25 °C después de transferir una alícuota de proteína en condiciones nativas (tampón acuoso HEPES 5mM pH 7) a las disoluciones de urea indicadas. En ambos casos la concentración de proteína fue de 0.05 mg/mL, la longitud de onda de excitación fue 276 nm y la de emisión 350 nm. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas los ajustes a las ecuaciones (2.43) y (2.45).

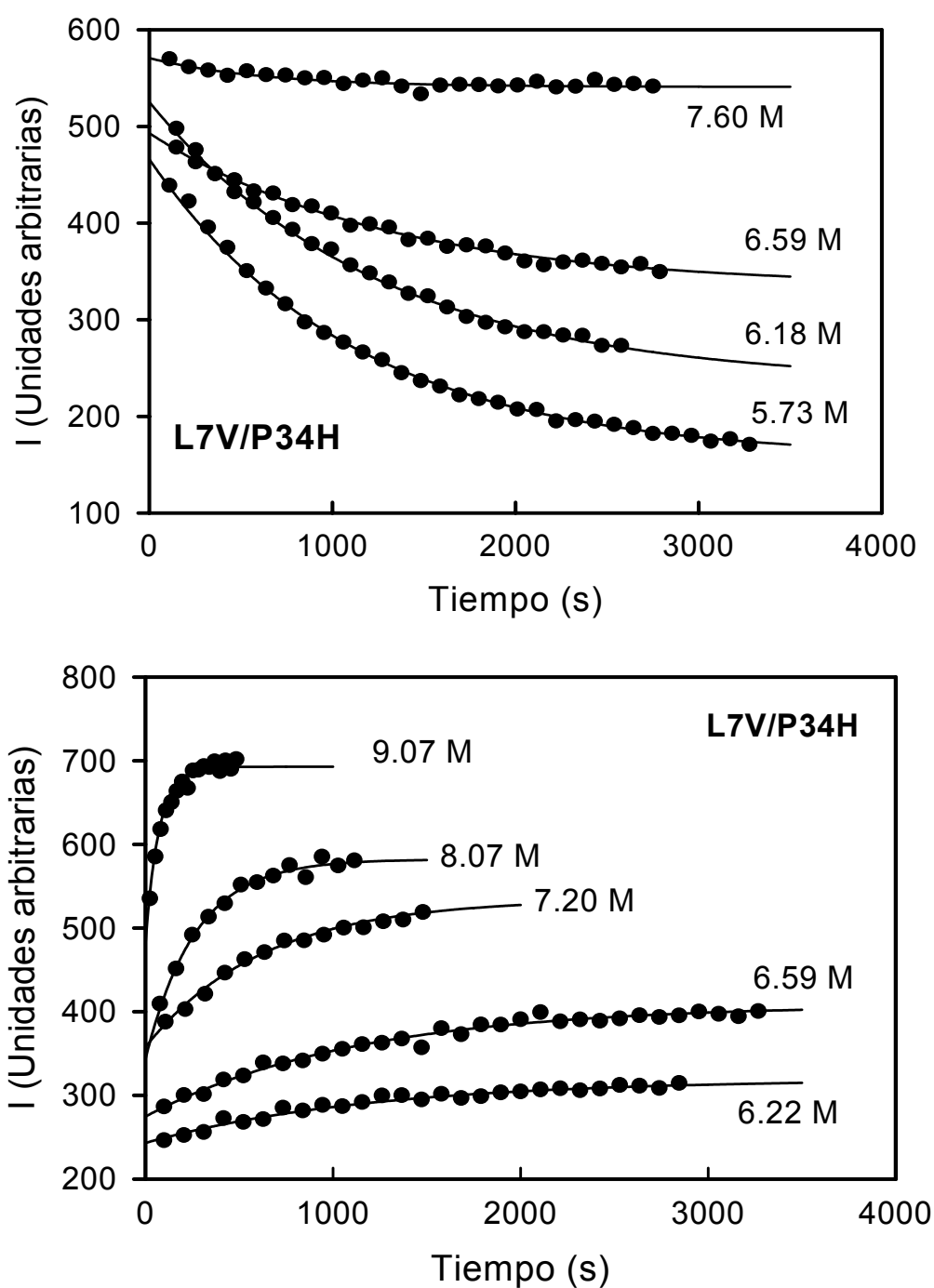


Figura 5.6 (Arriba). Perfiles cinéticos a 25 °C de replegamiento para L7V/P34H después de transferir una alícuota incubada en 9 M urea a las disoluciones de urea indicadas. (Abajo). Perfiles de desplegamiento a 25 °C después de transferir una alícuota de proteína en condiciones nativas (tampón acuoso HEPES 5mM pH 7) a las disoluciones de urea indicadas. En ambos casos la concentración de proteína fue de 0.05 mg/mL, la longitud de onda de excitación fue 276 nm y la emisión 350 nm. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas los ajustes a las ecuaciones (2.43) y (2.45).

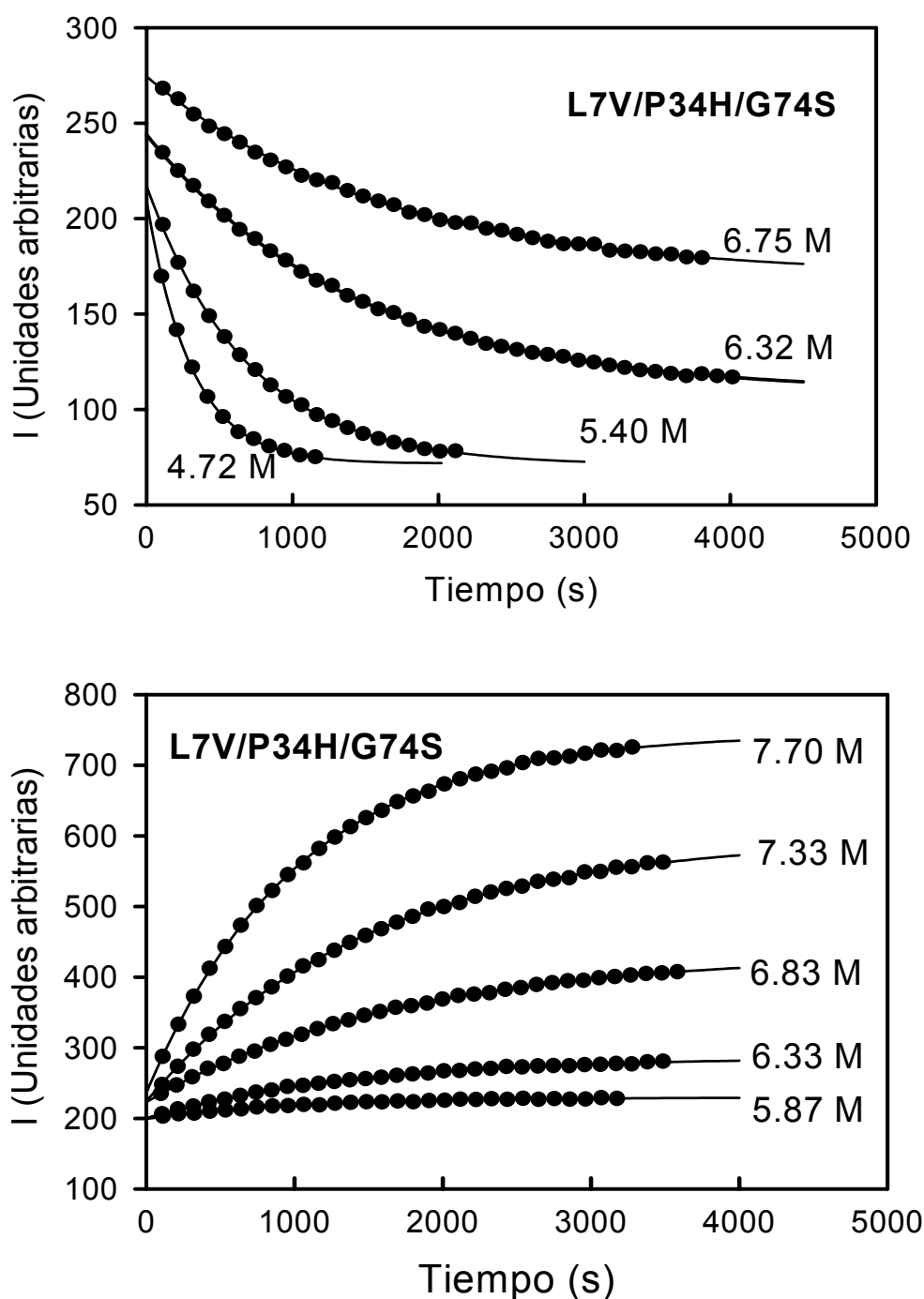


Figura 5.7 (Arriba). Perfiles cinéticos a 25 °C de replegamiento para L7V/P34H/G74S después de transferir una alícuota incubada en 9 M urea a las disoluciones de urea indicadas. (Abajo). Perfiles de desplegamiento a 25 °C después de transferir una alícuota de proteína en condiciones nativas (tampón acuoso HEPES 5mM pH 7) a las disoluciones de urea indicadas. En ambos casos la concentración de proteína fue de 0.05 mg/mL, la longitud de onda de excitación fue 276 nm y la emisión 350 nm. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas los ajustes a las ecuaciones (2.43) y (2.45).

5.1.2 Análisis según el modelo cinético de dos estados.

La representación del logaritmo neperiano de las constantes de velocidad aparentes obtenidas a partir de los perfiles cinéticos en función de la concentración de desnaturizante, posee forma de “V” y recibe el nombre de *Chevron* (figura 5.8), cuyo mínimo coincide de manera aproximada con $C_{1/2}$, donde $k_D = k_F$. La rama correspondiente a alta concentración de desnaturizante corresponde al proceso de desplegamiento de la proteína inducido por saltos a concentraciones de urea superiores a $C_{1/2}$, y se cumple que $k_D \gg k_F$, mientras que la rama para bajas concentraciones de desnaturizante corresponde al proceso de replegamiento que tiene lugar al transferir la proteína desplegada a concentraciones menores que $C_{1/2}$. En esta rama, al contrario que anteriormente, se cumple $k_D \ll k_F$.

Numerosas son las referencias que obtenemos de estudios de este tipo en la bibliografía, tales como Beasty et al., 1986; Kelley et al., 1986 a y b; Matthews y Hurle, 1987; Perry et al., 1989; Chen et al., 1989 a y b; Chen et al., 1992; Ibarra-Molero y Sanchez-Ruiz, 1997.

La gráfica en chevron se interpreta de acuerdo al modelo cinético de dos estados, para el cual el proceso de plegamiento y desplegamiento se produce solo entre estado nativo y desplegado sin que ningún intermedio cinético llegue a poblarse significativamente. Esto es así ya que, en nuestras condiciones de trabajo el desplegamiento y replegamiento de tiorredoxina se describen bien mediante una única exponencial. Para el caso de tiorredoxina se observa una ligera curvatura en la rama de

replegamiento a concentraciones de urea por debajo de 4 M lo cual podría deberse a la presencia de intermedios cinéticos. En nuestro caso el límite inferior es 4.5 M (el dato representado a 4.2 M en el chevron, es ilustrativo y no se considera en el análisis).

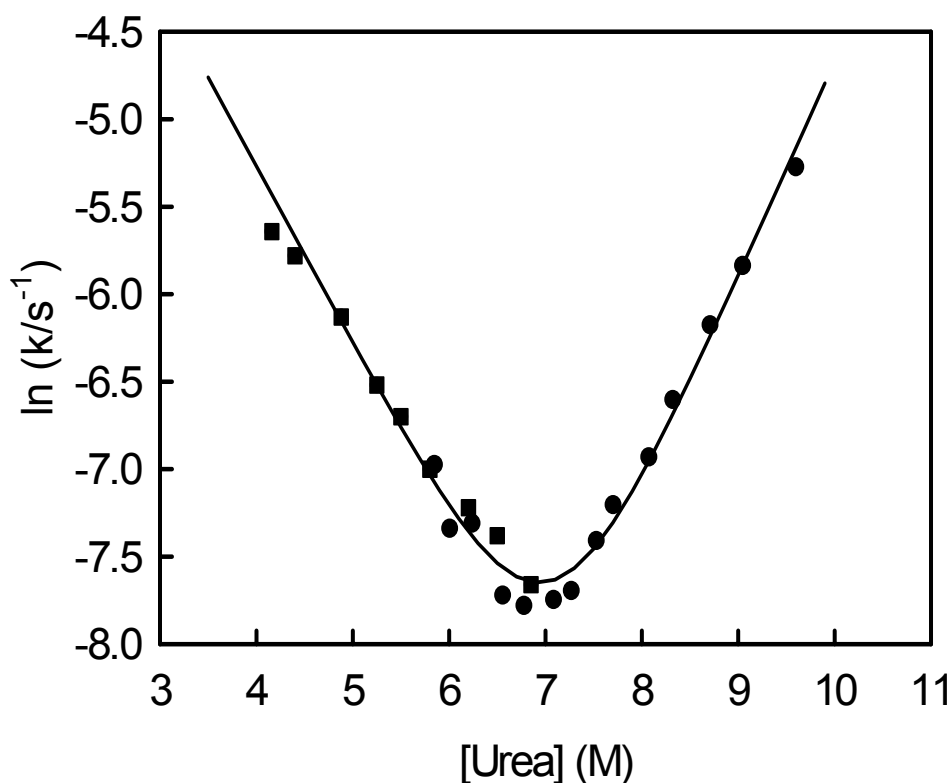
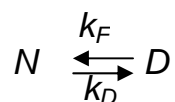


Figura 5.8. Dependencia de las constantes de velocidad de plegamiento y replegamiento con la concentración de urea para tiorredoxina WT, representación denominada Chevron. Los círculos representan los experimentos en la dirección del desplegamiento, los cuadrados en la dirección del replegamiento. La línea continua representa el ajuste mediante las ecuaciones (5.2), (5.4) y (5.5).

Según el modelo de dos estados:



$$K = \frac{[D]}{[N]} = \frac{k_D}{k_F} \quad (5.1)$$

5. Estudios cinéticos de tiorredoxina y formas mutantes

k_F y k_D son las constantes de velocidad de los procesos de plegamiento y desplegamiento, respectivamente. La constante de velocidad aparente viene dada por la suma de las dos:

$$\ln k = \ln(k_F + k_D) \quad (5.2)$$

Los datos cinéticos se analizan de acuerdo con la teoría del estado de transición mediante la *ecuación de Eyring*:

$$\ln k = \text{cte} - \frac{\Delta G^\ddagger}{RT} \quad (5.3)$$

donde ΔG^\ddagger es el cambio de energía de Gibbs de activación.

Si observamos las dos ramas del chevron vemos que existe una linealidad de $\ln k$ con C , lo cual implica una dependencia lineal del cambio de energía de Gibbs de activación con la concentración. Las expresiones que relacionan k_F y k_D con la concentración de urea se deducen de la teoría del estado de transición (Chen et al., 1992):

$$\ln k_F = \ln k_{1/2} + \frac{m_{D-\ddagger}}{RT} \cdot (C - C_{1/2}) \quad (5.4)$$

$$\ln k_D = \ln k_{1/2} + \frac{m_{N-\ddagger}}{RT} \cdot (C - C_{1/2}) \quad (5.5)$$

5. Estudios cinéticos de tiorredoxina y formas mutantes

donde $k_{1/2}$ es el valor de k_F y k_D cuando $C=C_{1/2}$. $m_{D-\ddagger}$ y $m_{N-\ddagger}$ describen el efecto de la concentración de urea en las energías de Gibbs de activación para el plegamiento y desplegamiento, respectivamente, de forma que:

$$m_{D-\ddagger} = -\left(\frac{\partial G_{D-\ddagger}}{\partial C}\right) \quad (5.6)$$

$$m_{N-\ddagger} = -\left(\frac{\partial \Delta G_{N-\ddagger}}{\partial C}\right) \quad (5.7)$$

Se ha supuesto una dependencia lineal del cambio en las energías de Gibbs de activación con la concentración de urea, esto es, $m_{D-\ddagger}$ y $m_{N-\ddagger}$ se han tomado como constantes.

El ajuste de los datos del chevron, empleando las ecuaciones (5.2), (5.4), (5.5) ha sido realizado usando los programas MLAB y Matlab.

El valor de $m_{1/2}$ correspondiente al equilibrio se puede calcular a partir de los valores cinéticos $m_{D-\ddagger}$ y $m_{N-\ddagger}$ dado que:

$$\Delta G_N^{\ddagger} = \Delta G + \Delta G_D^{\ddagger} \quad (5.8)$$

entonces:

$$m_{1/2} = m_{N-\ddagger} - m_{D-\ddagger} \quad (5.9)$$

Esta ecuación constituye un test de dos estados en cinética.

El estudio de los valores de $m_{1/2}$, $m_{D-\ddagger}$ y $m_{N-\ddagger}$ es de gran interés, ya que éstos están relacionados con los cambios de área expuesta de los estados implicados producidos por las mutaciones. Para el caso de $m_{1/2}$, ésta se relaciona con el cambio de área expuesta en el paso de estado nativo a desplegado, $m_{D-\ddagger}$ se relacionan con el cambio de área expuesta producido en el paso desde el estado desplegado al estado de transición, es decir en el proceso de plegamiento, y $m_{N-\ddagger}$ se relaciona con el cambio de área expuesta en el proceso de desplegamiento desde el estado nativo al estado de transición. Por esto, este análisis nos será útil en el estudio estructural del estado de transición y del estado desnaturalizado.

Al igual que hemos hecho para la forma WT, podemos obtener representaciones chevrons para todas las formas mutantes. Estas representaciones se muestran en las figuras 5.9 a 5.15 junto con el chevron correspondiente a la forma WT pudiéndose observar así los cambios.

Los resultados para los valores de $m_{1/2}$, $m_{D-\ddagger}$ y $m_{N-\ddagger}$ se muestran en la tabla 1.

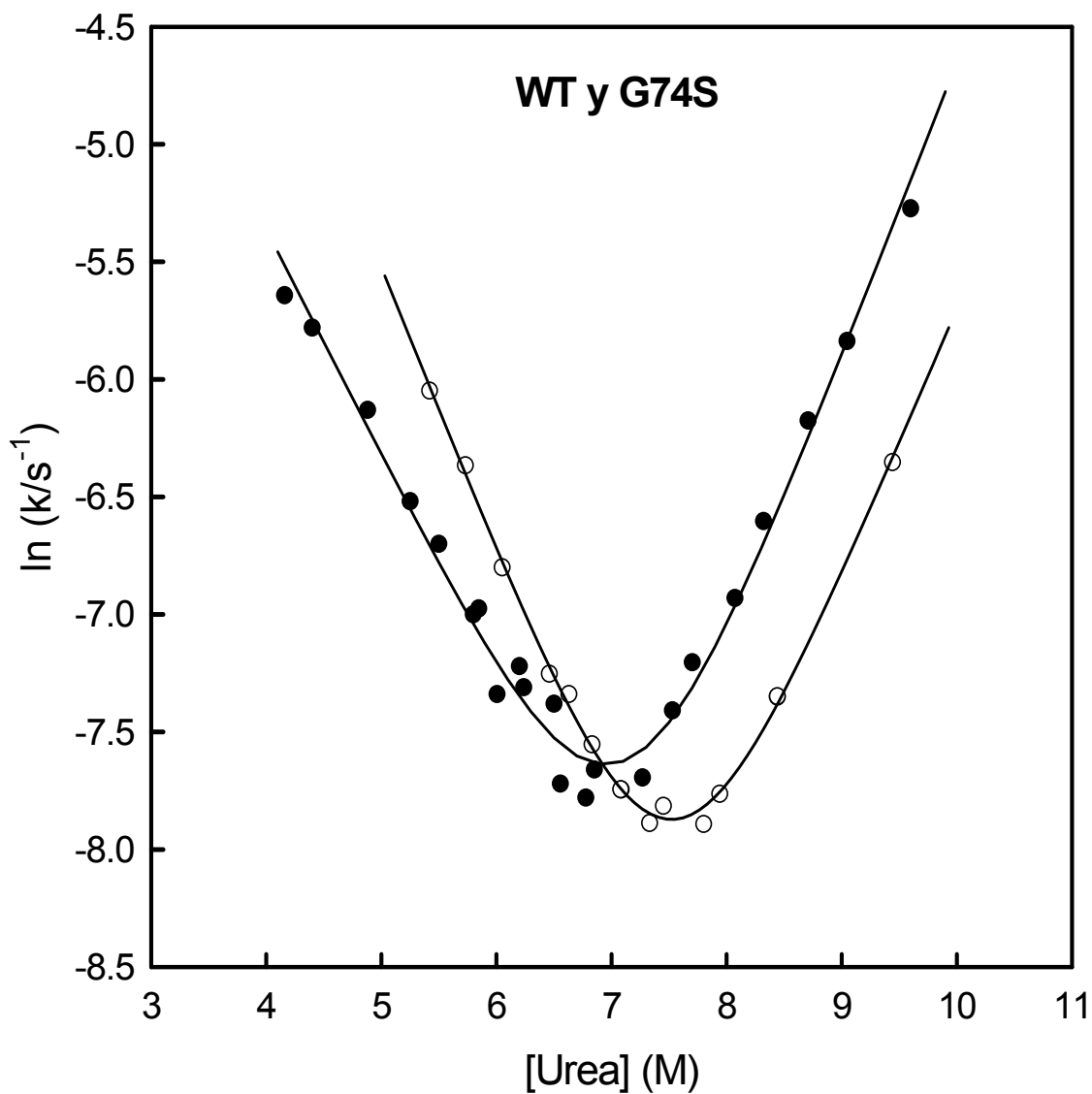


Figura 5.9. Dependencia de las constantes de velocidad de plegamiento y desplegamiento con la concentración de urea. Los símbolos rellenos corresponden a la forma WT y los huecos al mutante G74S. Las líneas corresponden a los ajustes según el modelo cinético de dos estado, (ecuaciones (5.2), (5.4), (5.5)).

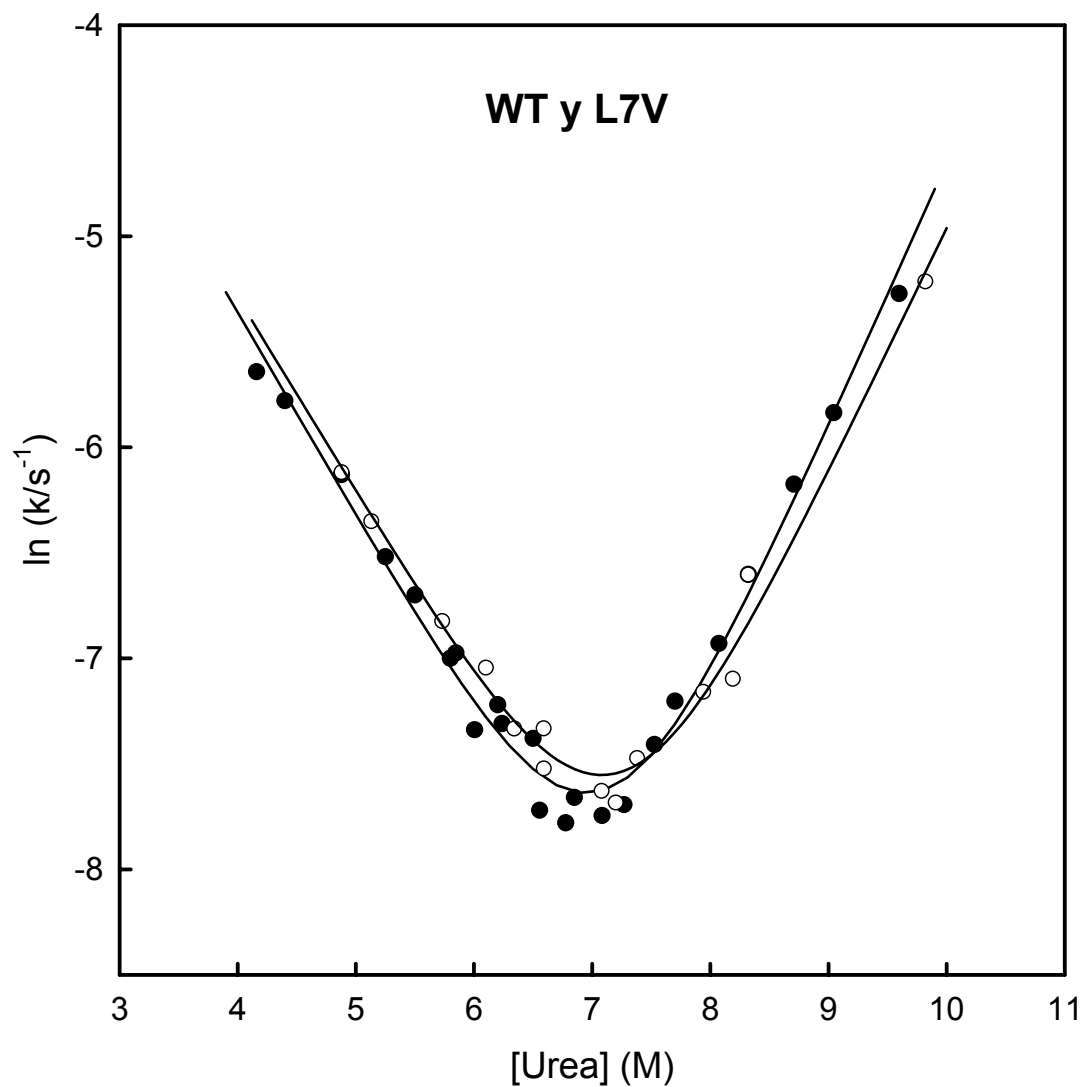


Figura. 5.10. Dependencia de las constantes de velocidad de plegamiento y desplegamiento con la concentración de urea. Los símbolos rellenos corresponden a la forma WT y los huecos al mutante L7V. Las líneas corresponden a los ajustes según el modelo cinético de dos estados (ecuaciones (5.2), (5.4), (5.5)).

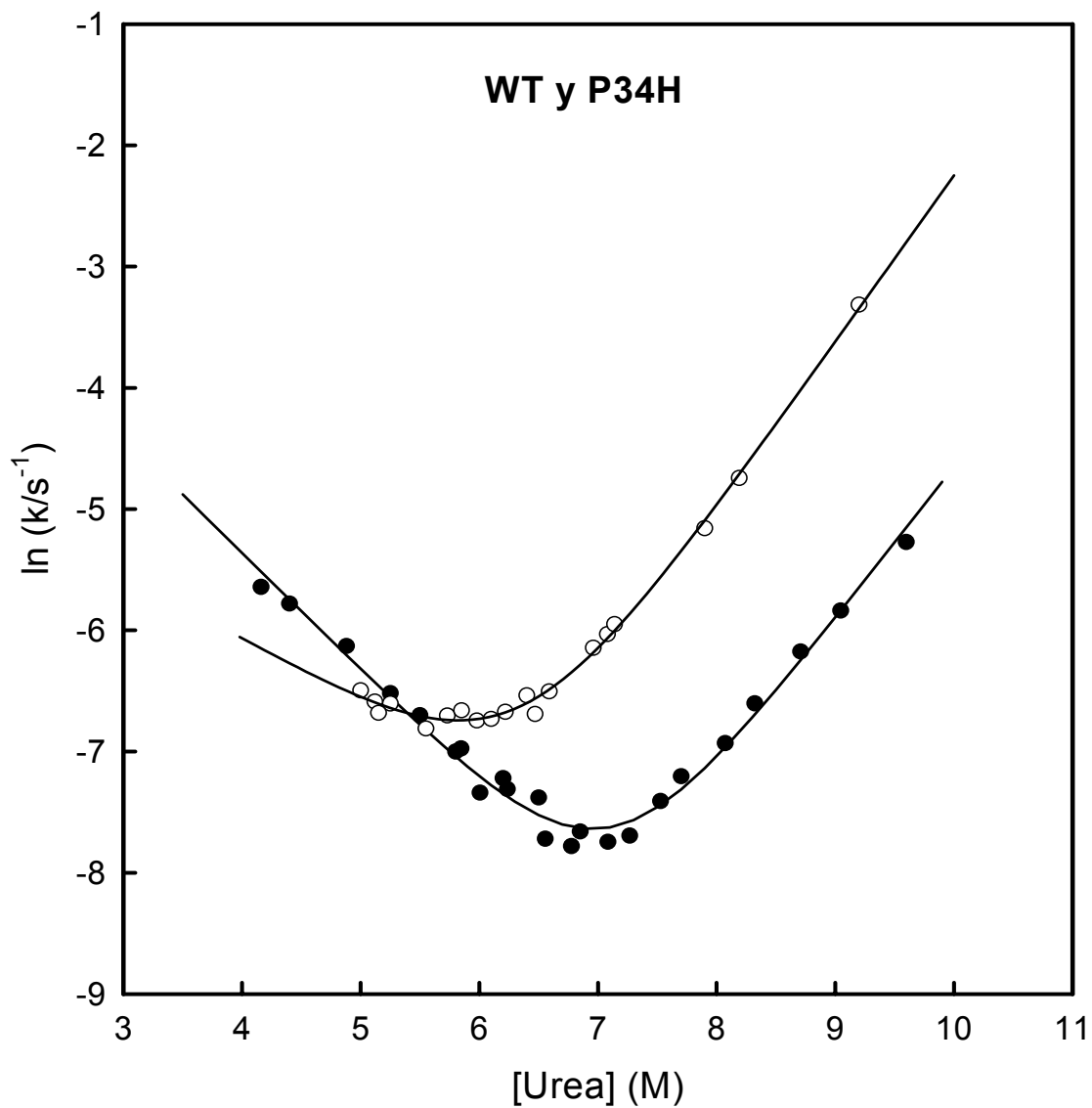


Figura. 5.11. Dependencia de las constantes de velocidad de plegamiento y desplegamiento con la concentración de urea. Los símbolos rellenos corresponden a la forma WT y los huecos al mutante P34H. Las líneas corresponden a los ajustes según el modelo cinético de dos estados (ecuaciones (5.2), (5.4), (5.5)).

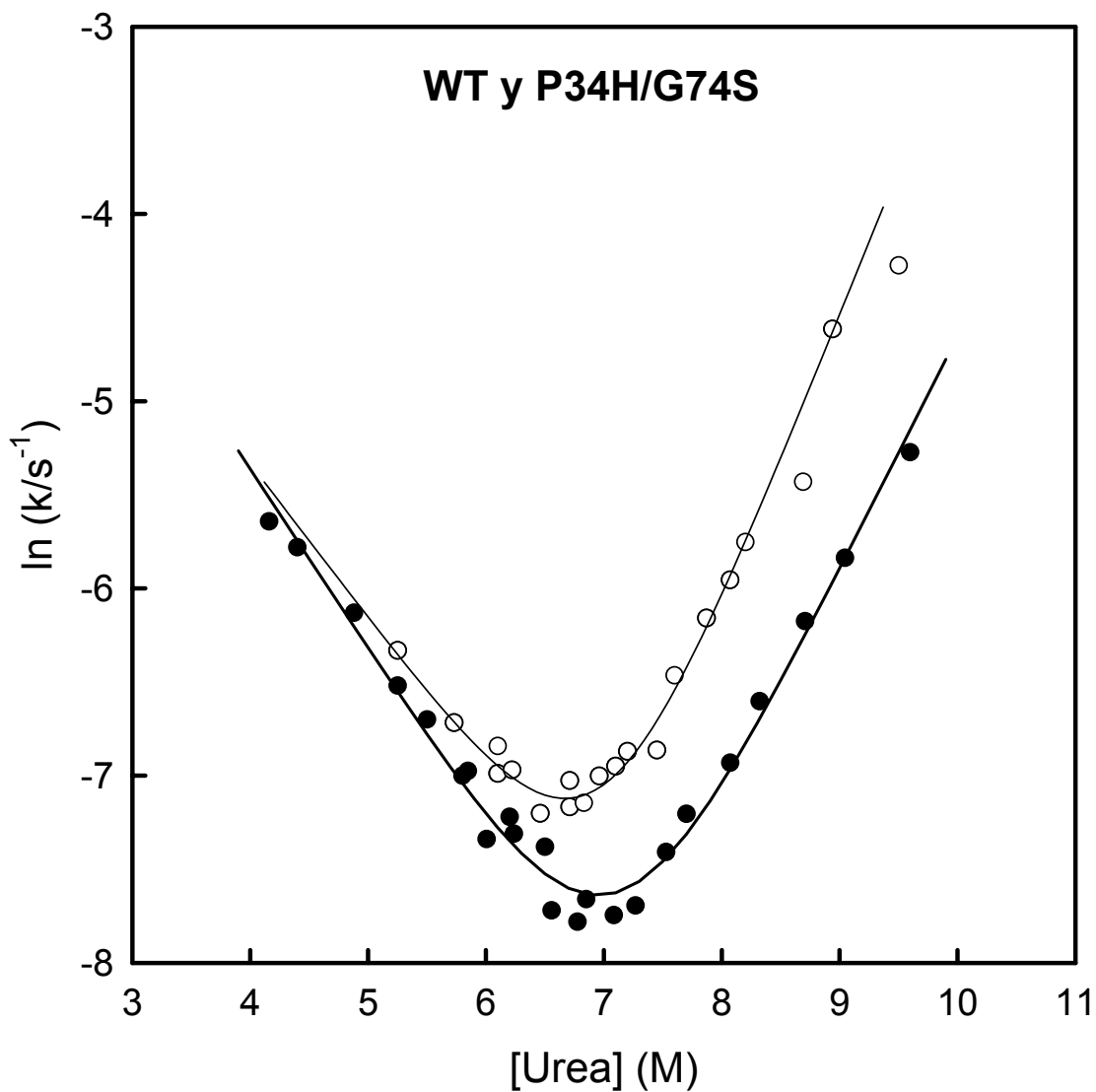


Figura. 5.12. Dependencia de las constantes de velocidad de plegamiento y desplegamiento con la concentración de urea. Los símbolos rellenos corresponden a la forma WT y los huecos al mutante P34H/G74S. Las líneas corresponden a los ajustes según el modelo cinético de dos estados (ecuaciones (5.2), (5.4), (5.5)).

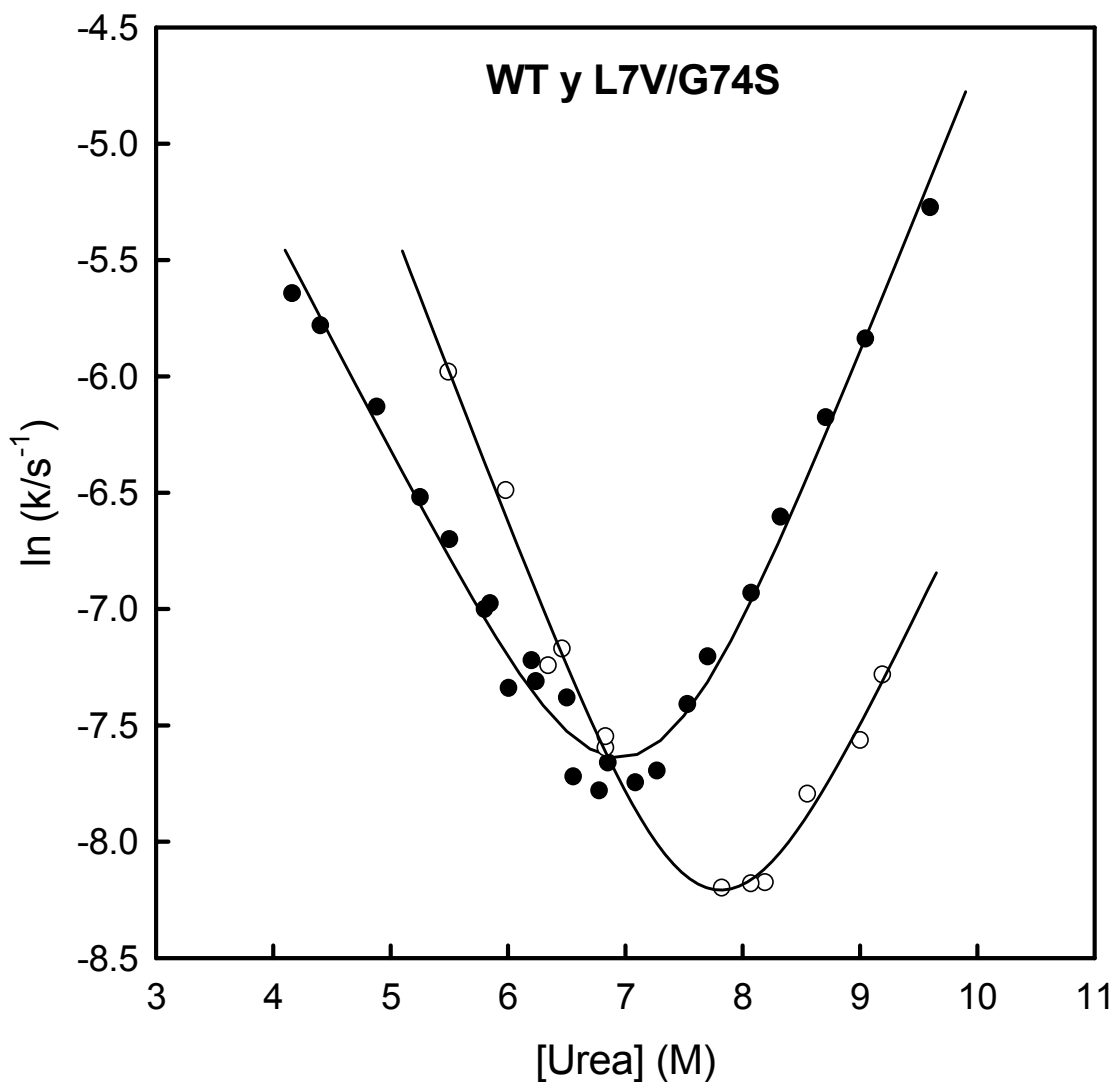


Figura. 5.13. Dependencia de las constantes de velocidad de plegamiento y desplegamiento con la concentración de urea. Los símbolos rellenos corresponden a la forma WT y los huecos al mutante L7V/G74S. Las líneas corresponden a los ajustes según el modelo cinético de dos estados (ecuaciones (5.2), (5.4), (5.5)).

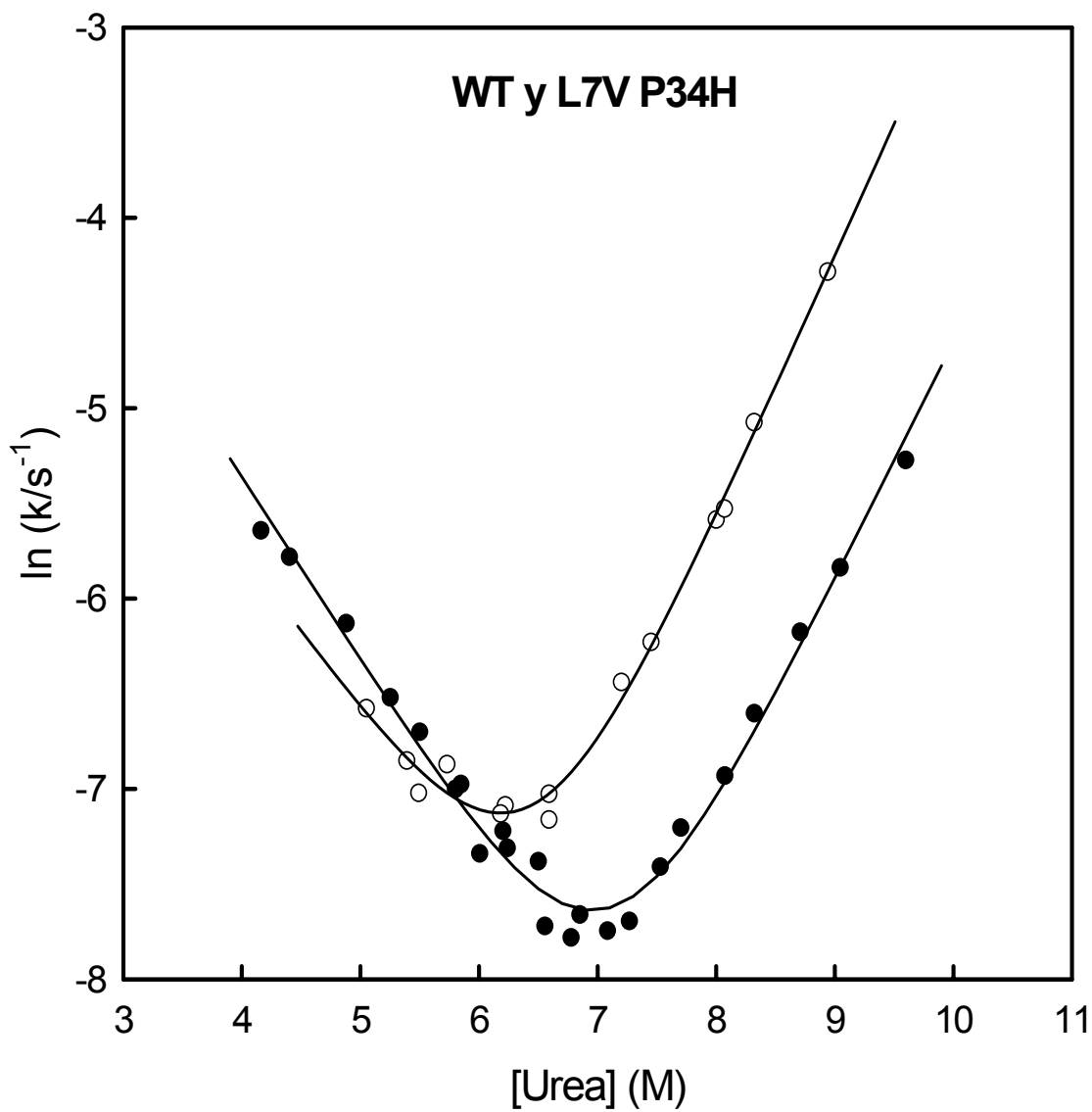


Figura. 5.14. Dependencia de las constantes de velocidad de plegamiento y desplegamiento con la concentración de urea. Los símbolos rellenos corresponden a la forma WT y los huecos al mutante L7V/P34H. Las líneas corresponden a los ajustes según el modelo cinético de dos estados (ecuaciones (5.2), (5.4), (5.5)).

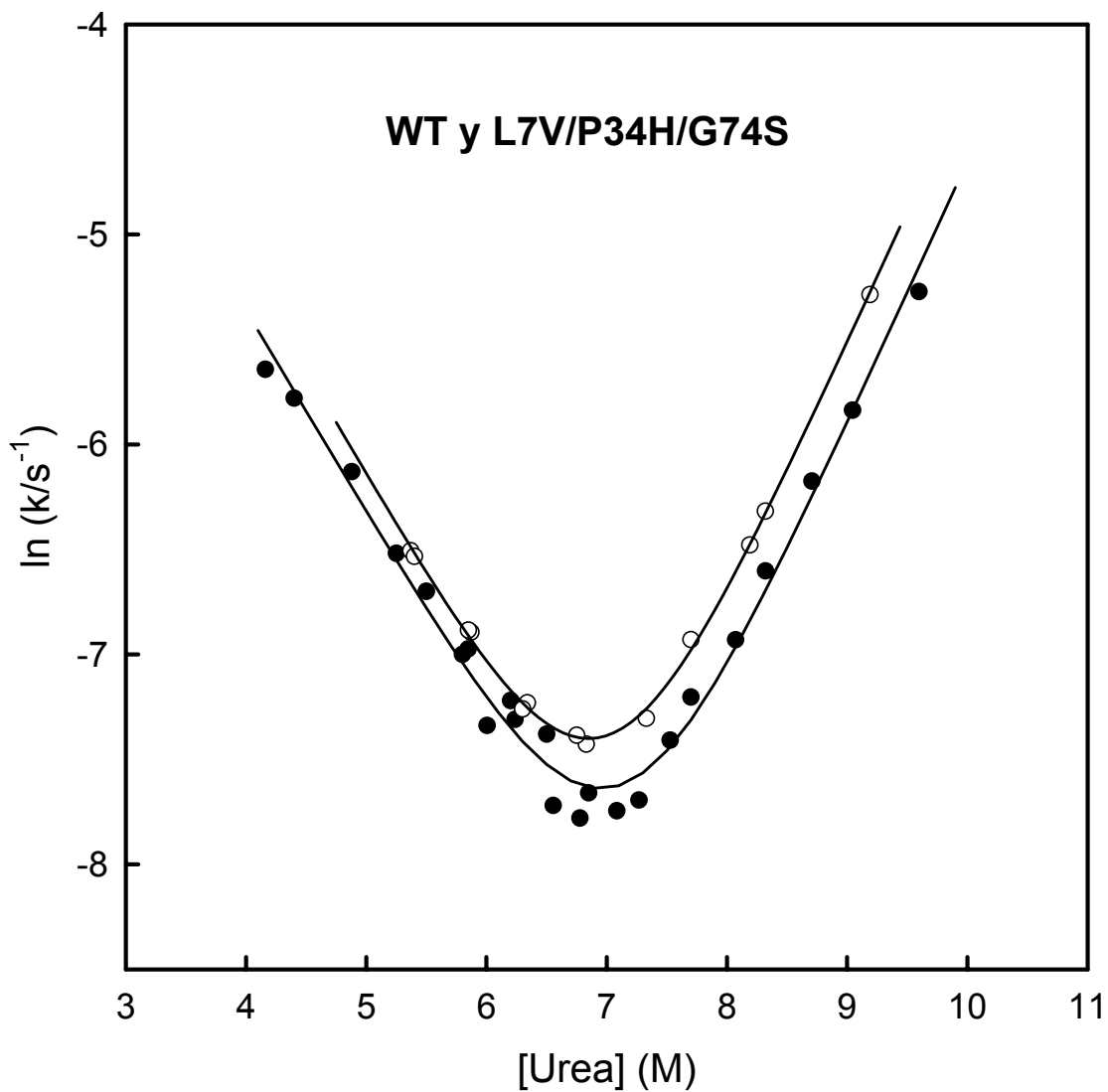


Figura 5.15. Dependencia de las constantes de velocidad de plegamiento y desplegamiento con la concentración de urea. Los símbolos rellenos corresponden a la forma WT y los huecos al mutante L7V/P34H/G74S. Las líneas corresponden a los ajustes según el modelo cinético de dos estados (ecuaciones (5.2), (5.4), (5.5)).

Variante	$C_{1/2}$ (M)	$m_{D-\ddagger}$ (kJ·mol ⁻¹ ·M ⁻¹)	$m_{N-\ddagger}$ (kJ·mol ⁻¹ ·M ⁻¹)	$m_{1/2}$ (kJ·mol ⁻¹ ·M ⁻¹)
WT	7.10±0.09	-2.33 ±0.13	3.09 ±0.19	5.42 ±0.08
L7V	7.19±0.17	-2.29 ±0.26	2.90 ±0.25	5.19 ±0.11
P34H	6.30±0.12	-1.37 ±0.27	3.41 ±0.13	4.78 ±0.09
G74S	7.49±0.06	-3.02 ±0.11	2.84 ±0.13	5.86 ±0.09
P34H/G74S	6.79±0.13	-2.20 ±0.30	3.31 ±0.20	5.51 ±0.22
L7V/G74S	7.72±0.16	-3.24 ±0.29	2.63 ±0.40	5.87 ±0.16
L7V/P34H	6.40±0.16	-2.09 ±0.44	3.43 ±0.22	5.52 ±0.15
L7V/P34H/G74S	7.00±0.06	-2.46 ±0.12	3.11 ±0.10	5.57 ±0.09

Tabla. 5.1. Valores de $C_{1/2}$, $m_{D-\ddagger}$, $m_{N-\ddagger}$ y $m_{1/2}$ obtenidos a partir del ajuste de los chevrons según el modelo cinético de dos estados. Los errores proceden del ajuste.

A la vista de los valores de $m_{1/2}$ podemos ver que, de todos los mutantes, la forma P34H es la que presenta un valor significativamente menor que el resto. En concreto esta disminución se atribuye al bajo valor de $m_{D-\ddagger}$ que se relaciona con la pendiente de la rama de replegamiento (rama izquierda del chevron).

5.2 Desplegamiento de P34H, WT y G74S inducido por urea seguido mediante ensayos de *doble salto*.

5.2.1 Conceptos y procedimiento experimental.

Se podría pensar que el menor valor de $m_{1/2}$ de P34H podría deberse a la presencia de intermedios cinéticos, por lo que el ajuste según el modelo de dos estados no sería apropiado. Para salir de esta duda podemos realizar ensayos de desplegamiento de doble salto y comparar los resultados obtenidos con los del análisis del chevron. En

estos ensayos partimos de proteína incubada a diferentes concentraciones de urea, y la llevamos hasta condiciones fuertemente desnaturizantes, que en nuestro caso estuvieron en el rango de 9.44 - 9.57 M, según el experimento. Por esto, este ensayo es específico de estado nativo, ya que cualquier estado parcialmente desplegado desnatura más rápido (Schmid, 1992) y el proceso observado es realmente el desplegamiento desde estado nativo hasta estado desnaturizado.

Para realizar estos experimentos transferimos una alícuota de la muestra a la célula de medida del fluorímetro termostaticada a 25 °C, y seguimos la cinética de desplegamiento mediante el cambio en la señal de intensidad de fluorescencia con el tiempo. La concentración de proteína final en la cubeta fue de aproximadamente 0.02 mg/mL. Es importante que las condiciones finales sean exactamente iguales en todos los experimentos, es decir, igual concentración de proteína y urea, pero sobre todo en este último aspecto ya que al tener diferentes concentraciones de urea en las muestras iniciales, estamos alterando de forma diferente la concentración final de desnaturizante en la célula de medida al añadir la alícuota de proteína en cada caso. Para que las condiciones finales en la cubeta sean similares, evitando así una variación de las constantes de velocidad de las cinéticas como consecuencia, debemos añadir un volumen igual en todos los casos que contenga la cantidad de urea necesaria para compensar la añadida en la muestra más concentrada.

Es necesario realizar un experimento control partiendo de proteína en tampón acuoso hasta exactamente las mismas condiciones, obtendremos una cinética con una amplitud ΔI^0 que corresponde al 100% de estado nativo ($x_N=1$). La comparación de este control con el resto de las muestras nos da una doble información:

1). Si el valor de τ de todas las cinéticas permanece constante dentro de la incertidumbre experimental, entonces las moléculas en estado nativo que existen en el rango de concentración de urea en el cual se produce la transición, son indistinguibles de aquellas que existen en condiciones nativas.

2). La amplitud de la cinética de desplegamiento con respecto al control es una medida directa de la fracción de moléculas en estado nativo:

$$x_N = \frac{\Delta I}{\Delta I^0} \quad (5.10)$$

Por tanto, podemos disponer tanto de los perfiles de ΔI frente a C como de los perfiles de x_N frente a C . Estos últimos perfiles pueden compararse con los obtenidos por el cambio de cualquier propiedad espectroscópica con el disolvente. Si las curvas coinciden, entonces la presencia de intermedios de características diferentes al estado desnaturalizado es poco probable. Por el contrario, si la concentración de moléculas en estado nativo disminuye a más velocidad que la propiedad física medida, entonces podríamos tener un intermedio significativamente poblado diferente del estado desnaturalizado en esa propiedad y que desnaturaliza más rápido en el ensayo de desplegamiento.

Es importante destacar que mediante estos ensayos no es necesario presuponer ningún tipo de mecanismo de desplegamiento ya que lo que medimos es directamente la fracción de moléculas en estado nativo. Además, no se necesita hacer extrapolación de las líneas base ya que éstas son 1 y 0 antes de la transición y después de la transición, respectivamente.

5.2.2 Análisis de los perfiles de ΔI frente a C según el modelo de dos estados.

Para obtener los perfiles de ΔI frente a C primero es necesario analizar los perfiles de intensidad de fluorescencia frente a tiempo obtenidos a partir de los ensayos de doble salto, los cuales se pueden analizar mediante la ecuación (2.43). De estos experimentos podemos obtener el tiempo de relajación τ , la intensidad a tiempo infinito I_∞ y la amplitud de la cinética de desplegamiento ΔI . Como hemos visto antes, la fracción molar de moléculas en estado nativo es $x_N = \Delta I / \Delta I^0$ y también sabemos que la fracción molar se relaciona con la constante de equilibrio según:

$$x_N = \frac{1}{1 + K} \quad (5.11)$$

y K viene dada por:

$$K = e^{\left(\frac{-\Delta G}{RT}\right)} \quad (5.12)$$

donde

$$\Delta G = -m_{1/2} \cdot (C - C_{1/2}) \quad (5.13)$$

Sustituyendo las ecuaciones (5.12) y (5.13) en la ecuación (5.11) y considerando la ecuación (5.10), podemos obtener la relación de ΔI con C , que es:

$$\Delta I = \frac{\Delta I^0}{1 + e^{m_{1/2} \cdot (C - C_{1/2}) / RT}} \quad (5.14)$$

donde ΔI^0 , $m_{1/2}$ y $C_{1/2}$ son parámetros ajustables.

Por tanto, si disponemos de los perfiles de ΔI frente a concentración de urea podemos obtener los valores de $m_{1/2}$ y $C_{1/2}$. En esos ajustes las líneas base de los estados nativo y desplegado están perfectamente definidas, con lo que se evita la incertidumbre asociada a la determinación de éstas. En las figuras 5.16 a 5.18 se muestran los perfiles de intensidad de fluorescencia frente a tiempo y ΔI frente a concentración de urea para WT, G74S y P34H, respectivamente.

Aunque nuestro primer objetivo era comprobar la validez del modelo de dos estados para P34H, se creyó conveniente realizar los experimentos de doble salto para WT (a modo de control) y G74S (ya que posee una mayor estabilidad y un valor de $m_{1/2}$ algo mayor que el de WT).

EL valor de τ para WT, P34H y G74S permanece constante dentro del error experimental. No obstante, se realizó un ajuste global de todas las cinéticas para cada variante fijando el valor de τ para todos los perfiles. Para el cálculo del τ óptimo, se realizaron los ajustes, mediante la ecuación (2.43), fijando diferentes valores de τ . La representación de la suma de los cuadrados de los errores de todos los ajustes frente a los diferentes valores de τ , nos permite obtener el τ óptimo que se corresponde con el mínimo de dicha representación, tal y como podemos ver en las figuras 5.19 y 5.20. No obstante los ajustes son buenos también con diferentes valores de τ .

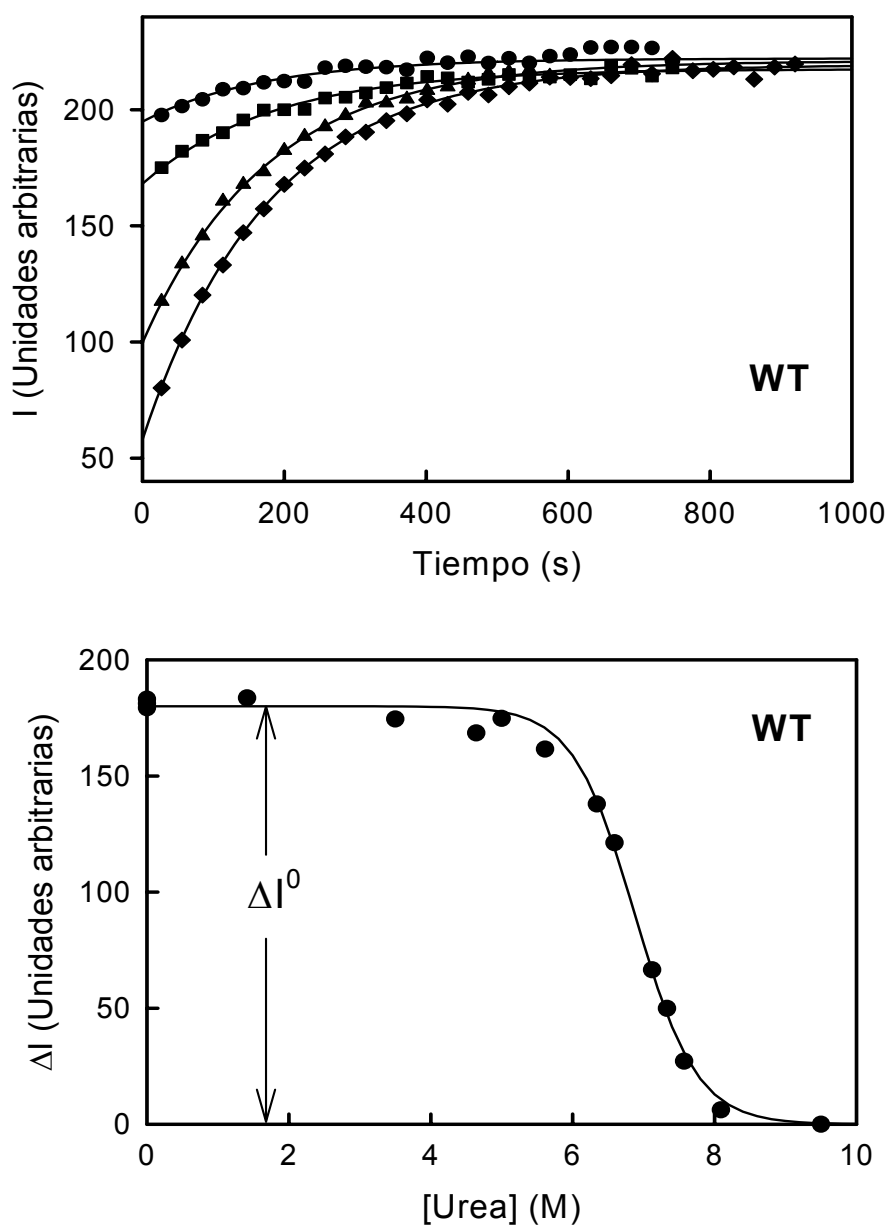


Figura 5.16. (Arriba) Perfiles de intensidad de fluorescencia frente al tiempo tomados después de transferir una alícuota de WT a condiciones fuertemente desnaturizantes (9.44 M Urea, pH 7, $T= 25$ °C, concentración final de proteína 0.02 mg/mL). Las concentraciones de urea en las disoluciones de partida fueron: 7.59 M (círculos); 7.33 M (cuadrados); 6.59 M (triángulos); 5.61 M (diamantes). Las líneas representan los ajustes mediante la ecuación (2.43). (Abajo) Amplitudes de desplegamiento frente a concentración de urea. La línea representa el ajuste según la ecuación (5.14).

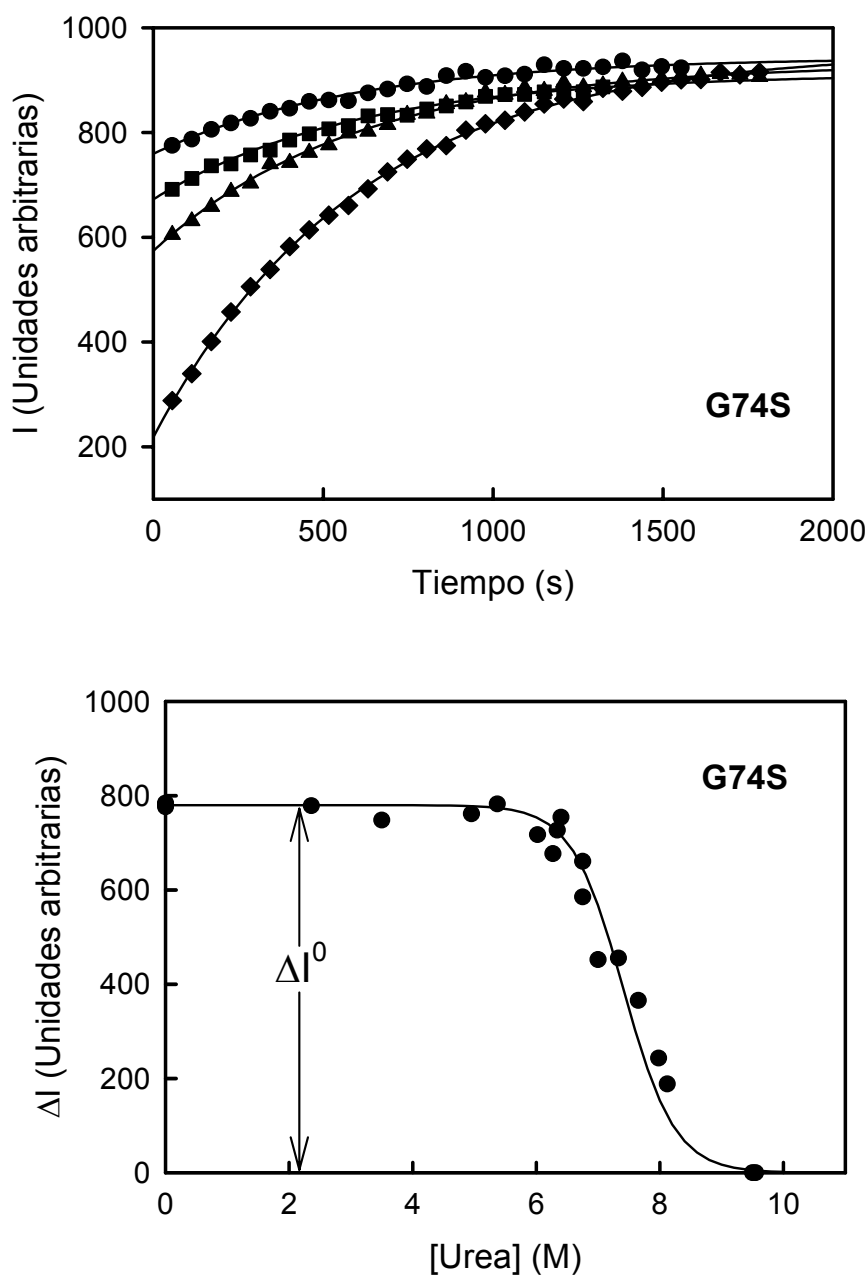


Figura 5.17 .(Arriba) Perfiles de intensidad de fluorescencia frente al tiempo tomados después de transferir una alícuota del mutante G74S a condiciones fuertemente desnaturizantes (9.44 M Urea, pH 7, $T= 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, concentración final de proteína 0.020 mg/mL). Las concentraciones de urea en las disoluciones de partida fueron: 8.12 M (círculos); 7.98 M (cuadrados); 7.65 M (triángulos); 6.40 M (diamantes). Las líneas representan los ajustes mediante la ecuación (2.43). (Abajo) Amplitudes de desplegamiento frente a concentración de urea. La línea representa el ajuste según la ecuación (5.14).

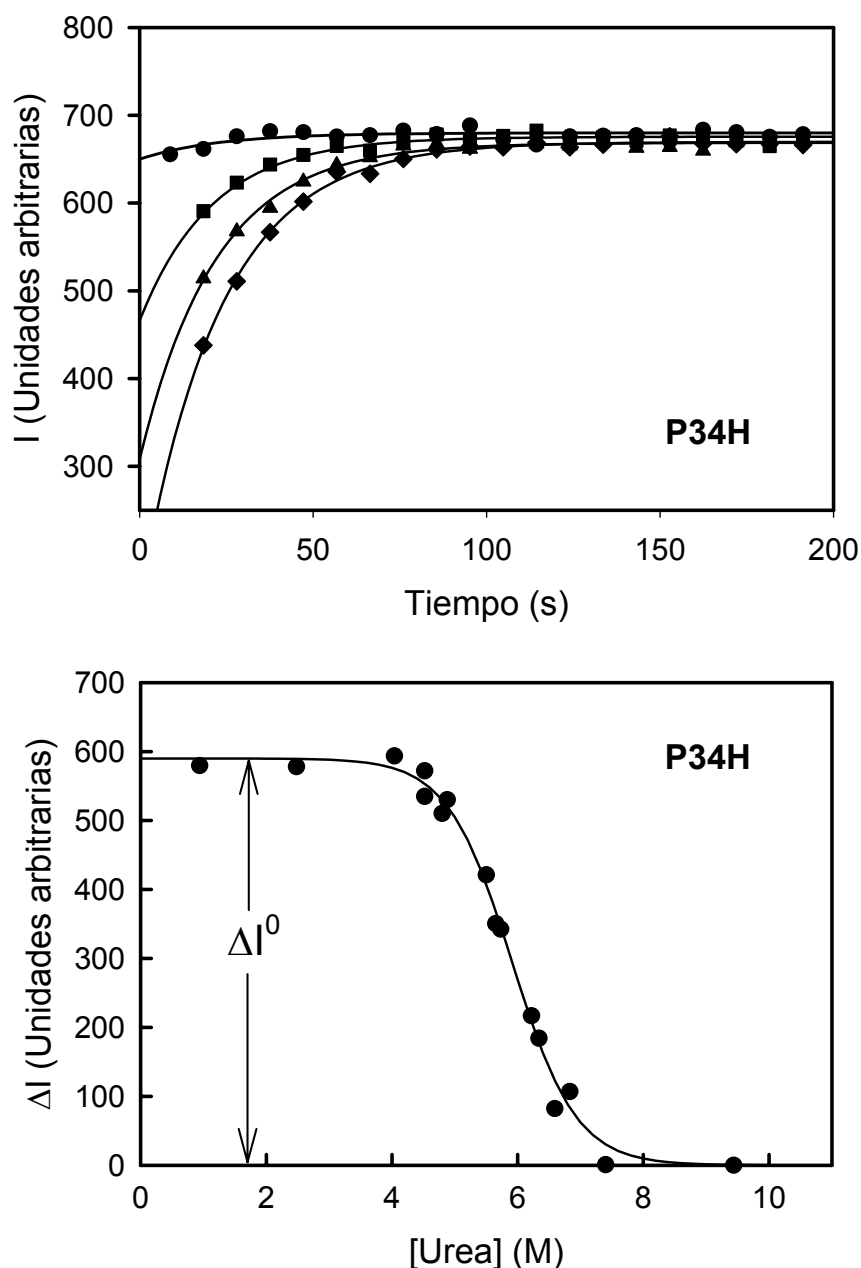


Figura 5.18 .(Arriba) Perfiles de intensidad de fluorescencia frente al tiempo tomados después de transferir una alícuota del mutante P34H a condiciones fuertemente desnaturizantes (9.44 M Urea, pH 7, $T= 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, concentración final de proteína 0.020 mg/mL). Las concentraciones de urea en las disoluciones de partida fueron: 7.08 M (círculos); 6.34 M (cuadrados); 5.65 M (triángulos); 4.88 M (diamantes). Las líneas representan los ajustes mediante la ecuación (2.43). (Abajo) Amplitudes de desplegamiento frente a concentración de urea. La línea representa el ajuste según la ecuación (5.14).

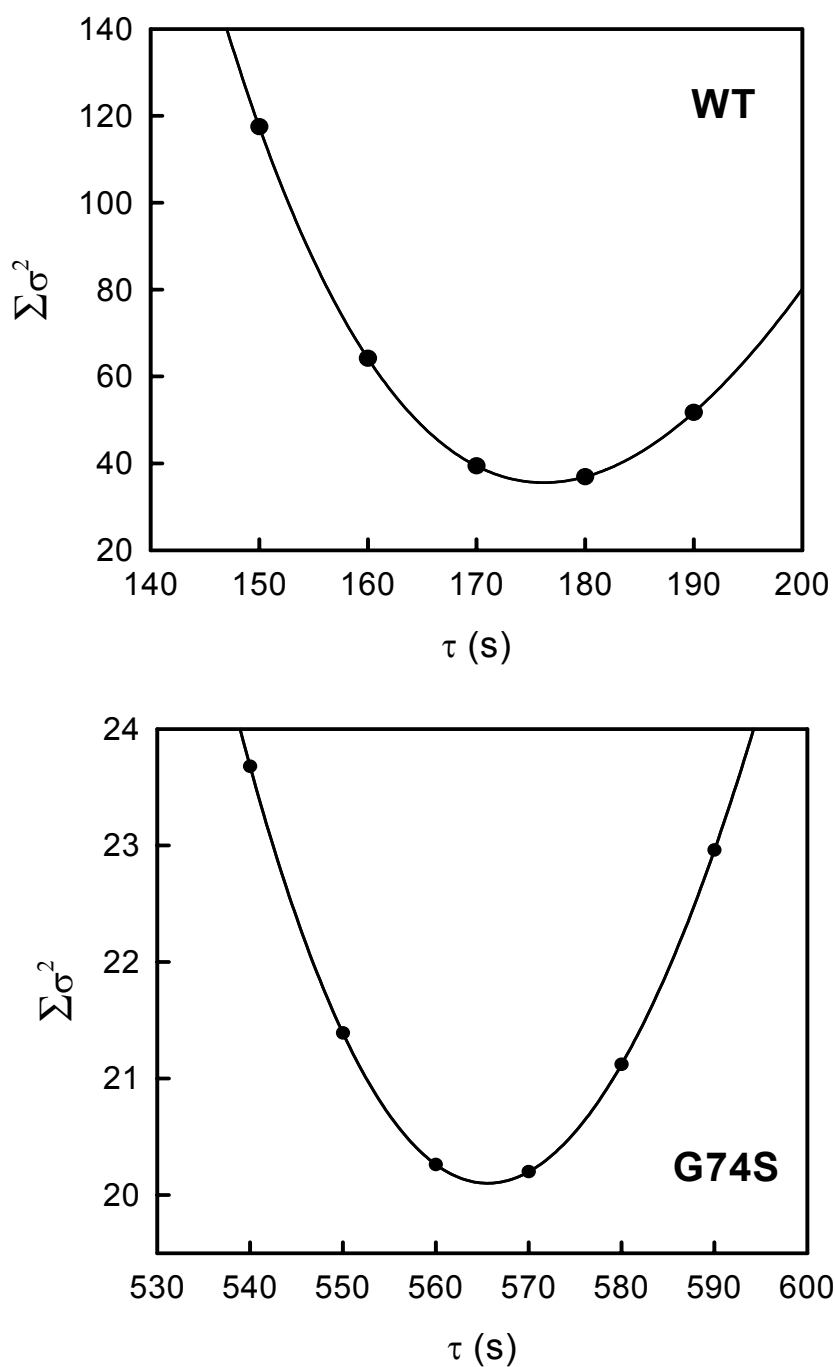


Figura. 5.19. Suma de los cuadrados de los errores de los ajustes de los perfiles de intensidad de fluorescencia frente a tiempo obtenidos mediante ensayos de doble salto (ecuación (2.43)), frente a diferentes valores de τ . El mínimo de la curva representa el τ óptimo que se seleccionó para realizar el ajuste global de las cinéticas. Arriba se representa para WT y abajo para el mutante G74S. Las líneas representan el ajuste a un polinomio de grado 4.

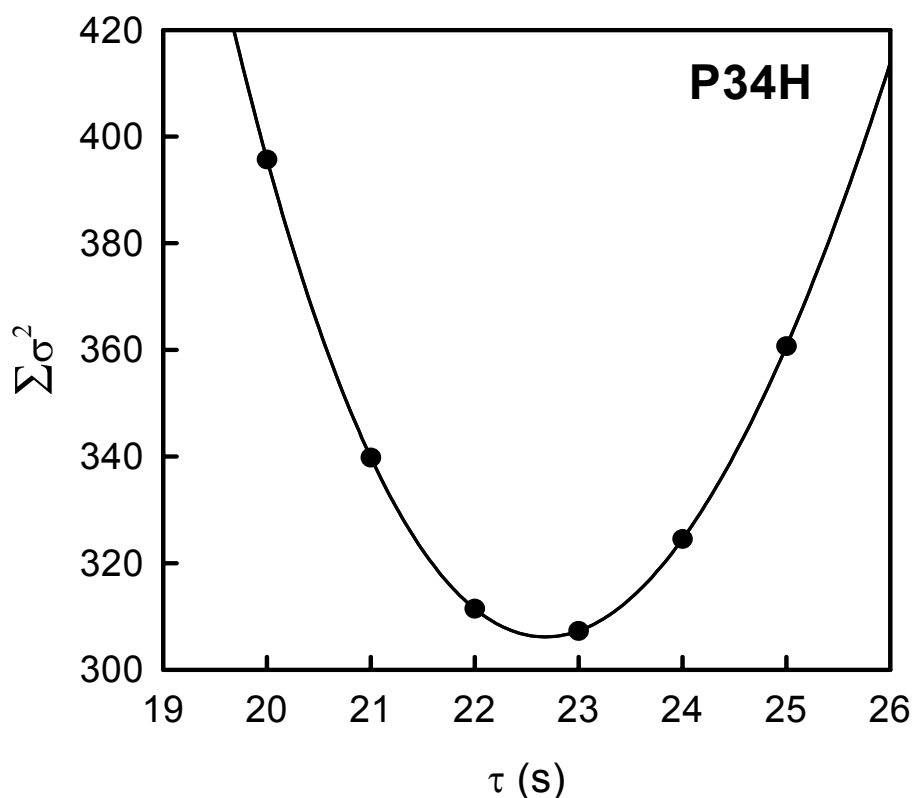


Figura 5.20. Suma de los cuadrados de los errores de los ajustes de los perfiles de intensidad de fluorescencia frente a tiempo obtenidos mediante ensayos de doble salto (ecuación (2.43)), frente a diferentes valores de τ . El mínimo de la curva representa el τ óptimo que se seleccionó para realizar el ajuste global de las cinéticas, para el mutante P34H. La línea representa el ajuste a un polinomio de grado 4.

EL análisis para la determinación del τ óptimo arroja unos valores de 177.4 s para WT; 565.5 s para G74S y 22.7 s para P34H. Estos valores se emplearon para realizar el ajuste global de las cinéticas.

Los valores de $m_{1/2}$ obtenidos mediante los experimentos de doble salto, se muestran en la tabla 5.2 y como se puede observar concuerdan, dentro del error experimental, con los valores de $m_{1/2}$ obtenidos en los chevrons (tabla 5.1). Esto

apoyaría la validez del modelo de dos estados. Hay que destacar que los errores de los valores de $m_{1/2}$ obtenidos mediante los experimentos de doble salto son algo mayores que los obtenidos a partir de los chevrons.

Variante	$C_{1/2}$ (M)	$m_{1/2}$ (kJ.mol ⁻¹ ·M ⁻¹)
WT	6.88±0.06	5.68±0.36
G74S	7.41±0.06	6.03±0.50
P34H	5.91±0.04	5.06±0.40

Tabla 5.2. Valores de $C_{1/2}$ y $m_{1/2}$ obtenidos a partir de los experimentos de doble salto. Los ajustes se realizaron según el modelo de dos estados mediante la ecuación (5.14).

5.2.3 Análisis global de los perfiles de ΔI frente a C y de los chevrons.

Como quiera que disponemos de valores de $C_{1/2}$ y $m_{1/2}$ obtenidos de dos procedimientos distintos, podemos realizar un ajuste global de ambos empleando las ecuaciones (5.2), (5.4), (5.5) y (5.14) que tienen como parámetros ajustables comunes $C_{1/2}$ y $m_{1/2}$. Mediante el ajuste global se consigue el mejor ajuste para ambos conjuntos y se puede comprobar si nuestro análisis es robusto. No obstante, y debido a que los puntos de los dos conjuntos de datos no están afectados del mismo error, el ajuste global se conviene que se haga con peso. Este ajuste se realizó con el programa MLAB y aparte de tener las dos matrices de datos, debemos introducir dos vectores, uno para cada conjunto, que sean la inversa de la varianza. Con estos vectores podremos pesar los ajustes. Los ajustes globales fueron buenos como puede observarse en las figuras 5.21, 5.22 y 5.23.

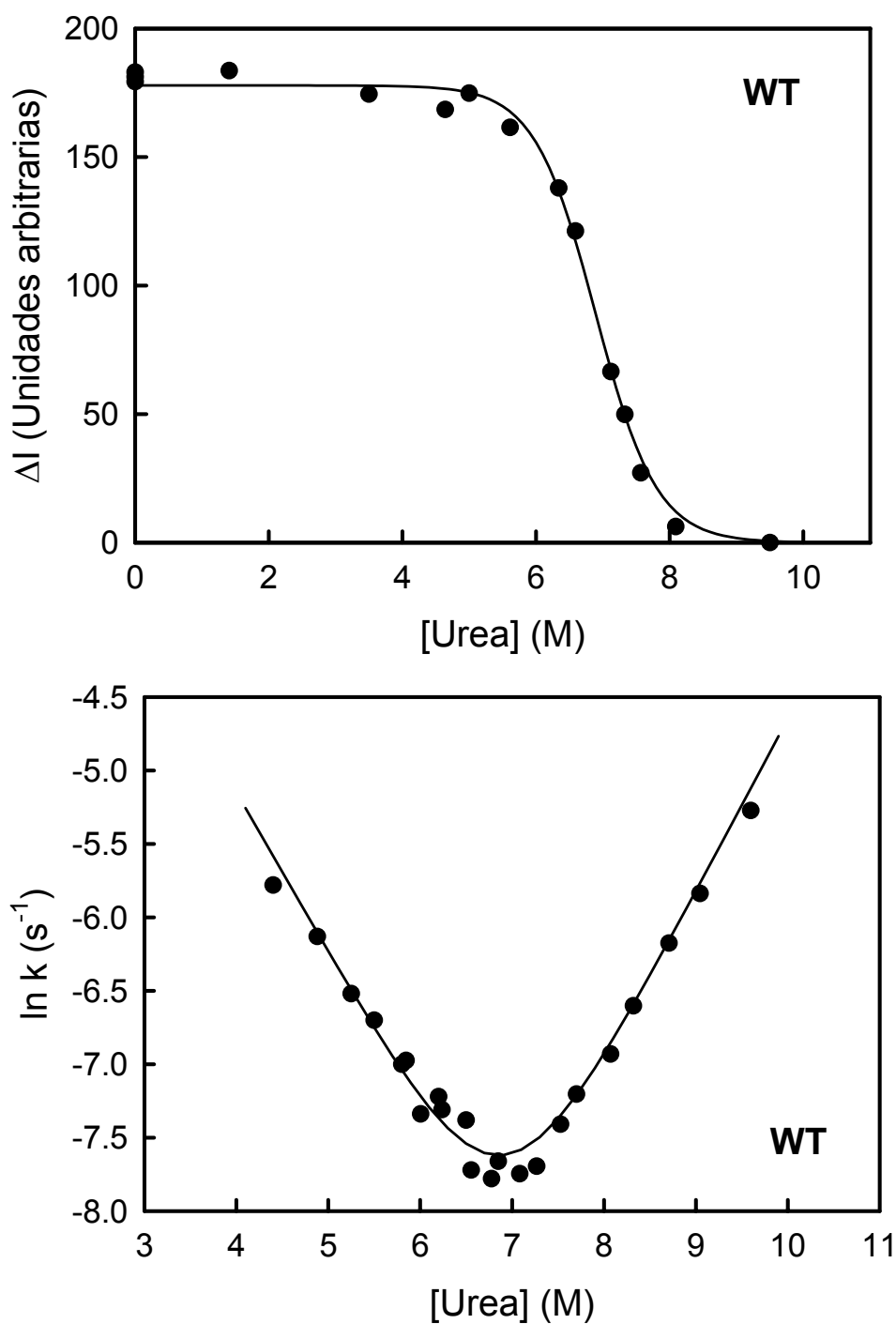


Figura 5.21. Ajuste global para los conjuntos de datos, amplitud frente a concentración de urea (arriba) y constantes de velocidad aparentes frente a concentración de urea para WT (abajo) empleando las ecuaciones (5.2), (5.4), (5.5) y (5.14). Los ajustes se realizaron con peso empleando el vector de varianza. Las líneas representan el ajuste y los puntos los datos experimentales.

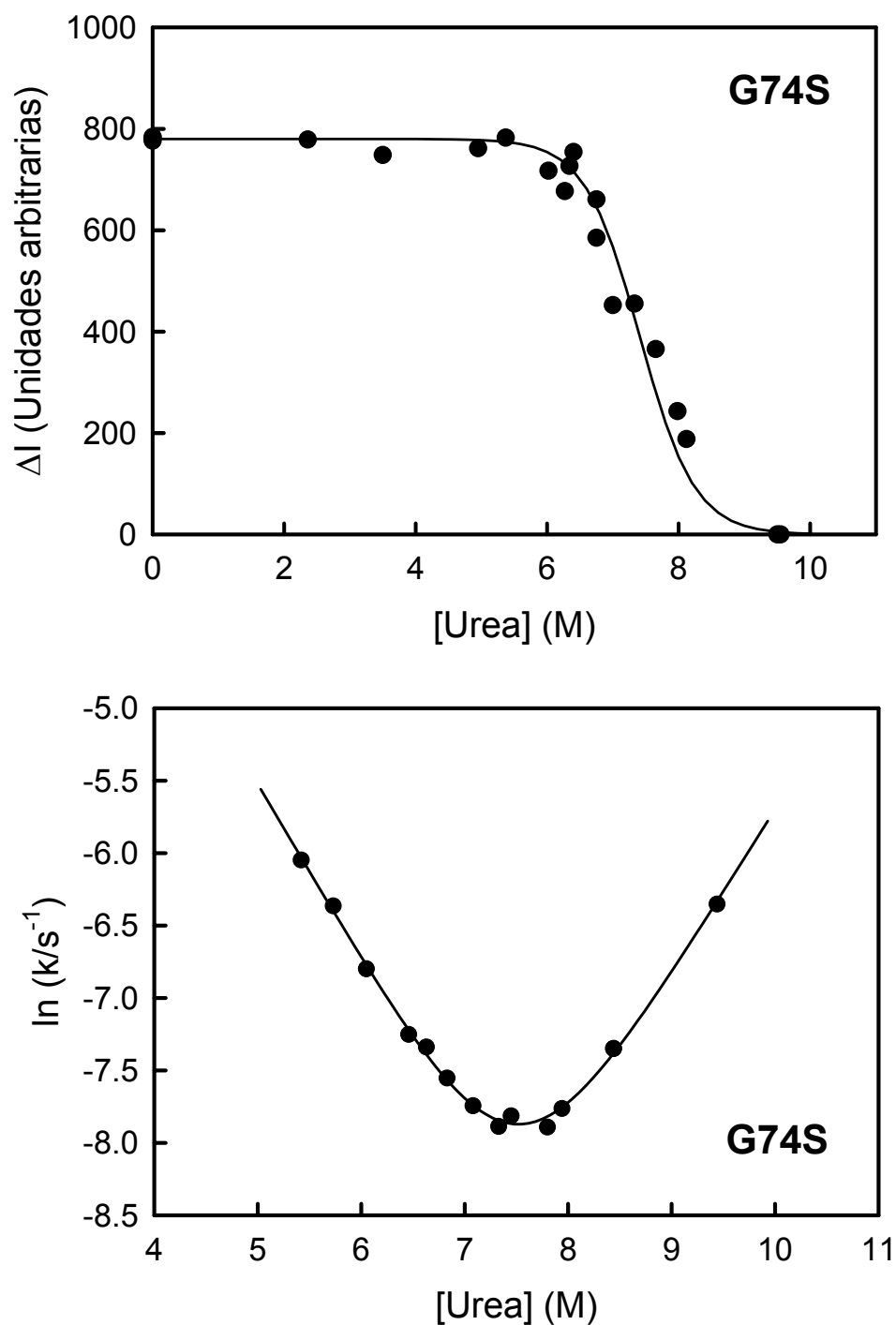


Figura 5.22. Ajuste global para los conjuntos de datos, amplitud frente a concentración de urea (arriba) y constantes de velocidad frente a concentración de urea para G74S (abajo) empleando las ecuaciones (5.2), (5.4), (5.5) y (5.14). Los ajustes se realizaron con peso empleando el vector de varianza. Las líneas representan el ajuste y los puntos los datos experimentales.

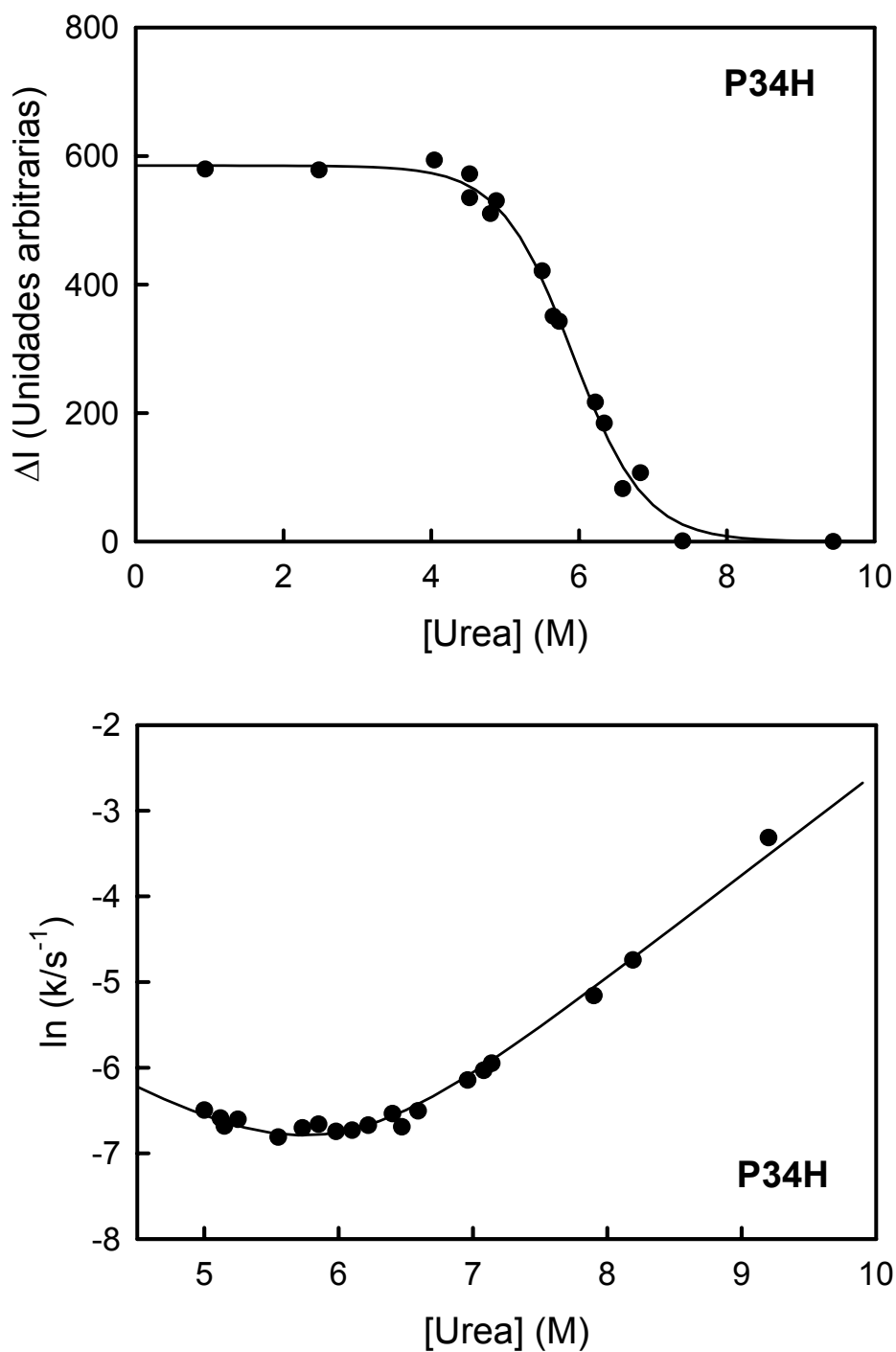


Figura 5.23. Ajuste global para los conjuntos de datos amplitud frente a concentración de urea (arriba) y constantes de velocidad frente a concentración de urea para P34H (abajo) empleando las ecuaciones (5.2), (5.4), (5.5) y (5.14). Los ajustes se realizaron con peso empleando el vector de varianza. Las líneas representan el ajuste y los puntos los datos experimentales.

A partir de los ajustes globales podemos obtener de nuevo los valores de $C_{1/2}$ y $m_{1/2}$ los cuales se muestran junto con su error en la tabla 5.3

Variante	$C_{1/2}$ (M)	$m_{1/2}$ (kJ.mol ⁻¹ ·M ⁻¹)
WT	6.90±0.03	5.63±0.20
G74S	7.40±0.03	5.96±0.17
P34H	5.91±0.03	5.06±0.23

Tabla 5.3. Valores de $C_{1/2}$ y $m_{1/2}$ obtenidos a partir de los ajustes globales de los experimentos de doble salto y de los chevron.

5.3 Análisis de los valores de $m_{1/2}$, $m_{D-\ddagger}$ y $m_{N-\ddagger}$

Los resultados anteriores, muestran que los valores de $m_{1/2}$, $m_{D-\ddagger}$ y $m_{N-\ddagger}$, para los mutantes P34H, G74S y WT, obtenidos mediante cinéticas de desplegamiento y replegamiento, concuerdan, dentro del error experimental, con los valores obtenidos mediante ensayos de doble salto. Esto avala, en estos casos (y en el resto de mutantes también) el análisis según el modelo cinético de dos estados.

A partir de los datos de la tabla 5.1, podemos realizar una representación de $m_{1/2}$, $m_{D-\ddagger}$ y $m_{N-\ddagger}$ frente a $C_{1/2}$ para todos los mutantes sugeridos por el alineamiento de secuencias, la cual se muestra en la figura 5.24.

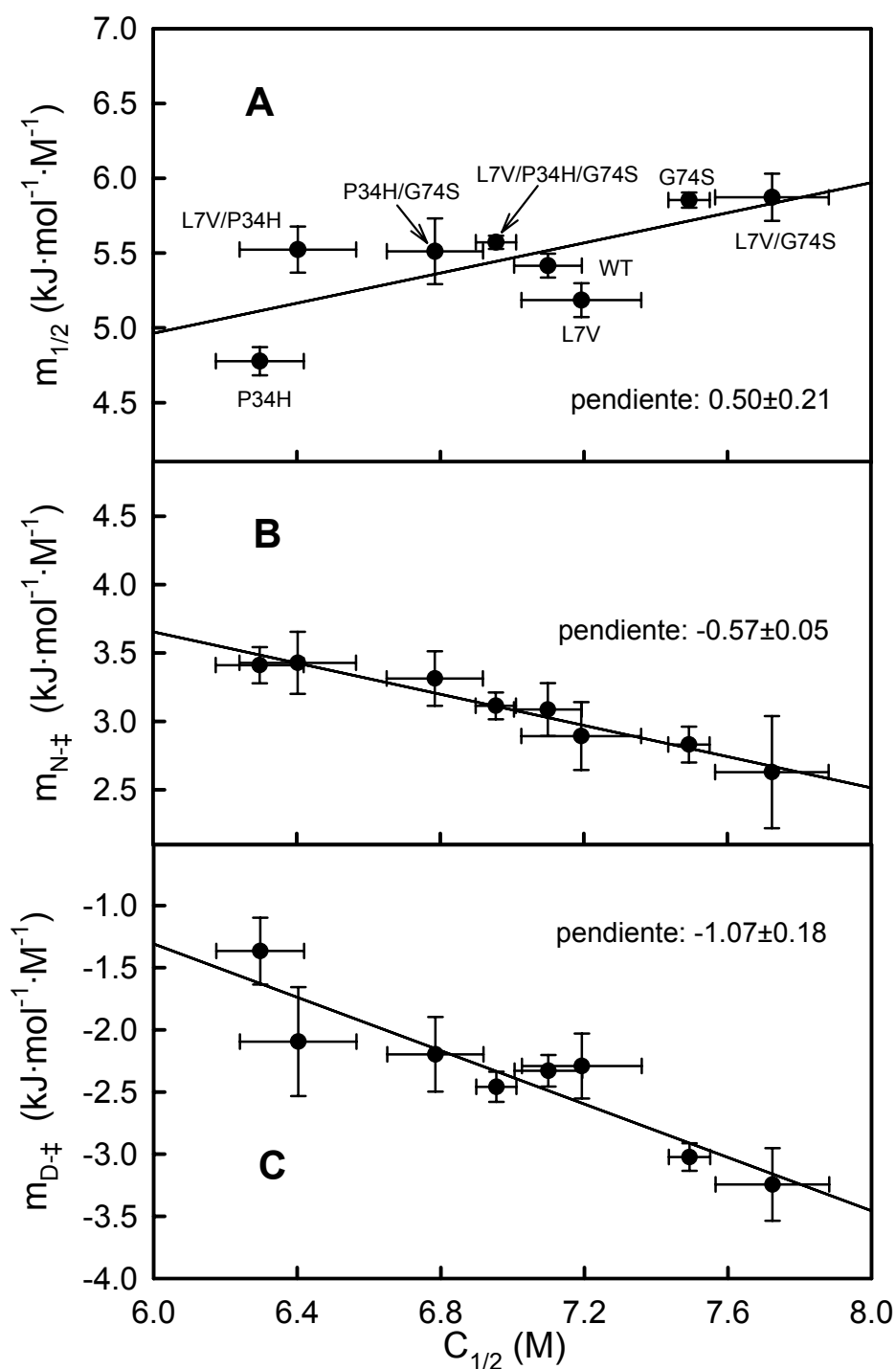


Figura 5.24. Valores de $m_{1/2}$ (A), $m_{N\ddagger}$ (B) y $m_{D\ddagger}$ (C) para tiorredoxina WT y las formas mutantes del ciclo de triple mutante frente a $C_{1/2}$. Los puntos corresponden a los valores obtenidos de los ajustes de los chevrons según las ecuaciones (5.2), (5.4) y (5.5) (tabla 5.1). Las líneas corresponden a los ajustes lineales de los datos experimentales y los errores se obtienen de los ajustes de los chevrons. Las unidades de las pendiente indicadas son $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^2$.

De la misma manera que hicimos en la sección 4 con los valores de ΔG para las mutaciones, podemos realizar un cubo con los valores de $m_{1/2}$ (tabla 5.1) y obtener los valores de $\Delta m_{1/2}$. De esta forma podemos determinar cómo cambian los valores de $m_{1/2}$ con las mutaciones (ver figura 5.25). Así, podemos hablar de valores de $\Delta m_{1/2}$ y valores de acoplamiento $\Delta m_{1/2,I}(i,j)$ (figura 5.26), definidos como:

$$\Delta m_{1/2,I}(i,j) = \Delta m_{1/2}(i,j \rightarrow 0,j) - \Delta m_{1/2}(i,0 \rightarrow 0,0) \quad (5.15)$$

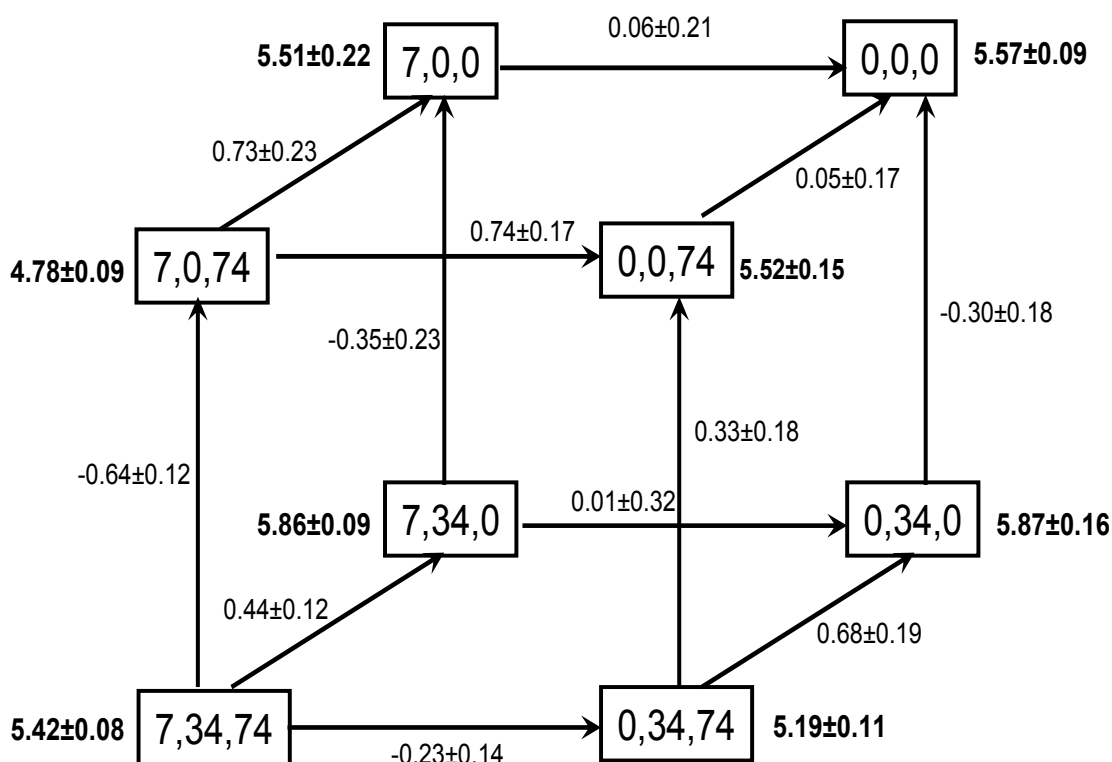


Figura 5.25 Cubo con valores de $m_{1/2}$ (tabla 5.1), situados en los vértices y en negrita. Los valores de $\Delta m_{1/2}$ están situados a lo largo de las flechas, para todas las mutaciones en posiciones 7, 34 y 74. Las diferentes variantes se especifican dando el número de residuo o ceros en caso de que el residuo haya sido mutado. Los valores están expresados en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$.

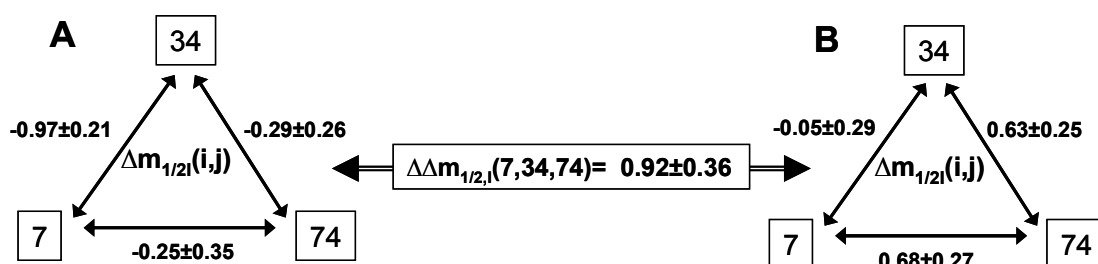


Figura 5.26. Valores de acoplamiento $\Delta m_{1/2,l}(i,j)$ calculados a partir de los 6 ciclos de dobles mutantes que conforman el ciclo de triple mutante, para dos posibles casos: 1) el tercer residuo permanece igual que en WT (A); 2) el tercer residuo está mutado (B). El número en la doble flecha que conecta A y B es el efecto de la mutación en un residuo en $\Delta m_{1/2}$ de acoplamiento de los otros dos. Los valores están expresados en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$.

Como ya hemos visto, a partir del ajuste de los chevrons mediante las ecuaciones (5.2), (5.4) y (5.5) también podemos calcular los valores de $m_{D-\ddagger}$ y $m_{N-\ddagger}$ (tabla 5.1). De manera análoga, podemos realizar los cubos para el caso de $m_{D-\ddagger}$ y $m_{N-\ddagger}$ (figuras 5.27 a 5.30).

A partir de los valores de $\Delta m_{1/2}$, $\Delta m_{D-\ddagger}$ y $\Delta m_{N-\ddagger}$ que obtenemos de los cubos del triple mutante, podemos realizar una representación de $\Delta m_{D-\ddagger}$ y $\Delta m_{N-\ddagger}$ frente a $\Delta m_{1/2}$ para cada una de las mutaciones (ver figura 5.31). Esta representación implica tres conjuntos de mutaciones, ya que si tenemos en cuenta que tenemos WT y tres mutantes simples L7V, P34H y G74S, cada mutación se puede realizar sobre 4 formas diferentes (por ejemplo, la mutación L7V se puede realizar sobre WT, P34H, G74S y P34H/G74S), de ahí que en total tengamos 12 puntos. Cada uno de estos conjuntos de mutaciones representa las cuatro aristas en la misma dirección de los cubos de las figuras 5.27 y 5.29 frente a las correspondientes aristas del cubo de la figura 5.25.

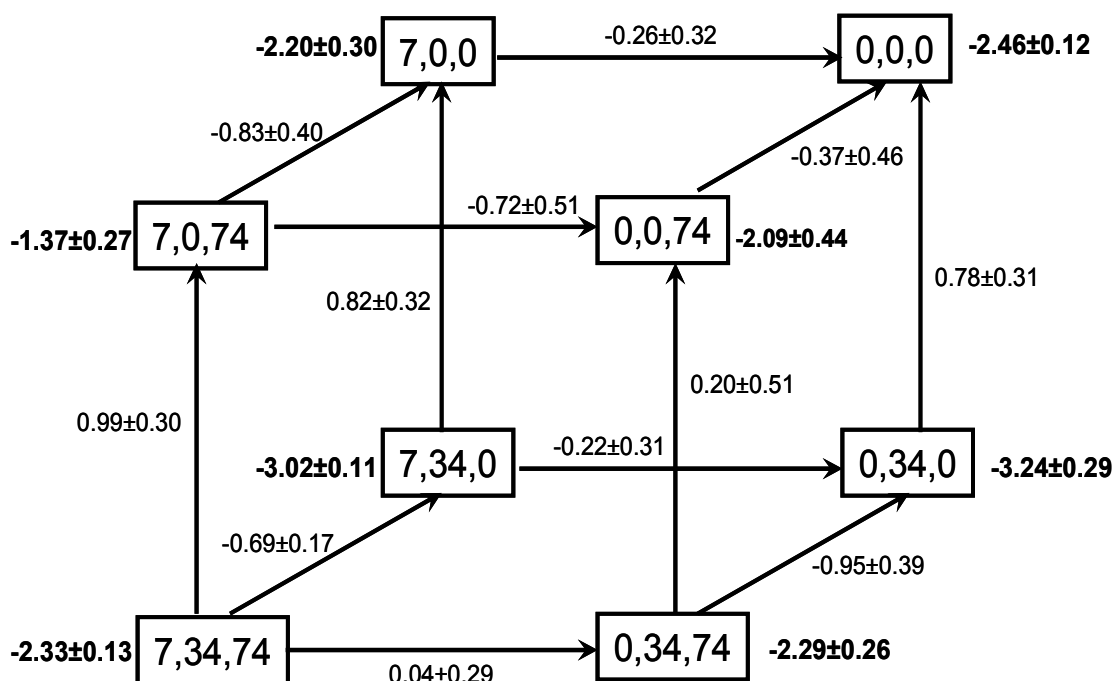


Figura 5.27 Cubo con valores de m_{D-} (tabla 5.1), en los vértices y en negrita. Los valores de Δm_{D-} están situados a lo largo de las flechas, para todas las mutaciones en posición 7, 34 y 74. Las diferentes variantes se especifican dando el número de residuo o ceros en caso de que el residuo haya sido mutado. Los valores están expresados en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$.

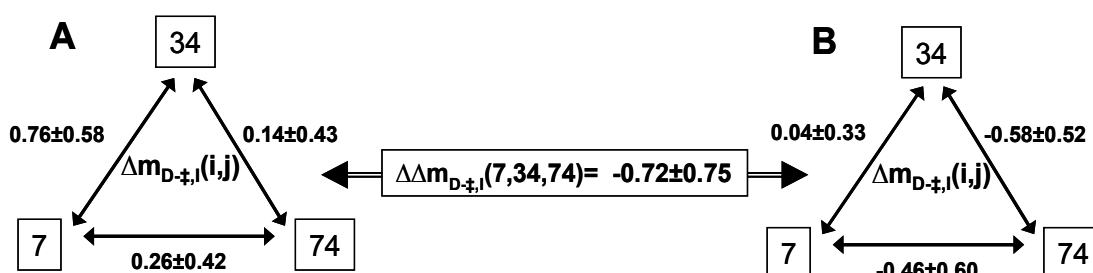


Figura 5.28. Valores de acoplamiento $\Delta m_{D-}(i,j)$ calculados a partir de los 6 ciclos de dobles mutantes que conforman el ciclo de triple mutante, para dos posibles casos: 1) el tercer residuo permanece igual que en WT (A); 2) el tercer residuo está mutado (B). El número en la doble flecha que conecta A y B es el efecto de la mutación en un residuo en Δm_{D-} de acoplamiento de los otros dos. Los valores están expresados en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$

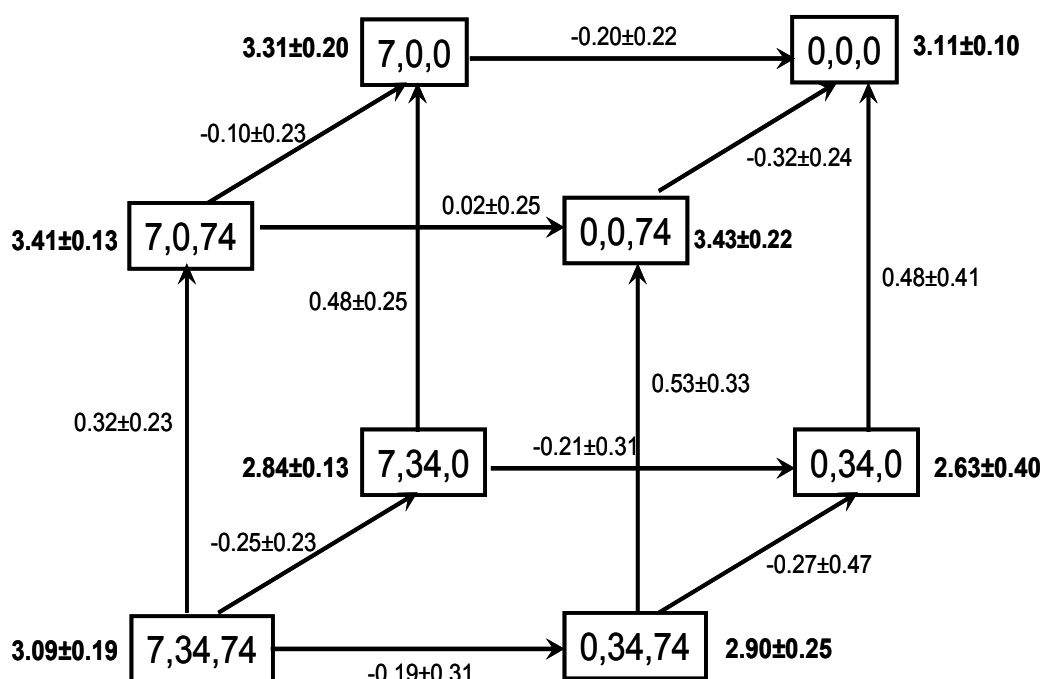


Figura 5.29 Cubo con valores de $m_{N-\xi}$ (tabla 5.1), en los vértices y en negrita. Los valores de $\Delta m_{N-\xi}$ están situados a lo largo de las flechas, para todas las mutaciones en posición 7, 34 y 74. Las diferentes variantes se especifican dando el número de residuo o ceros en caso de que el residuo haya sido mutado. Los valores están expresados en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$.

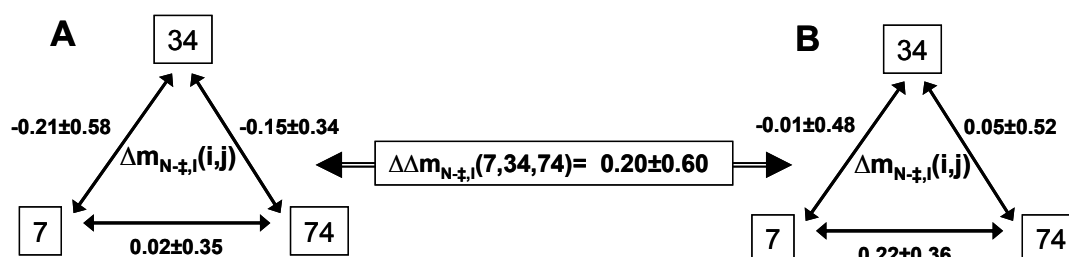


Figura 5.30. Valores de acoplamiento $\Delta m_{N-\xi,l}(i,j)$ calculados a partir de los 6 ciclos de dobles mutantes que conforman el ciclo de triple mutante, para dos posibles casos: 1) el tercer residuo permanece igual que en WT (A); 2) el tercer residuo está mutado (B). El número en la doble flecha que conecta A y B es el efecto de la mutación en un residuo en $\Delta m_{N-\xi}$ de acoplamiento de los otros dos. Los valores están expresados en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$.

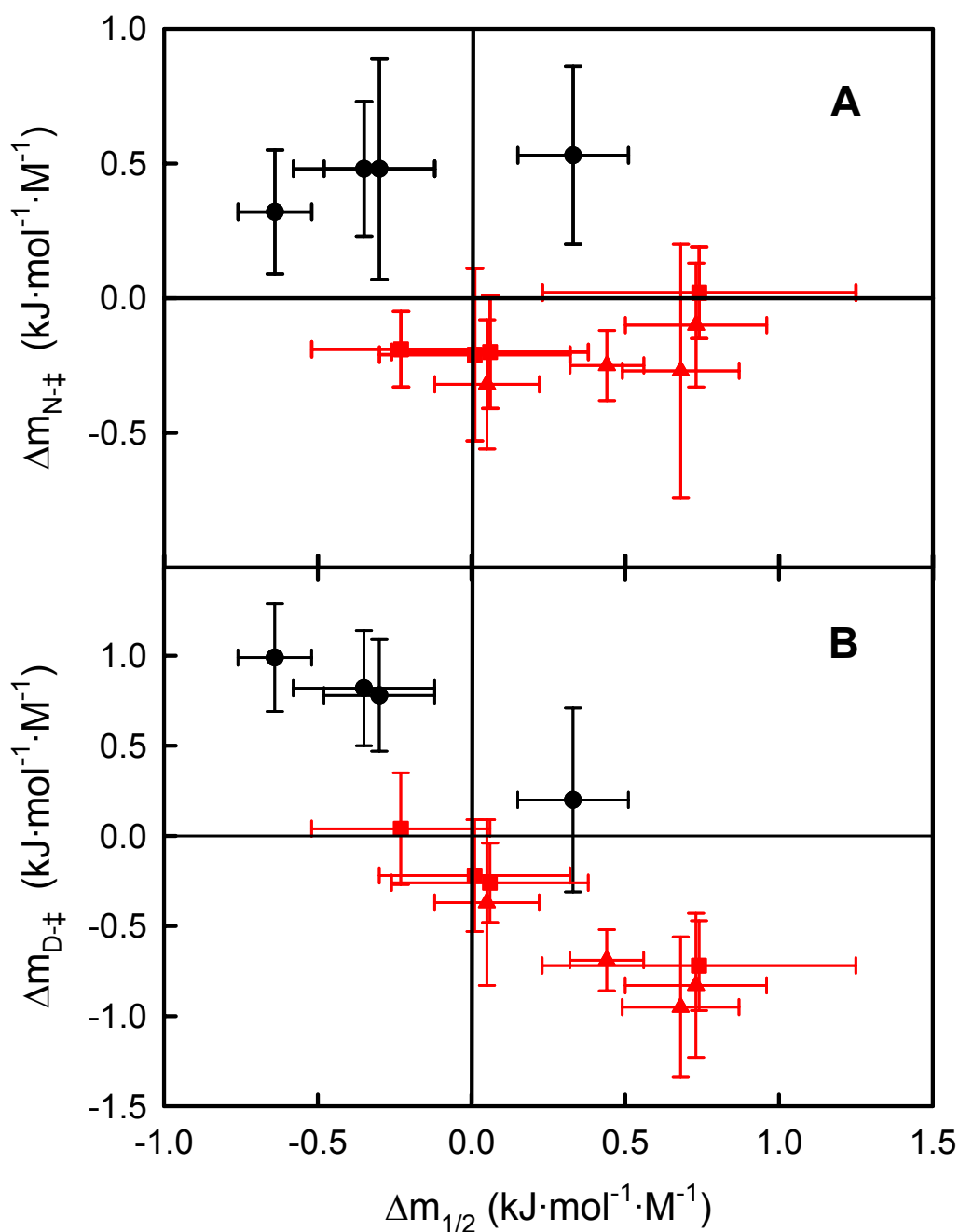


Figura 5.31 Valores de $\Delta m_{N-‡}$ frente a $\Delta m_{1/2}$ (A) y $\Delta m_{D-‡}$ frente a $\Delta m_{1/2}$ (B) para los mutantes que implican a P34H (círculos negros); L7V (cuadrados rojos) y G74S (triángulos rojos) (ver texto). Los símbolos sólidos representan los valores obtenidos a partir de los cubos de triple mutante, figuras 5.25, 5.27 y 5.29. Las barras de error se obtienen por procedimientos estándar de cálculo de errores a partir de los errores, obtenidos de los ajustes de los chevrons, de $m_{N-‡}$, $m_{1/2}$ y $m_{D-‡}$.

Como puede verse en la figura 5.31, los valores de $\Delta m_{N-\ddot{x}}$ y $\Delta m_{D-\ddot{x}}$ frente a $\Delta m_{1/2}$ se disponen fundamentalmente en los cuadrantes superior izquierdo e inferior derecho. A partir de los cubos de los diferentes valores de m podemos hacer una gráfica del valor absoluto de $\Delta m_{1/2}$ frente al menor valor de $m_{1/2}$ de las dos formas involucradas en una mutación (figura 5.32). Como puede observarse se llega a un valor máximo de $m_{1/2}$, en torno a $5.9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$, para el cual $\Delta m_{1/2}$ se hace cero. Estos resultados serán discutidos en el apartado 5.6 de conclusiones.

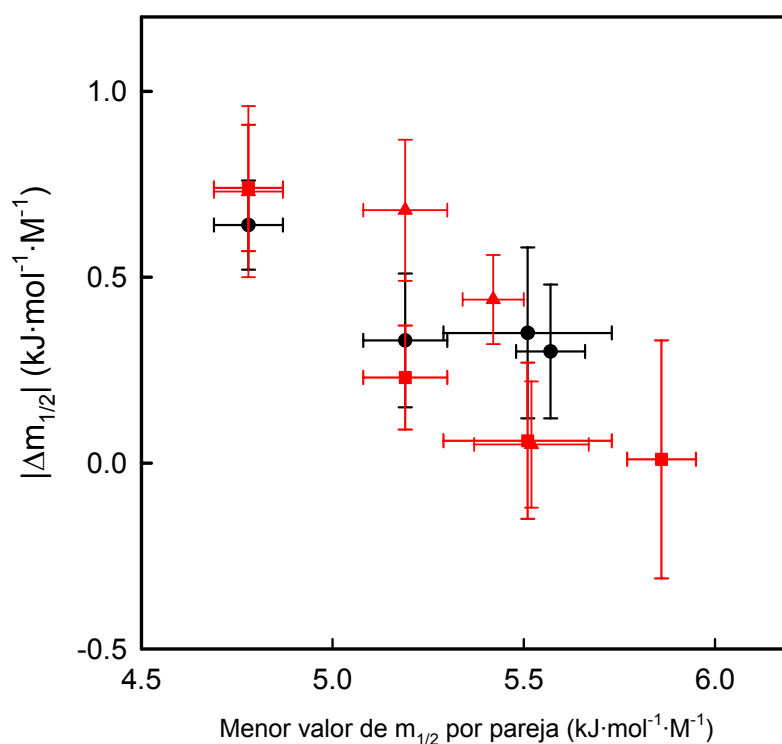


Figura 5.32 Valor absoluto de $\Delta m_{1/2}$ (figura 5.25) frente al menor valor de $m_{1/2}$ de las dos formas implicadas en cada mutación (tabla 5.1). Las formas que implican la mutación P34H se muestran con círculos negros, cuadrados rojos para la mutación L7V y triángulos rojos para la mutación G74S.

5.4 Análisis de los valores de ΔG obtenidos a partir de cinéticas de replegamiento-desplegamiento inducido por urea.

Para obtener los valores de ΔG a diferentes concentraciones de urea, podríamos emplear la ecuación (5.13). No obstante, para hacerlo con un menor grado de error podemos introducir ΔG , considerando la ecuación (5.8), en la ecuación que describe la dependencia de la constante de velocidad aparente con la concentración de urea (ajuste de los chevrons); la diferencia en este caso es que en lugar de emplear $C_{1/2}$ las ecuaciones están escritas en términos de una C^* general. Debemos de considerar que para $C \neq C_{1/2}$ $k_F \neq k_D$, quedando las ecuaciones (5.4) y (5.5) definidas, respectivamente como:

$$\ln k_F = \ln k_F^* + \frac{m_{D-\ddagger}}{RT} \cdot (C - C^*) \quad (5.16)$$

$$\ln k_D = \ln k_D^* + \frac{m_{N-\ddagger}}{RT} \cdot (C - C^*) \quad (5.17)$$

donde k_F^* y k_D^* son las constantes de plegamiento y desplegado a $C=C^*$, respectivamente. Como quiera que a alta concentración de desnaturizante el estado desnaturizado está favorecido; K es mucho mayor de 1, $k_D \gg k_F$ y por tanto la constante de velocidad aparente es aproximadamente k_D . Por el contrario, a baja concentración el estado favorecido es el estado nativo y $k_D \ll k_F$, ahora la constante de velocidad aparente es aproximadamente k_F . El ajuste de los chevrons a un valor alto y bajo de C^* empleando las ecuaciones (5.2), (5.16) y (5.17), permite obtener los valores

de k_F y k_D con mayor exactitud ya que ambas serían parámetros ajustables y podemos conocer sus errores a partir del ajuste.

Realizamos los ajustes de los chevrons a las concentraciones $C^*=5.2\text{M}$ y $C^*=8.2\text{M}$. También se realizan estos ajustes a $C^*=7.1\text{M}$, que es $C_{1/2}$ de WT. Obviamente, para el caso de WT, el ajuste a $C^*=7.1\text{M}$, da valor cero para ΔG . Estos ajustes los podemos hacer para todas las formas. Con los valores de ΔG obtenidos, de nuevo podemos confeccionar los cubos del triple mutante para las tres concentraciones y obtener los correspondientes valores de ΔG de acoplamiento. Los cubos y las energías de acoplamiento, determinadas mediante la ecuación (4.4) para las tres concentraciones, 5.2 M, 7.1 M y 8.2 M se muestran, en las figuras 5.33 a 5.38.

Además de los valores de ΔG , resulta de interés para el estudio del estado de transición, el cambio de energía de activación ΔG^\ddagger . No obstante, no es posible determinar el valor de ΔG^\ddagger ya que según la ecuación (5.3), existe una constante de integración que *a priori* no conocemos su valor. Sin embargo, y empleando la ecuación (5.3), sí podemos determinar el cambio en la energía de activación asociado a una mutación, $\Delta\Delta G^\ddagger$, tanto para los procesos de desplegamiento como de replegamiento, a partir de los valores de k_F y k_D que obtenemos de los ajustes para las tres mencionadas concentraciones. Al igual que con los valores de ΔG podemos hacer los cubos con los valores de $\Delta\Delta G_N^\ddagger$ y $\Delta\Delta G_D^\ddagger$ y determinar las energías de acoplamiento también mediante la ecuación (4.4). Estos cubos se muestran en las figuras 5.39 a 5.50.

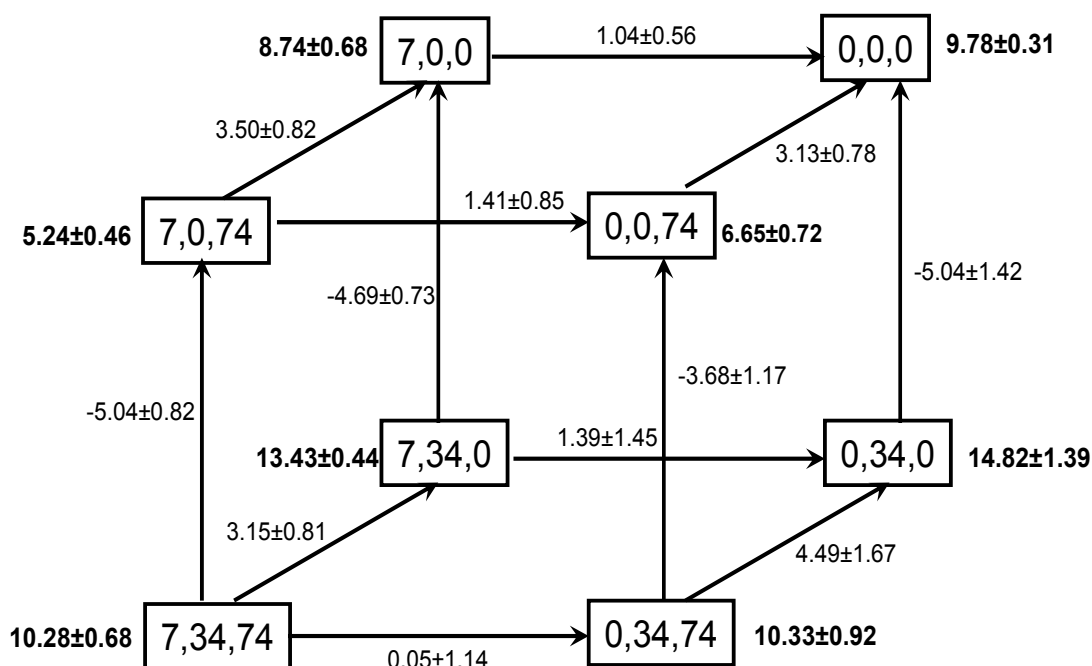


Figura 5.33. Cubo con valores de ΔG obtenidos a partir de los ajustes de los chevrons, para $C^*=5.2\text{ M}$ (ver texto), en los vértices y en negrita. Los valores de $\Delta\Delta G$ están situados a lo largo de las flechas, para todas las mutaciones a partir de los residuos 7, 34 y 74. Las diferentes variantes se especifican dando el número de residuo o ceros en caso de que el residuo haya sido mutado. Los valores están expresados en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

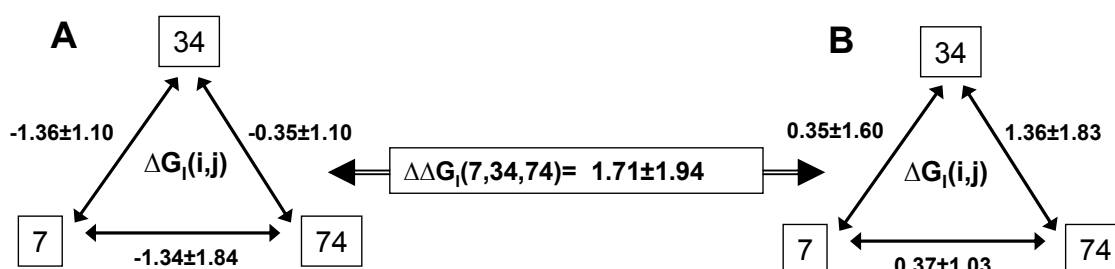


Figura 5.34. Energías de acoplamiento calculadas a partir de los 6 ciclos de dobles mutantes que conforman el ciclo de triple mutante para $C^*=5.2\text{ M}$, para dos posibles casos: 1) el tercer residuo permanece igual que en WT (A); 2) el tercer residuo está mutado (B). El número en la doble flecha que conecta A y B es el efecto de la mutación en un residuo en la energía de acoplamiento de los otros dos. Los valores están expresados en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

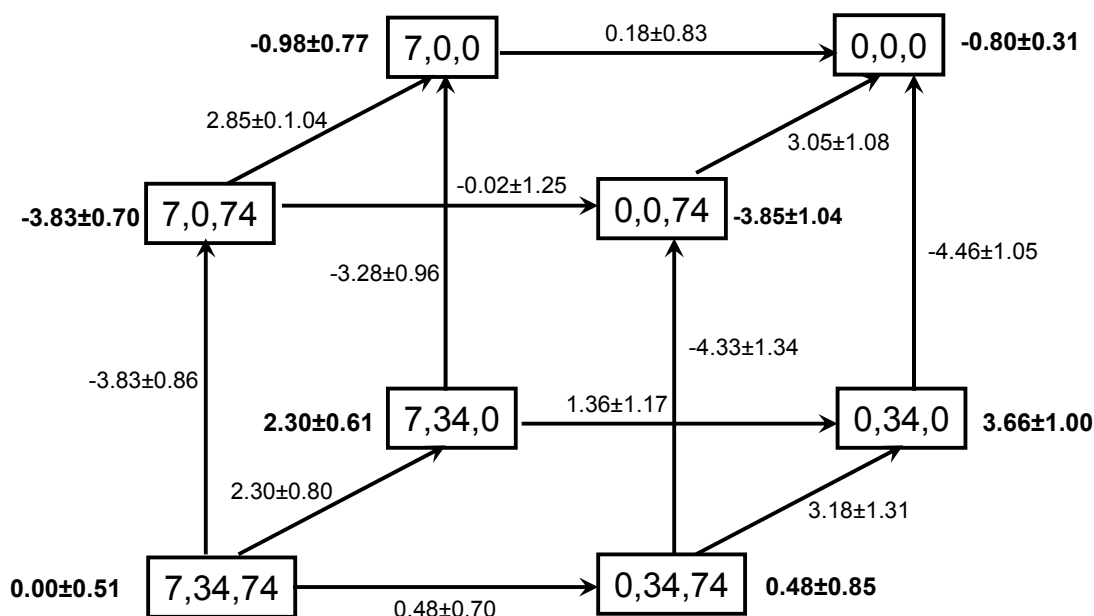


Figura 5.35. Cubo con valores de ΔG obtenidos a partir de los ajustes de los chevrons, para $C^* = 7.1$ M (ver texto), en los vértices y en negrita. Los valores de $\Delta\Delta G$ están situados a lo largo de las flechas, para todas las mutaciones a partir de los residuos 7, 34 y 74. Las diferentes variantes se especifican dando el número de residuo o ceros en caso de que el residuo haya sido mutado. Los valores están expresados en kJ·mol⁻¹.

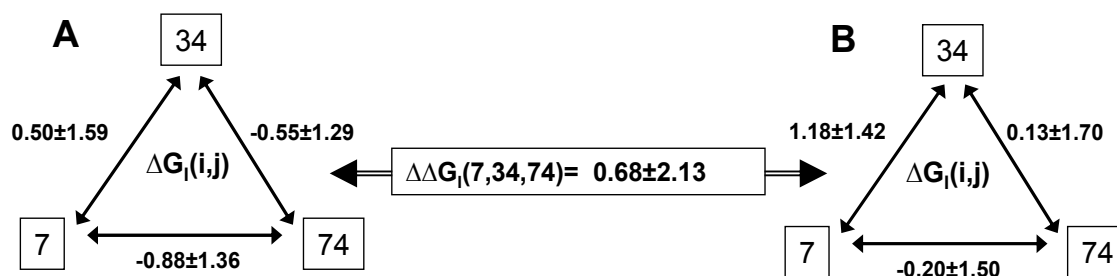


Figura 5.36. Energías de acoplamiento calculadas a partir de los 6 ciclos de dobles mutantes que conforman el ciclo de triple mutante, para $C^* = 7.1$ M, para dos posibles casos: 1) el tercer residuo permanece igual que en WT (A); 2) el tercer residuo está mutado (B). El número en la doble flecha que conecta A y B es el efecto de la mutación en un residuo en la energía de acoplamiento de los otros dos. Los valores están expresados en kJ·mol⁻¹.

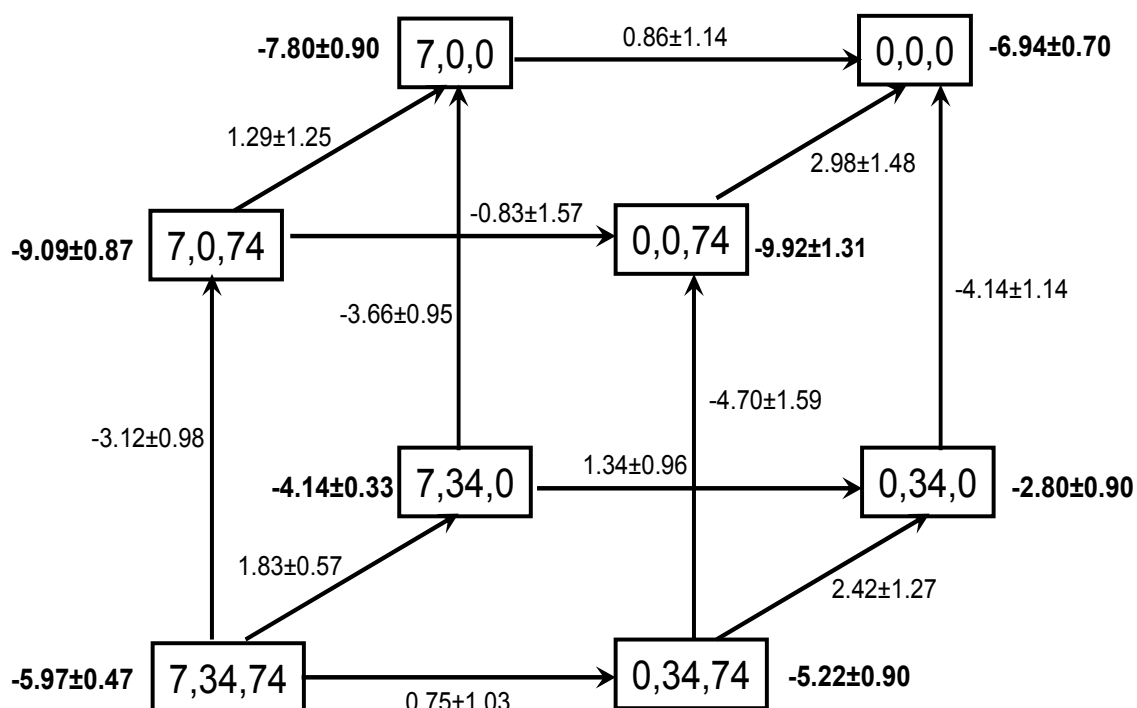


Figura 5.37. Cubo con valores de ΔG obtenidos a partir de los ajustes de los chevrons, para $C^* = 8.2 M$ (ver texto), en los vértices y en negrita. Los valores de $\Delta\Delta G$ están situados a lo largo de las flechas, para todas las mutaciones a partir de los residuos 7, 34 y 74. Las diferentes variantes se especifican dando el número de residuo o ceros en caso de que el residuo haya sido mutado. Los valores están expresados en kJ·mol⁻¹.

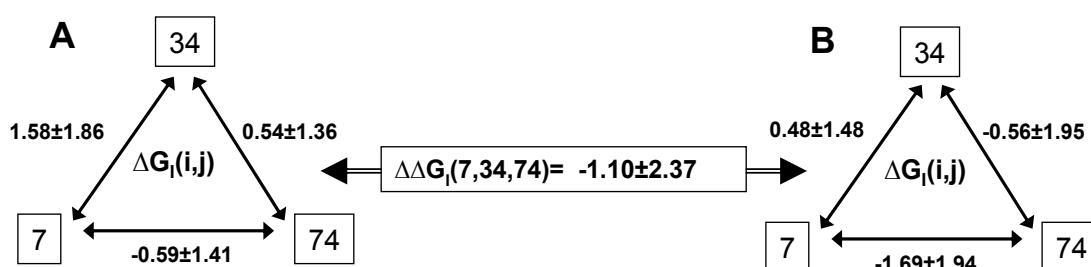


Figura 5.38. Energías de acoplamiento calculadas a partir de los 6 ciclos de dobles mutantes que conforman el ciclo de triple mutante, para $C^* = 8.2 M$, para dos posibles casos: 1) el tercer residuo permanece igual que en WT (A); 2) el tercer residuo está mutado (B). El número en la doble flecha que conecta A y B es el efecto de la mutación en un residuo en la energía de acoplamiento de los otros dos. Los valores están expresados en kJ·mol⁻¹.

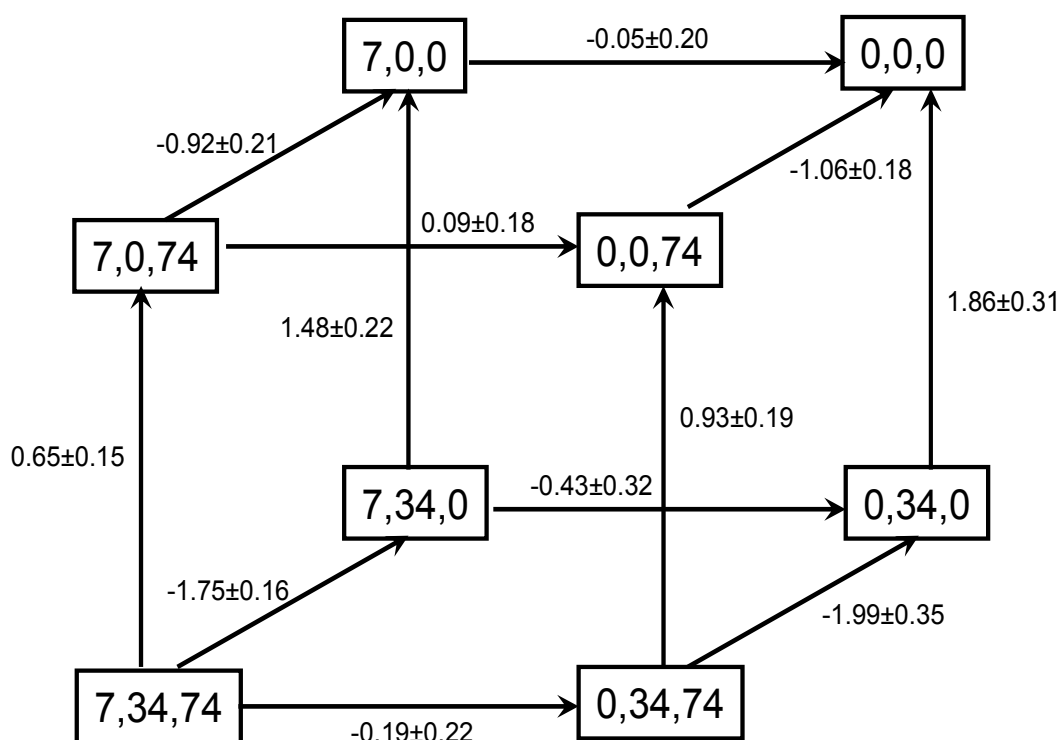


Figura 5.39. Cubo con valores de $\Delta\Delta G_{D,i}^{\ddagger}$ obtenidos a partir de las constantes cinéticas para $C^*=5.2 M$ (ver texto), situados a lo largo de las flechas, para todas las mutaciones a partir de los residuos 7, 34 y 74. Las diferentes variantes se especifican dando el número de residuo o ceros en caso de que el residuo haya sido mutado. Los valores están expresados en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

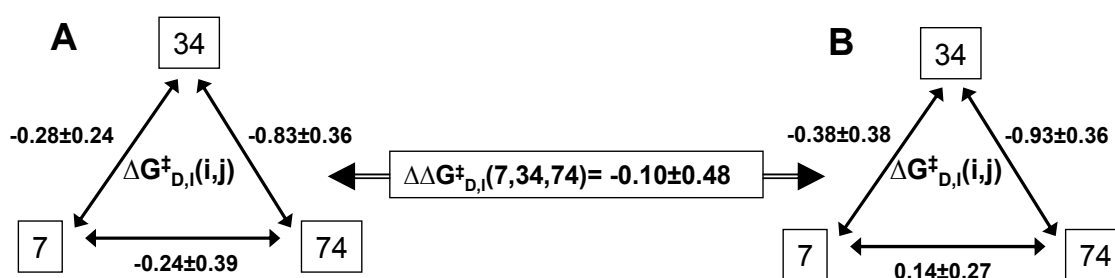


Figura 5.40. Energías de acoplamiento $\Delta G_{D,i}^{\ddagger}$, calculadas a partir de los 6 ciclos de dobles mutantes que conforman el ciclo de triple mutante, para $C^*=5.2 M$, para dos posibles casos: 1) el tercer residuo permanece igual que en WT (A); 2) el tercer residuo está mutado (B). El número en la doble flecha que conecta A y B es el efecto de la mutación en un residuo en la energía de acoplamiento de los otros dos. Los valores están expresados en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

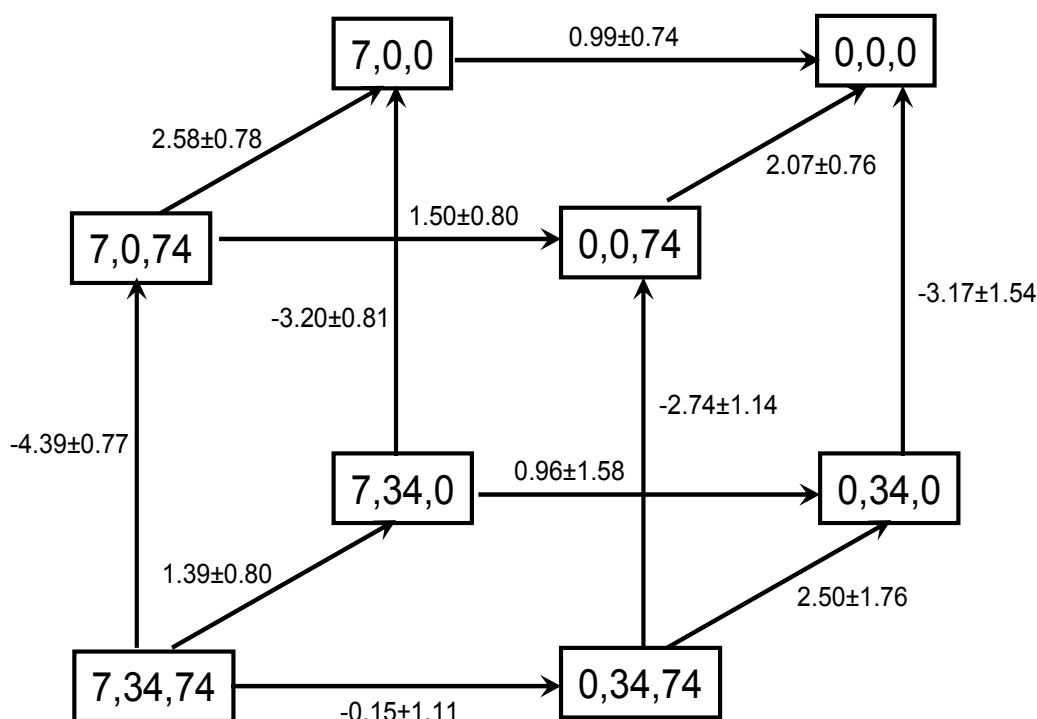


Figura 5.41. Cubo con valores de $\Delta\Delta G^{\ddagger}_N$, obtenidos a partir de las constantes cinéticas para $C^*=5.2\text{ M}$ (ver texto), situados a lo largo de las flechas, para todas las mutaciones a partir de los residuos 7, 34 y 74. Las diferentes variantes se especifican dando el número de residuo o ceros en caso de que el residuo haya sido mutado. Los valores están expresados en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

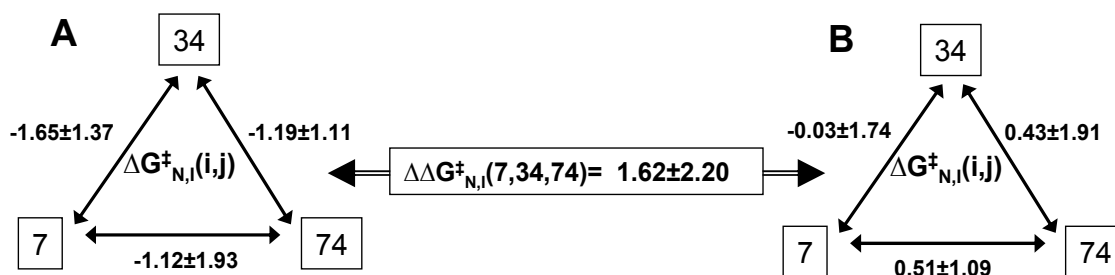


Figura 5.42. Energías de acoplamiento $\Delta G^{\ddagger}_{N,i,j}$, calculadas a partir de los 6 ciclos de dobles mutantes que conforman el ciclo de triple mutante, para $C^*=5.2\text{ M}$, para dos posibles casos: 1) el tercer residuo permanece igual que en WT (A); 2) el tercer residuo está mutado (B). El número en la doble flecha que conecta A y B es el efecto de la mutación en un residuo en la energía de acoplamiento de los otros dos. Los valores están expresados en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

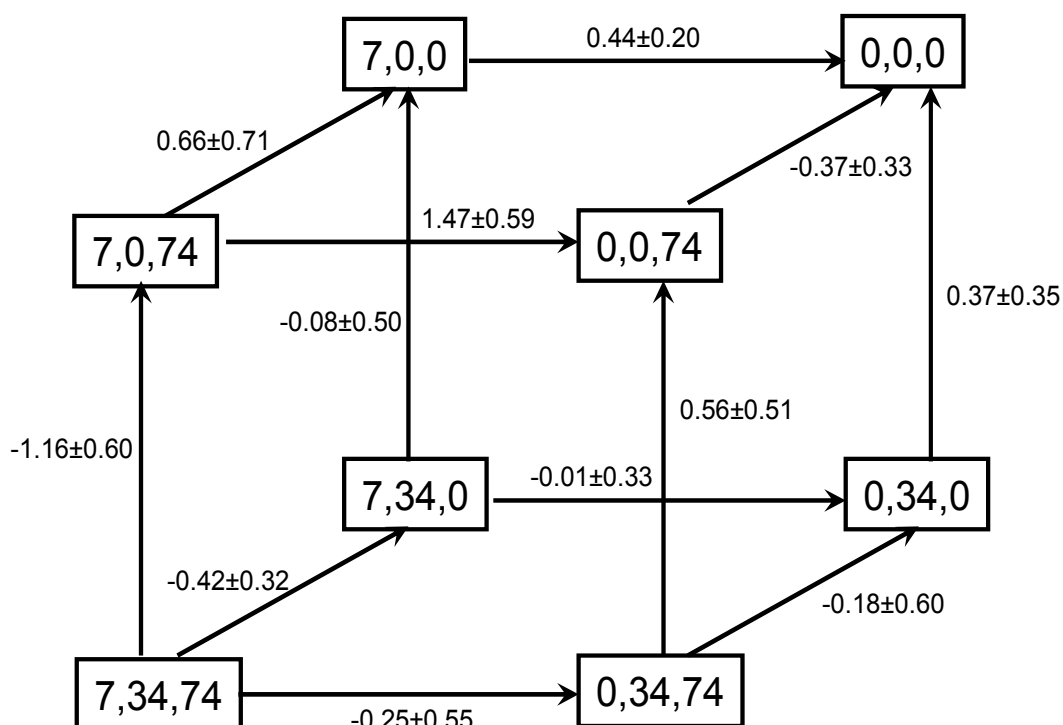


Figura 5.43. Cubo con valores de $\Delta\Delta G_{D,i}^{\ddagger}$, obtenidos a partir de las constantes cinéticas para $C^*=7.1\text{ M}$ (ver texto), situados a lo largo de las flechas, para todas las mutaciones a partir de los residuos 7, 34 y 74. Los valores están expresados en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

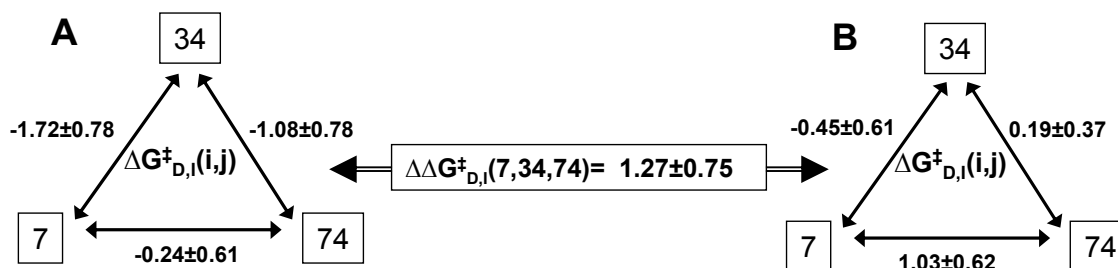


Figura 5.44. Energías de acoplamiento $\Delta G_{D,i}^{\ddagger}$, calculadas a partir de los 6 ciclos de dobles mutantes que conforman el ciclo de triple mutante, para $C^*=7.1\text{ M}$, para dos posibles casos: 1) el tercer residuo permanece igual que en WT (A); 2) el tercer residuo está mutado (B). El número en la doble flecha que conecta A y B es el efecto de la mutación en un residuo en la energía de acoplamiento de los otros dos. Los valores están expresados en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

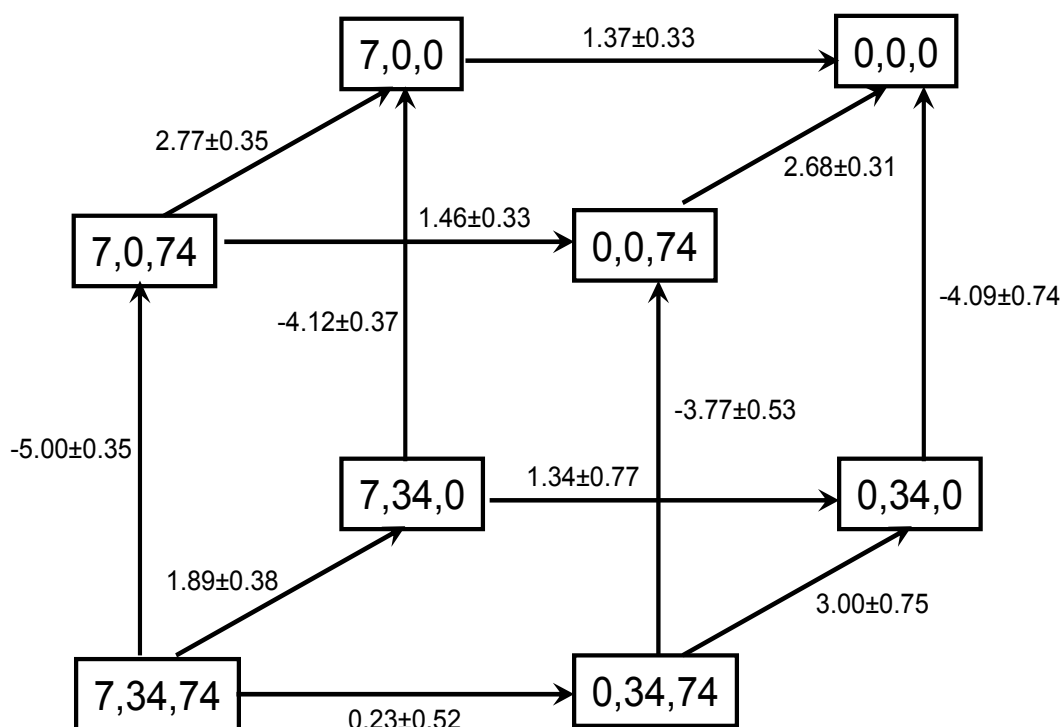


Figura 5.45. Cubo con valores de $\Delta\Delta G^{\ddagger}_N$, obtenidos a partir de las constantes cinéticas para $C^*=7.1\text{ M}$ (ver texto), situados a lo largo de las flechas, para todas las mutaciones a partir de los residuos 7, 34 y 74. Las diferentes variantes se especifican dando el número de residuo o ceros en caso de que el residuo haya sido mutado. Los valores están expresados en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

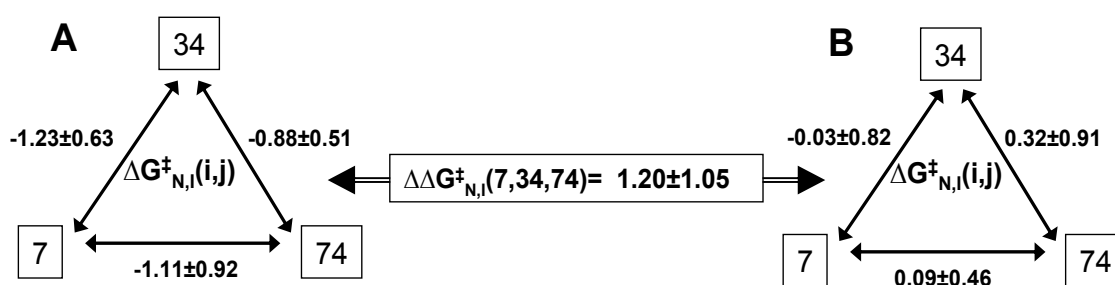


Figura 5.46. Energías de acoplamiento $\Delta G^{\ddagger}_{N,i,j}$, calculadas a partir de los 6 ciclos de dobles mutantes que conforman el ciclo de triple mutante, para $C^*=7.1\text{ M}$, para dos posibles casos: 1) el tercer residuo permanece igual que en WT (A); 2) el tercer residuo está mutado (B). El número en la doble flecha que conecta A y B es el efecto de la mutación en un residuo en la energía de acoplamiento de los otros dos. Los valores están expresados en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

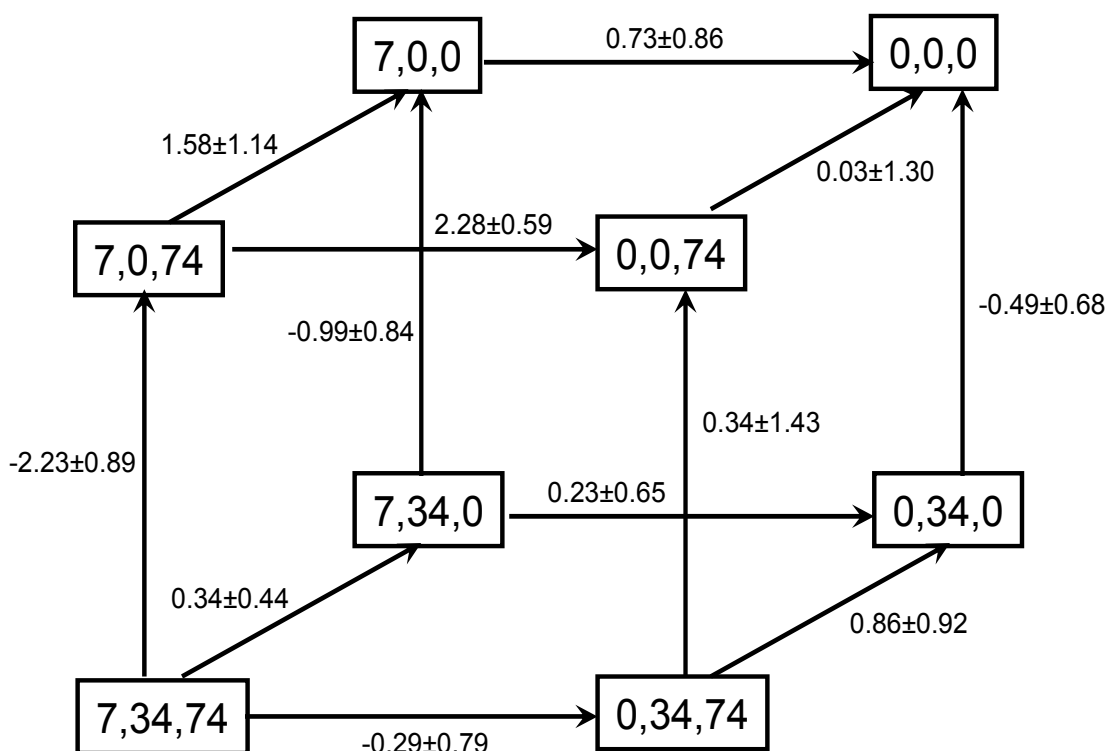


Figura 5.47. Cubo con valores de $\Delta\Delta G^{\ddagger}_D$, obtenidos a partir de las constantes cinéticas para $C^* = 8.2 \text{ M}$ (ver texto), situados a lo largo de las flechas, para todas las mutaciones a partir de los residuos 7, 34 y 74. Las diferentes variantes se especifican dando el número de residuo o ceros en caso de que el residuo haya sido mutado. Los valores están expresados en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

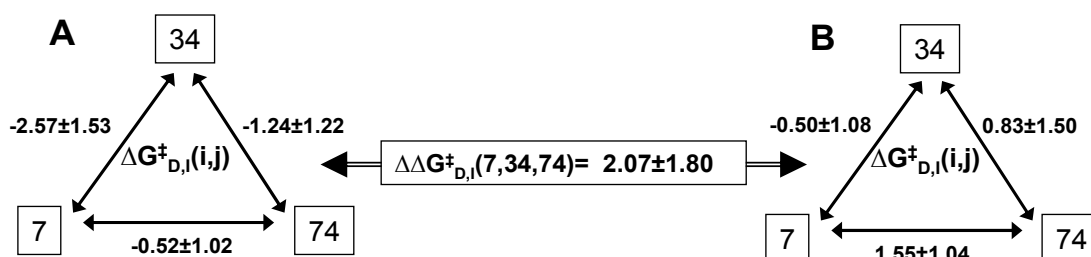


Figura 5.48. Energías de acoplamiento $\Delta G^{\ddagger}_{D,i,j}$, calculadas a partir de los 6 ciclos de dobles mutantes que conforman el ciclo de triple mutante, para $C^* = 8.2 \text{ M}$, para dos posibles casos: 1) el tercer residuo permanece igual que en WT (A); 2) el tercer residuo está mutado (B). El número en la doble flecha que conecta A y B es el efecto de la mutación en un residuo en la energía de acoplamiento de los otros dos. Los valores están expresados en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

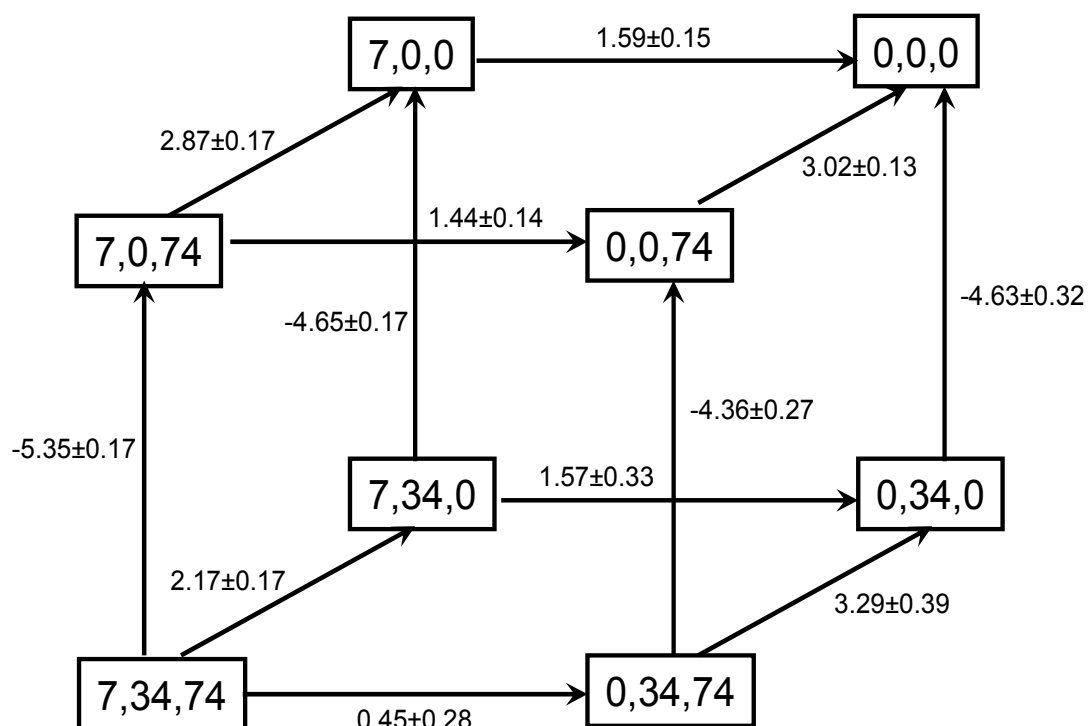


Figura 5.49. Cubo con valores de $\Delta\Delta G^{\ddagger}_N$, obtenidos a partir de las constantes cinéticas para $C^*=8.2\text{ M}$ (ver texto), situados a lo largo de las flechas, para todas las mutaciones a partir de los residuos 7, 34 y 74. Las diferentes variantes se especifican dando el número de residuo o ceros en caso de que el residuo haya sido mutado. Los valores están expresados en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

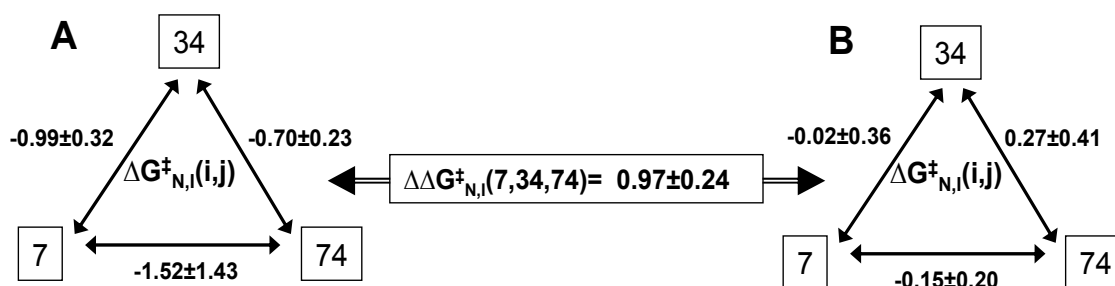


Figura 5.50. Energías de acoplamiento $\Delta G^{\ddagger}_{N,i,j}$, calculadas a partir de los 6 ciclos de dobles mutantes que conforman el ciclo de triple mutante, para $C^*=8.2\text{ M}$, para dos posibles casos: 1) el tercer residuo permanece igual que en WT (A); 2) el tercer residuo está mutado (B). El número en la doble flecha que conecta A y B es el efecto de la mutación en un residuo en la energía de acoplamiento de los otros dos. Los valores están expresados en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Empleando los valores de ΔG obtenidos mediante el ajuste de los chevrons para $C^*=7.1$ M urea, (figura 5.35), podemos hacer una representación de éstos frente a los valores determinados por calorimetría (figura 4.7), aplicando la ecuación de Gibbs-Helmholtz integrada, calculados empleando la T_m de WT, resultado mostrado en la figura 5.51.

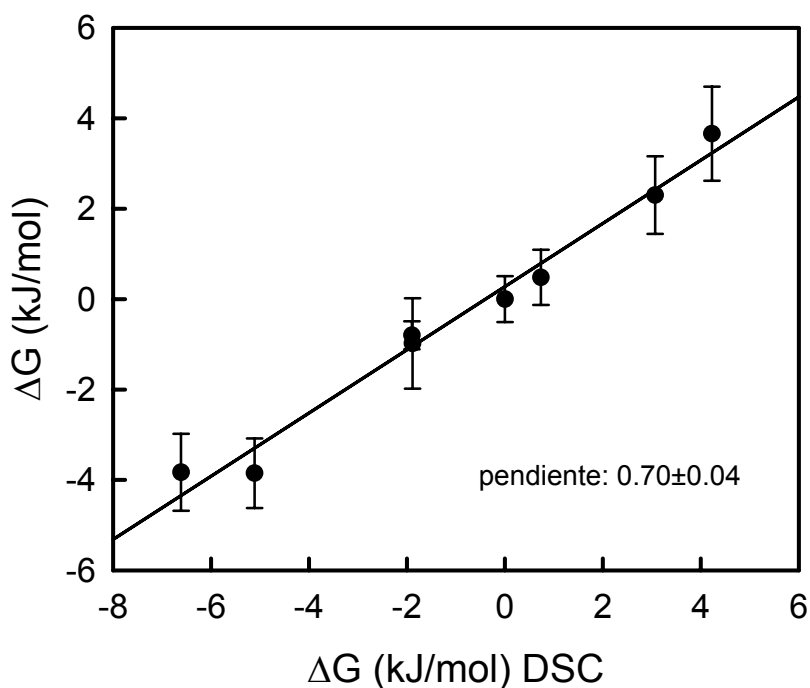


Figura 5.51 Valores de ΔG determinados a partir de los ajustes de los chevrons frente a valores de ΔG determinados por calorimetría mediante la ecuación de Gibbs-Helmholtz integrada para todas las formas mutantes a partir de los residuos 7, 34 y 74. Las barras de error se obtienen de los ajustes de los chevrons.

Como podemos ver, la pendiente de la representación de la figura 5.51 es menor de la unidad, que sería el valor esperado. No obstante, podemos hacer la misma representación pero recalculando los valores de ΔG , obtenidos de los chevrons, extrapolando linealmente a concentración cero de desnaturalizante, con lo cual la ecuación 5.13 quedaría como:

$$\Delta G = m_{1/2} \cdot C_{1/2} \quad (5.18)$$

La representación de los valores de ΔG determinados mediante extrapolación lineal, ecuación (5.18) tomando valores de la tabla 5.1 y considerando $\Delta G=0$ para WT, frente a los valores de ΔG determinados por calorimetría, da lugar a una línea recta de pendiente cercana a uno dentro del error experimental (figura 5.52). Este resultado sugiere que los valores de ΔG determinados a partir de las cinéticas de desplegamiento y replegamiento concuerdan con los valores calorimétricos.

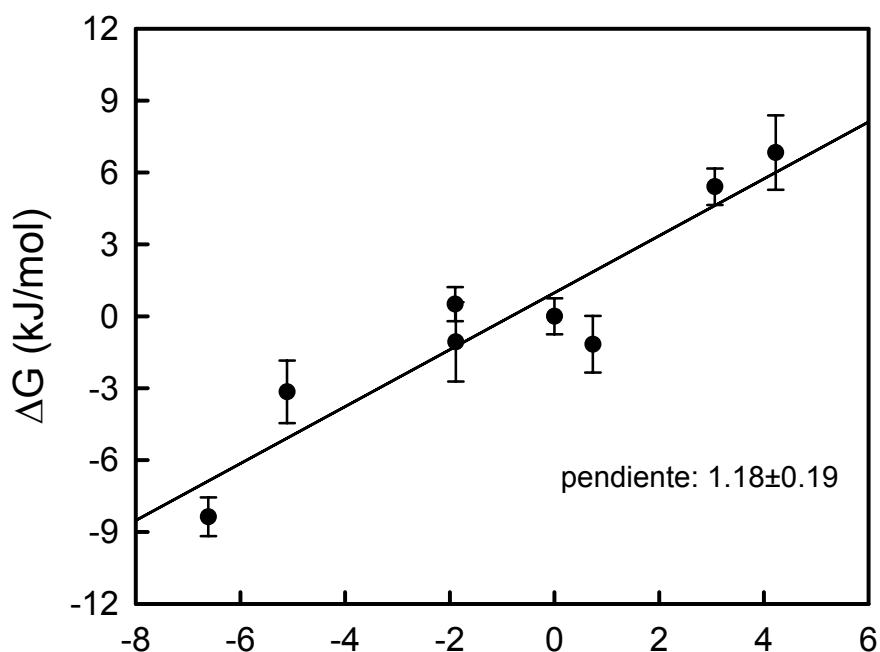


Figura 5.52 Valores de ΔG determinados a partir los ajustes de los chevrons calculados mediante extrapolación lineal, empleando la ecuación (5.18) frente a valores de ΔG determinados por calorimetría mediante la ecuación de Gibbs-Helmholtz integrada para las todas las formas mutantes a partir de los residuos 7, 34, 74.

Además, podemos realizar representaciones de $\Delta\Delta G_N^\ddagger$ (figuras 5.33, 5.35 y 5.37) y $\Delta\Delta G_D^\ddagger$ (figuras 5.39, 5.43 y 5.47) frente a valores de $\Delta\Delta G$ (figuras 5.33, 5.35 y 5.37) de equilibrio (también $\Delta\Delta G_{N-D}$). Estas representaciones se conocen como representaciones de Leffler (Leffler, 1953). De estas gráficas podemos obtener información acerca de la estructura del estado de transición. Las figuras 5.53, 5.54 y 5.55 muestran estas gráficas para las tres concentraciones estudiadas, 5.2, 7.1 y 8.2 M, respectivamente. Si comparamos estas representaciones, vemos que las pendientes crecen a medida que lo hace la concentración de urea. Para el caso de 7.1 M la pendiente de $\Delta\Delta G_N^\ddagger$ frente a $\Delta\Delta G_{N-D}$ es uno y la de $\Delta\Delta G_D^\ddagger$ frente a $\Delta\Delta G_{N-D}$ es cero, lo cual relaciona la estructura del estado de transición con la estructura del estado desnaturalizado para las mutaciones realizadas. Esto está relacionado con los valores de Φ que analizaremos en la sección siguiente.

Por otro lado, y también a partir de los datos obtenidos de los cubos, podemos realizar representaciones de las energías de acoplamiento $\Delta G_I(i,j)$ frente a valores de energías de acoplamiento determinados caloriméricamente (figura 4.8). Estas representaciones, para las tres concentraciones en estudio, se muestran en la figura 5.56. De la misma forma, podemos representar $\Delta G_{D,I}^\ddagger(i,j)$ y $\Delta G_{N,I}^\ddagger(i,j)$ frente a energías de acoplamiento determinadas por calorimetría para las tres concentraciones (ver figuras 5.57 y 5.58, respectivamente). Por último, podemos realizar gráficas de valores de $\Delta G_{N,I}^\ddagger(i,j)$ frente a $\Delta G_{D,I}^\ddagger(i,j)$ para las tres mismas concentraciones, expuestas en las figuras 5.59, 5.60 y 5.61 para 5.2, 7.1 y 8.2 M urea, respectivamente. Como podemos ver el error experimental arrastrado dificulta la interpretación de todas estas gráficas. No obstante los efectos deberían reflejarse en los valores de $\Delta m_{N-\ddagger}$ y $\Delta m_{D-\ddagger}$ y $\Delta m_{1/2}$ de la figura 5.31.

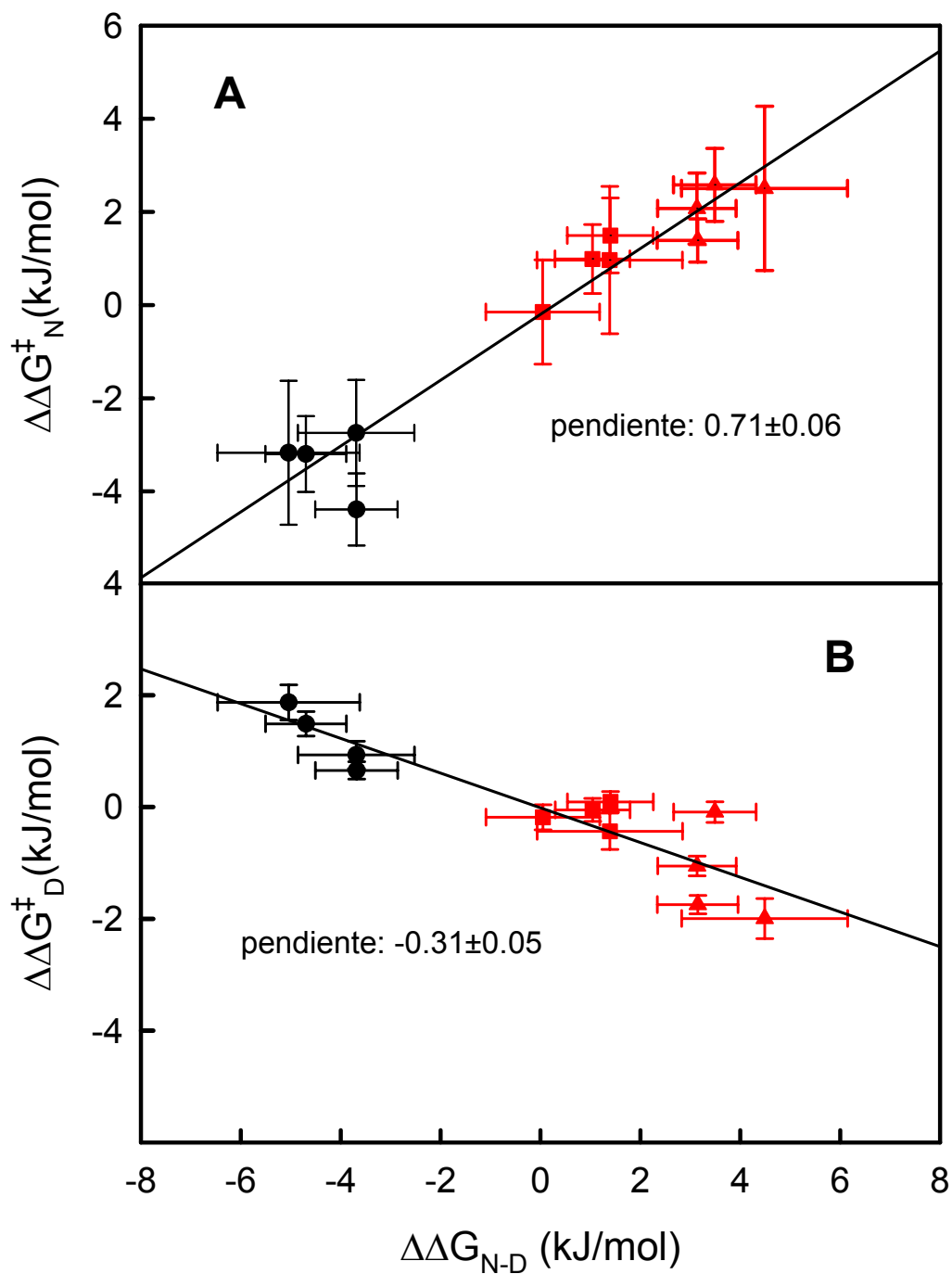


Figura 5.53. Valores de $\Delta\Delta G_N^\ddagger$ frente a $\Delta\Delta G_{N-D}$ (A) y $\Delta\Delta G_D^\ddagger$ frente a $\Delta\Delta G_{N-D}$ (B) a $C^*=5.2$ M para las mutaciones que involucran a P34H (círculos negros); L7V (cuadrados rojos) y G74S (triángulos rojos). Los símbolos representan los valores obtenidos a partir de los cubos del triple mutante (figuras 5.33, 5.39 y 5.41). Las líneas, el ajuste a un polinomio lineal.

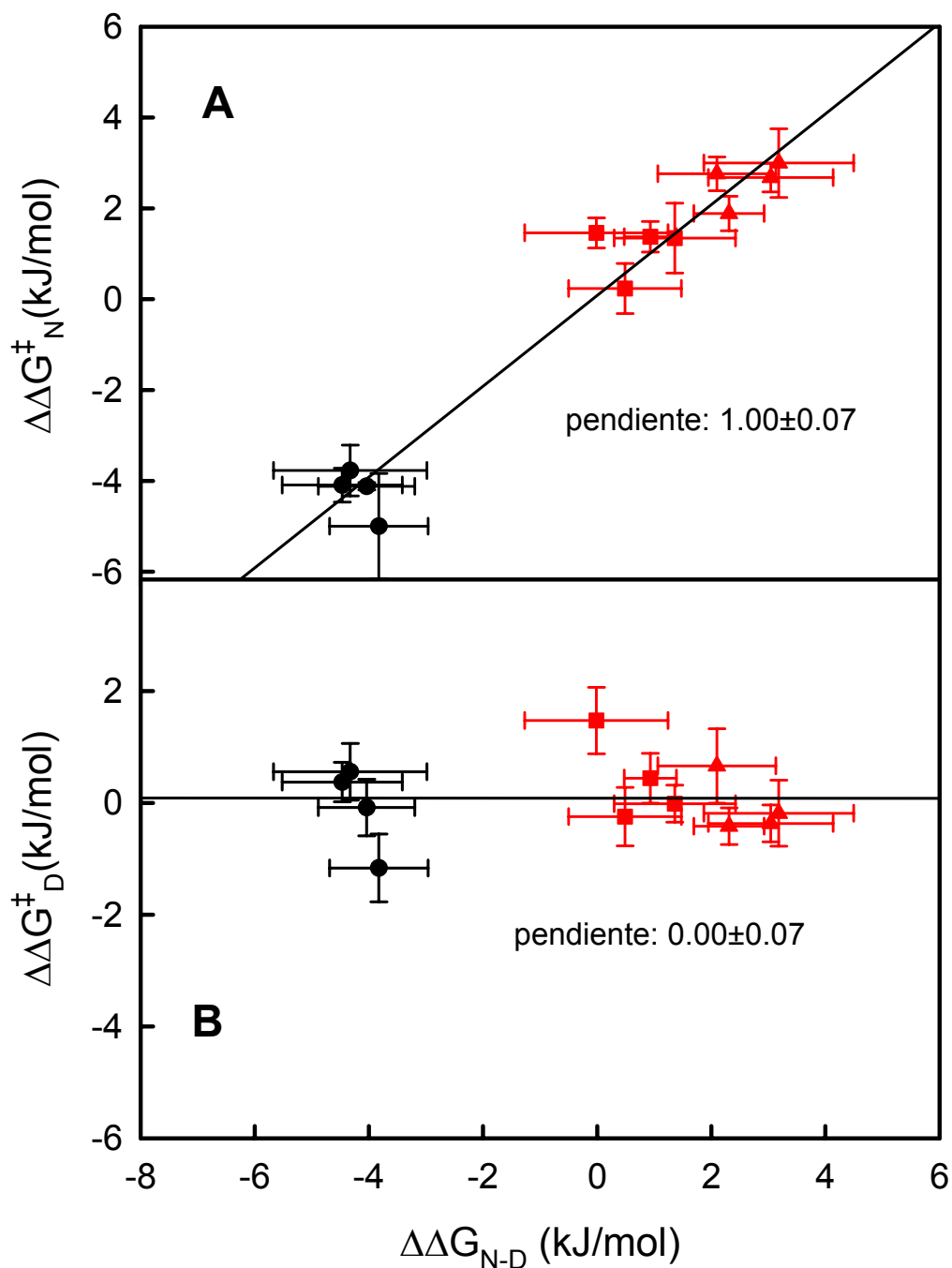


Figura 5.54. Valores de $\Delta\Delta G_N^\ddagger$ frente a $\Delta\Delta G_{N-D}$ (A) y $\Delta\Delta G_D^\ddagger$ frente a $\Delta\Delta G_{N-D}$ (B) a $C^*=7.1$ M para las mutaciones que involucran a P34H (círculos negros); L7V (cuadrados rojos) y G74S (triángulos rojos). Los símbolos representan los valores obtenidos a partir de los cubos del triple mutante (figuras 5.35, 5.43 y 5.45). Las líneas, el ajuste a un polinomio lineal.

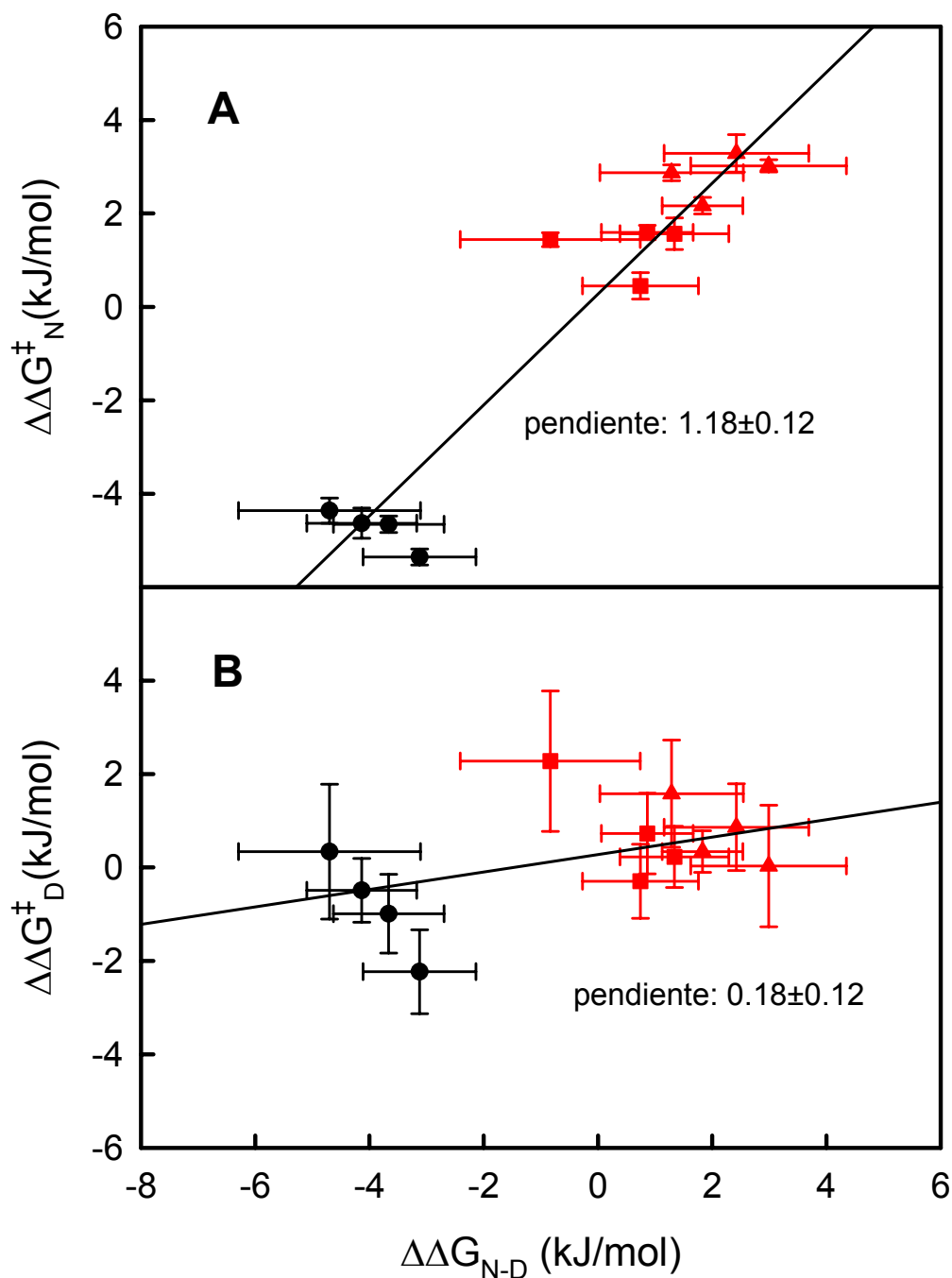


Figura 5.55. Valores de $\Delta\Delta G_N^\ddagger$ frente a $\Delta\Delta G_{N-D}$ (A) y $\Delta\Delta G_D^\ddagger$ frente a $\Delta\Delta G_{N-D}$ (B) a $C^*=8.2$ M para las mutaciones que involucran a P34H (círculos negros); L7V (cuadrados rojos) y G74S (triángulos rojos). Los símbolos representan los valores obtenidos a partir de los cubos del triple mutante (figuras 5.37, 5.47 y 5.49). Las líneas, el ajuste a un polinomio lineal.

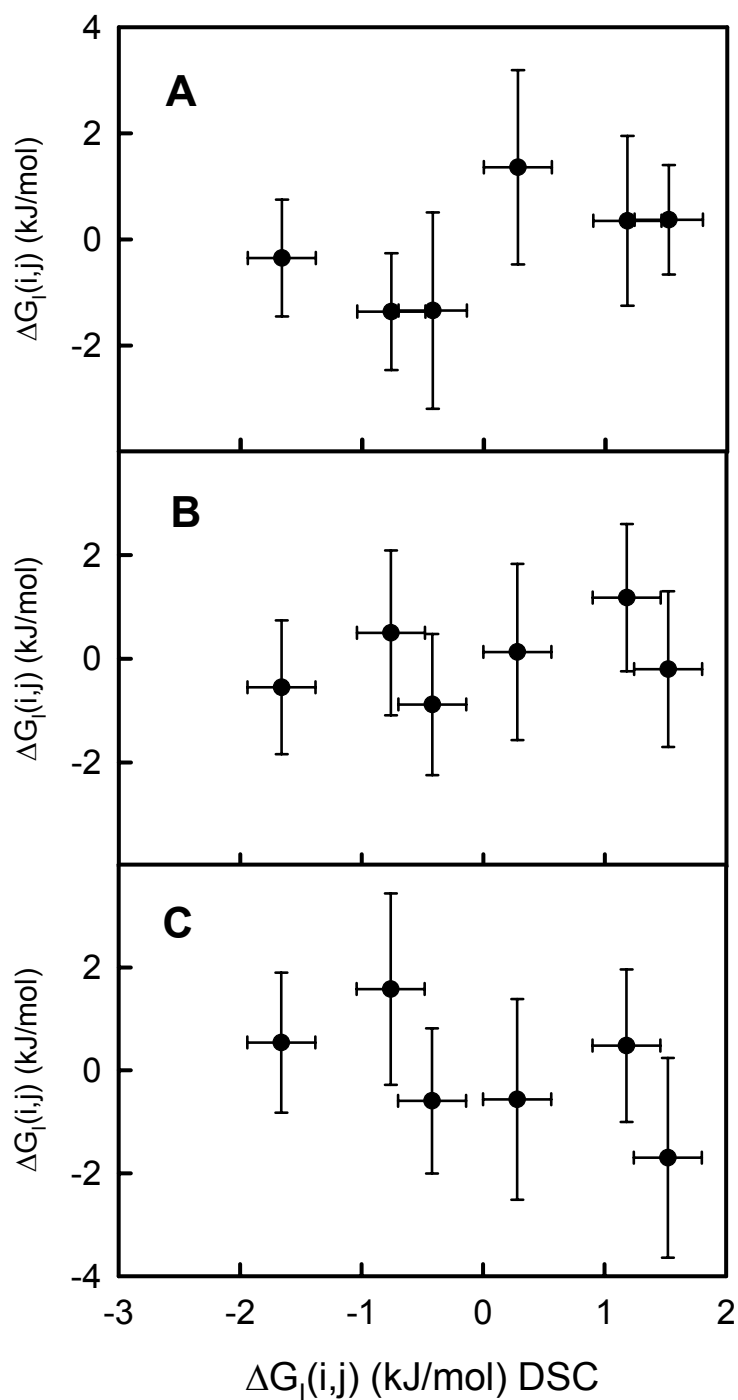


Figura 5.56. Valores de energía de acoplamiento $\Delta G_I(i,j)$, para: (A), $C^*=5.2\text{ M}$ (figura 5.34); (B), $C^*=7.1\text{ M}$ (figura 5.36) y (C), $C^*=8.2\text{ M}$ (figura 5.38), frente a valores de energías de acoplamiento determinados calorimétricamente, (figura 4.8).

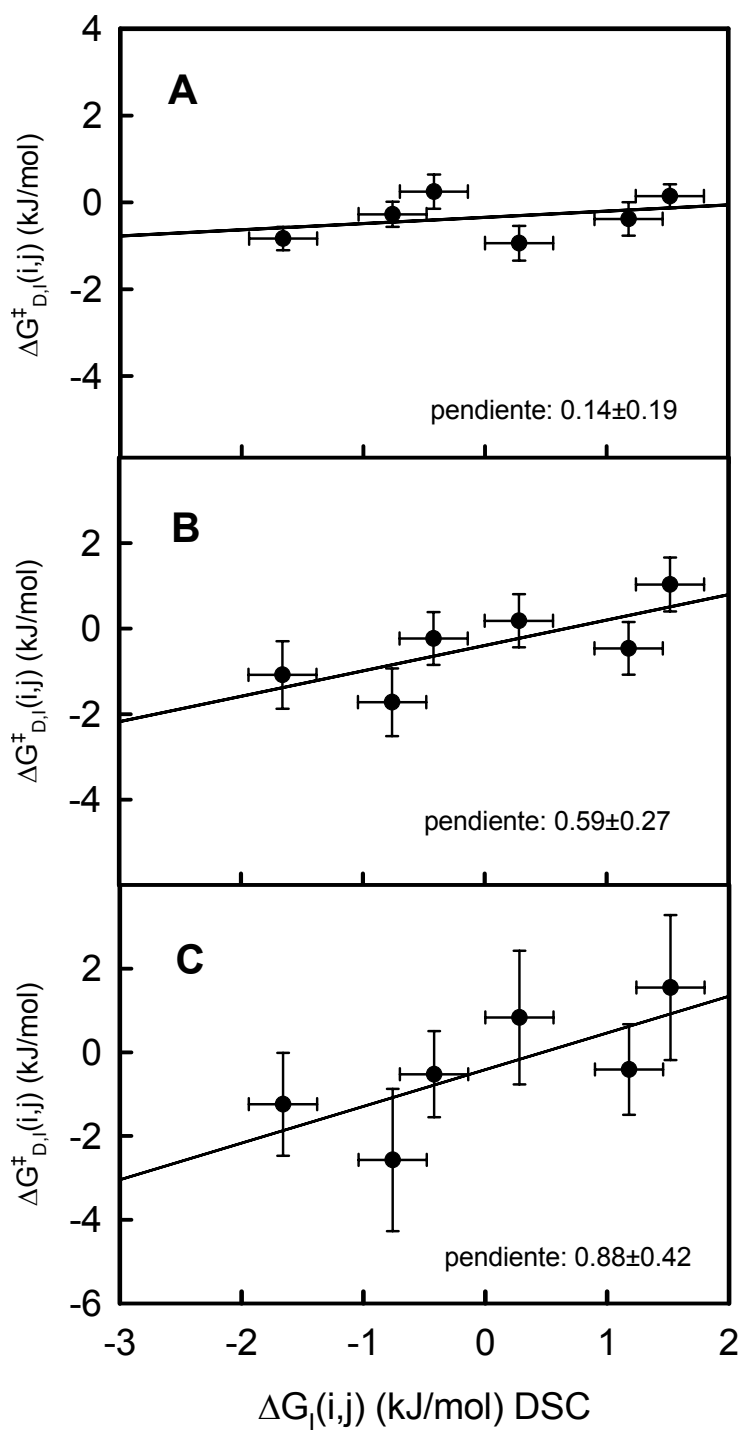


Figura 5.57. Valores de energía de acoplamiento $\Delta G_{D,i}^{\ddagger}(i,j)$, para: (A), $C^*=5.2 M$ (figura 5.40); (B), $C^*=7.1 M$ (figura 5.44) y (C), $C^*=8.2 M$ (figura 5.48), frente a valores de energías de acoplamiento determinados calorimétricamente, (figura 4.8).

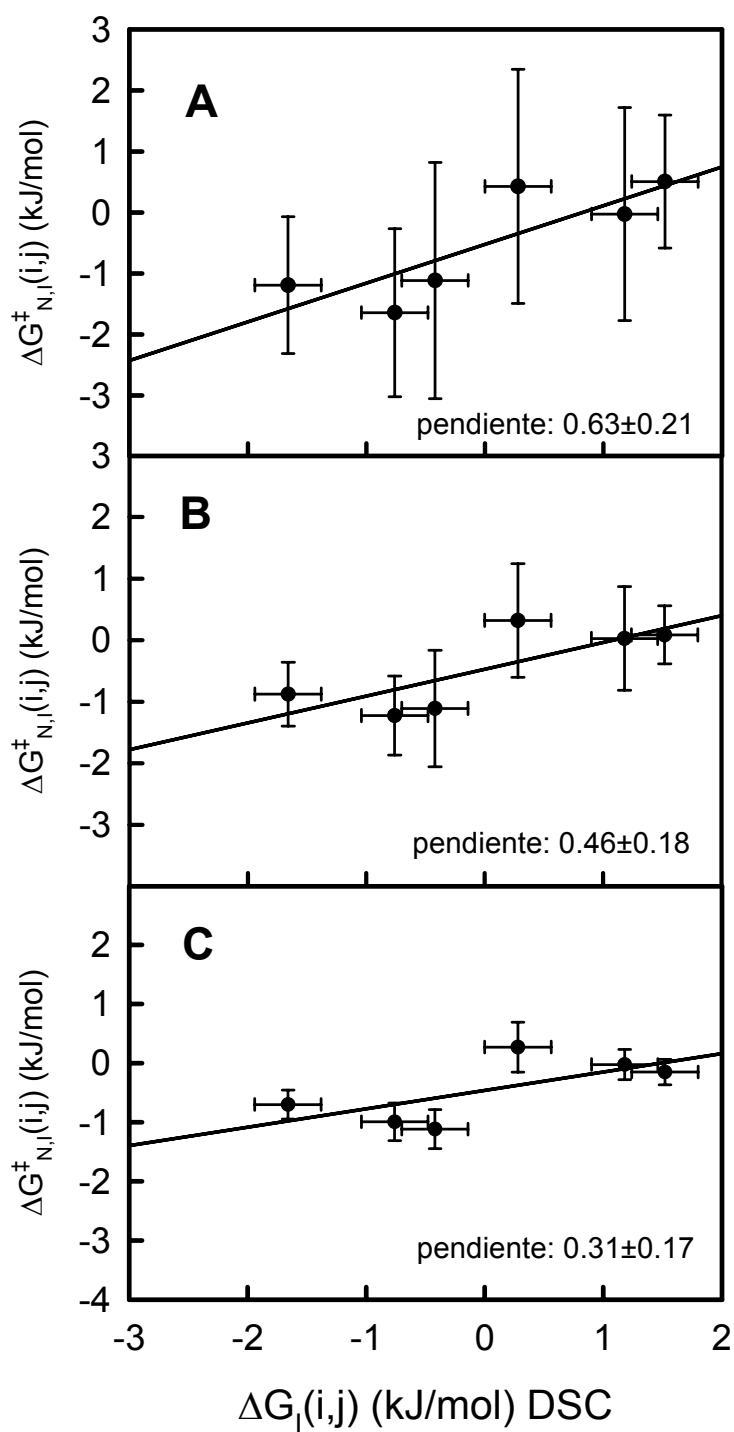


Figura 5.58. Valores de energía de acoplamiento $\Delta G_{N,i}^{\ddagger}(i,j)$, para: (A), $C^* = 5.2 M$ (figura 5.42); (B), $C^* = 7.1 M$ (figura 5.46) y (C), $C^* = 8.2 M$ (figura 5.50), frente a valores de energías de acoplamiento determinados calorimétricamente, (figura 4.8).

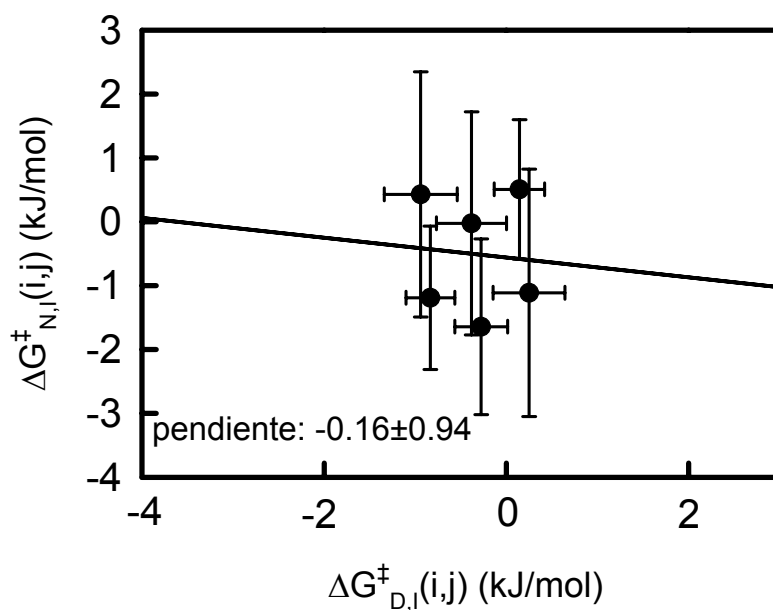


Figura 5.59. Valores de energía de acoplamiento $\Delta G_{N,i}^{\ddagger}(i,j)$, (figura 5.42) frente a energía de acoplamiento $\Delta G_{D,i}^{\ddagger}(i,j)$, (figura 5.40), para $C^* = 5.2 M$.

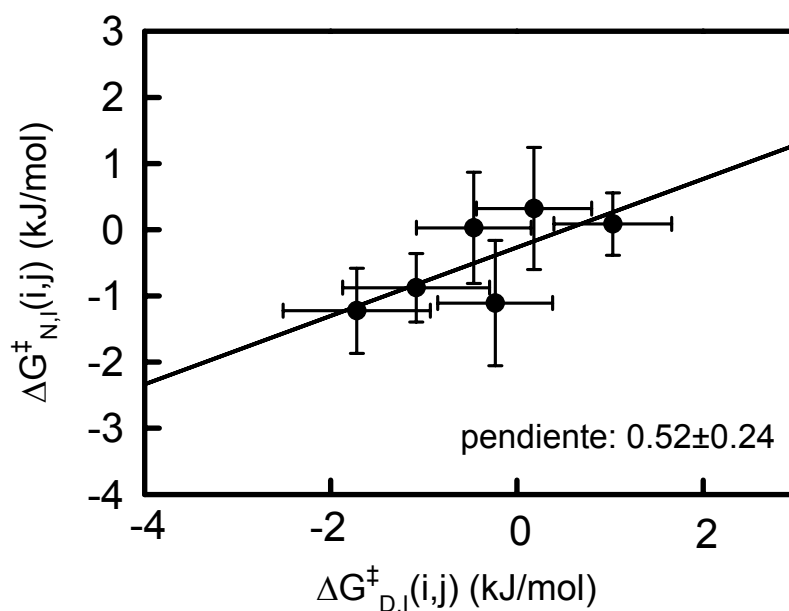


Figura 5.60. Valores de energía de acoplamiento $\Delta G_{N,i}^{\ddagger}(i,j)$, (figura 5.46) frente a energía de acoplamiento $\Delta G_{D,i}^{\ddagger}(i,j)$, (figura 5.44), para $C^* = 7.1 M$.

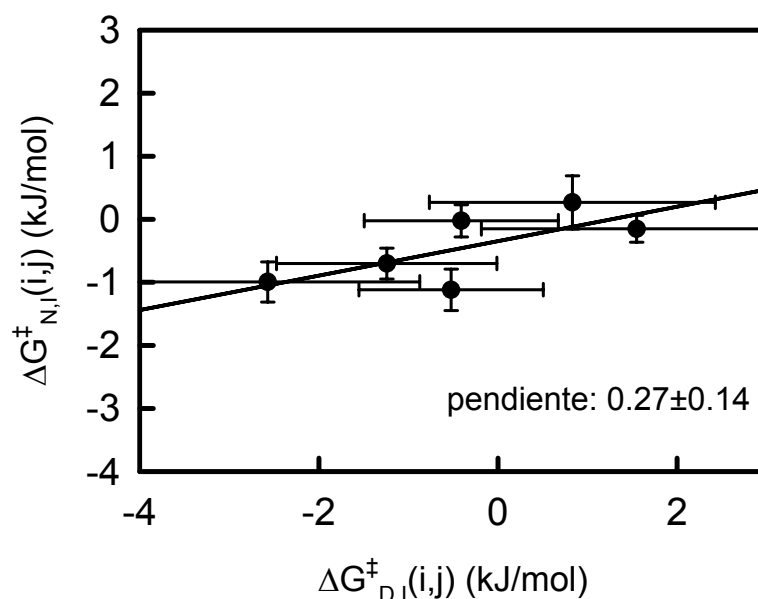


Figura 5.61. Valores de energía de acoplamiento $\Delta G_{N,I}^{\ddagger}(i,j)$, (figura 5.50) frente a energía de acoplamiento $\Delta G_{D,I}^{\ddagger}(i,j)$, (figura 5.48), para $C^*=8.2 M$.

5.5 Análisis de los valores de Φ .

El cociente entre $\Delta\Delta G^{\ddagger}$ y $\Delta\Delta G$ se conoce como parámetro Φ (Matouschek et al., 1989) y puede ser empleado para determinar cambios estructurales, producidos por mutaciones, en el estado de transición en procesos de desplegamiento y replegamiento de proteínas. Este parámetro se puede determinar tanto para el proceso de replegamiento como de desplegamiento. No obstante, es más frecuentemente utilizado el valor de Φ para procesos cinéticos de desplegamiento ya que los procesos de replegamiento son generalmente más complejos debido a la posible existencia de estructura residual en el estado desnaturalizado y esto dificulta su interpretación.

Existen dos valores extremos de Φ . Un valor de $\Phi=0$ implica que la estructura en el residuo mutado está en el estado de transición en un ambiente similar en el que se encuentra en el estado nativo. Por el contrario, un valor de $\Phi=1$ muestra que la estructura en el residuo mutado está en el estado de transición en un ambiente similar en el que se encuentra en el estado desnaturalizado. No obstante, con frecuencia se obtienen valores fraccionarios de Φ , que generalmente se asocian a la formación parcial de enlaces no covalentes o la mezcla de estados.

En nuestro caso podemos tomar los valores de $\Delta\Delta G_N^\ddagger$ y $\Delta\Delta G_{N-D}$ y calcular los valores de Φ . Estos datos se muestran en las tablas 5.4, 5.5 y 5.6 para las concentraciones en estudio, 5.2, 7.1 y 8.2 M urea, respectivamente.

Si nos fijamos en los valores de Φ obtenidos de valores de $\Delta\Delta G_N^\ddagger$ y $\Delta\Delta G_{N-D}$ calculados tomando $C^*=7.1$ M urea, podemos ver que la mayoría de los valores de Φ se aproximan a 1 dentro del error experimental. No obstante existen valores que se alejan notablemente de los valores clásicos. Esto sucede cuando el valor de $\Delta\Delta G_{N-D}$ se acerca a cero con lo cual además, el error diverge a infinito.

Mutación	Φ (5.2 M urea)
WT→L7V	-3.00±512
WT →P34H	0.87 ± 0.17
WT →G74S	0.44 ± 0.19
G74S →L7V/G74S	0.69 ± 1.54
P34H →L7V/P34H	1.06 ± 1.04
L7V →L7V/P34H	0.74 ± 0.32
L7V →L7V/G74S	0.56 ± 0.29
P34H →P34H/G74S	0.73 ± 0.24
G74S →P34H/G74S	0.68 ± 0.14
L7V/P34H →L7V/P34H/G74S	0.66 ± 0.24
L7V/G74S →L7V/P34H/G74S	0.63 ± 0.24
P34H/G74S →L7V/P34H/G74S	0.95 ±1.20

Tabla 5.4 Valores de Φ (cociente $\Delta\Delta G_N^\ddagger / \Delta\Delta G_{N-D}$) para las mutaciones indicadas, obtenidos a partir de los valores de $\Delta\Delta G_N^\ddagger$ y $\Delta\Delta G_{N-D}$ de las figuras 5.41 y 5.43, respectivamente, tomando $C^*=5.2$ M urea

Mutación	Φ (7.1 M urea)
WT→L7V	0.48±2.95
WT →P34H	1.30±0.31
WT →G74S	0.47±0.23
G74S →L7V/G74S	0.98±1.26
P34H →L7V/P34H	-73±5387
L7V →L7V/P34H	0.87±0.29
L7V →L7V/G74S	0.94±0.46
P34H →P34H/G74S	1.32±0.73
G74S →P34H/G74S	1.02±0.26
L7V/P34H →L7V/P34H/G74S	0.88±0.34
L7V/G74S →L7V/P34H/G74S	0.91±0.25
P34H/G74S →L7V/P34H/G74S	1.45±1.66

Tabla 5.5 Valores de Φ (cociente $\Delta\Delta G_N^\ddagger/\Delta\Delta G_{N-D}$) para las mutaciones indicadas, obtenidos a partir de los valores de $\Delta\Delta G_N^\ddagger$ y $\Delta\Delta G_{N-D}$ de las figuras 5.45 y 5.35, respectivamente, tomando $C^*=7.1$ M urea

Mutación	Φ (8.2 M urea)
WT→L7V	0.60±1.32
WT →P34H	1.71±0.55
WT →G74S	1.18±0.42
G74S →L7V/G74S	1.13±0.99
P34H →L7V/P34H	-1.73±3.48
L7V →L7V/P34H	0.92±0.32
L7V →L7V/G74S	1.35±0.77
P34H →P34H/G74S	2.22±2.25
G74S →P34H/G74S	1.27±0.34
L7V/P34H →L7V/P34H/G74S	1.01±0.51
L7V/G74S →L7V/P34H/G74S	1.11±0.32
P34H/G74S →L7V/P34H/G74S	1.84±2.65

Tabla 5.6 Valores de Φ (cociente $\Delta\Delta G_N^\ddagger / \Delta\Delta G_{N-D}$) para las mutaciones indicadas, obtenidos a partir de los valores de $\Delta\Delta G_N^\ddagger$ y $\Delta\Delta G_{N-D}$ de las figuras 5.49 y 5.37, respectivamente, tomando $C^*=8.2$ M urea

5.6 Conclusiones

Los experimentos de desplegamiento y replegamiento seguidos por medidas de fluorescencia, ofrecen información acerca de cambios estructurales producidos por las mutaciones realizadas tomando como base los alineamientos de secuencias. Como se puede observar en la figura 5.31 estos cambios están producidos tanto en el estado de transición como en el estado desnaturalizado, asumiendo que no se producen cambios en el estado nativo. La observación detenida de la figura 5.31 sugiere que los datos experimentales se agrupan, fundamentalmente en dos conjuntos, uno el formado por valores de $\Delta m_{N-\ddagger}$ positivos y valores de $\Delta m_{1/2}$ negativos, y otro formado por valores de $\Delta m_{N-\ddagger}$ negativos y valores de $\Delta m_{1/2}$ positivos. Si se tiene en cuenta que los valores de m se pueden relacionar con cambios estructurales, estos resultados sugieren que los efectos estructurales producidos por las mutaciones se transmiten al estado de transición y son opuestos en éste y en el estado desnaturalizado, es decir, cuando los valores de $\Delta m_{1/2}$ aumentan, los valores de $\Delta m_{N-\ddagger}$ disminuyen y viceversa. Realmente se trata del mismo efecto, y esto se puede entender si consideramos que el estado de transición representa un mínimo de energía frente a exposición al disolvente y el estado desnaturalizado un máximo.

Además, el intervalo en el que varía $\Delta m_{1/2}$ es amplio, es decir, estos valores dependen de la forma de partida en la que se realiza una mutación, lo cual sugiere un acoplamiento en los valores de $m_{1/2}$. No sucede lo mismo en el caso de $\Delta m_{N-\ddagger}$, que varía en un intervalo muy pequeño, para cada conjunto de mutaciones, en comparación con $\Delta m_{1/2}$, lo cual puede ser atribuido a que los acoplamientos no se transmiten al estado de transición. Asimismo, el hecho de que el rango para los valores de $\Delta m_{D-\ddagger}$ sea amplio, y

que se modifique para cada conjunto de mutaciones, sugiere que las mutaciones están afectando a los procesos de replegamiento y que existe un acoplamiento en el estado desnaturalizado. Esto supondría que la Naturaleza podría estar diseñando los estados desnaturalizados y que esto puede estar reflejado en el alineamiento de secuencias. El hecho de que la Naturaleza pueda estar diseñando los estados desnaturalizados ya ha sido propuesto (Robic et al., 2003) y supondría que los estados desnaturalizados pueden estar jugando un papel importante en los procesos biológicos y moleculares.

Por otro lado, y a la vista de la figura 5.32 existe una correlación entre los valores del valor absoluto de $\Delta m_{1/2}$ y el menor valor de $m_{1/2}$ implicado en cada una de las mutaciones, y se observa que los valores de $\Delta m_{1/2}$ llega a cero a la vez que los valores de $m_{1/2}$ llegan a un máximo. No obstante, no podemos determinar si éste es un efecto relacionado con el hecho de que estas mutaciones estén sugeridas por los alineamientos de secuencias o es un efecto general que puede darse realizando un conjunto de mutaciones relacionadas o no.

6. Análisis de la relación entre los acoplamientos a larga distancia obtenidos a partir de los alineamientos de secuencias y la estructura de proteínas

6.1 Introducción

Sólo la mitad de las secuencias en genomas conocidos son homólogas de proteínas de estructura conocida (Chotia et al., 2003). La predicción de la estructura a partir de la secuencia es uno de los grandes retos de la Biología Estructural. Debido al rápido crecimiento del número de secuencias, el desarrollo de procedimientos que permitan la derivación de características estructurales a partir de los alineamientos de secuencias puede tener un gran impacto en la predicción de estructuras. De hecho, la posibilidad de obtener contactos terciarios entre residuos a partir del análisis de mutaciones correlacionadas en el alineamiento de secuencias ha sido sugerida y estudiada (Gobel et al., 1994; Shindyalov et al., 1994; Ortiz et al., 1998 y 1999; Larson et al., 2000; Fariselli et al., 2001; Fodor and Aldrich, 2004). Idealmente, lo deseable sería poder obtener mapas de contacto a partir del análisis del alineamiento de secuencias, ya que partiendo de un gran número de contactos entre residuos se podría predecir una estructura, de manera similar al cálculo de estructuras 3D en estudios de resonancia magnética nuclear (Aszodi et al., 1995). Varios estudios (Ortiz et al., 1998 y 1999) han demostrado que es factible el empleo de restricciones derivadas del alineamiento de secuencias en la predicción de estructuras *ab initio*. Por otra parte, resultados obtenidos en algunos estudios recientes son algo menos alentadores. Así un estudio del análisis de covarianza del alineamiento de secuencia del dominio SH3 (Larson et al., 2000), concluyó que este análisis de covarianza tiene una utilidad limitada en la predicción de estructura terciaria, y en un reciente estudio empleando redes neuronales y realizando un gran número de pruebas, se obtuvo una precisión del

20% en la asignación de contactos, mientras que se requiere al menos una exactitud del 50% para la determinación de la estructura 3D.

Uno de los factores principales que limita la obtención de contactos entre residuos a partir del alineamiento de secuencias, es la existencia de interacciones a larga distancia, que como se vio anteriormente podría darse tanto en el estado nativo como desnaturalizado. Este aspecto se trató detenidamente en la sección 4.

En esta sección vamos a estudiar el impacto de las interacciones a larga distancia en la relación entre la estructura de proteínas y el alineamiento de secuencias. Veremos como un análisis simple de covarianza del alineamiento de secuencias, junto con los datos de estabilidad expuestos en la sección 4, corrobora que, al menos en el caso de tiorredoxina y muy probablemente en muchas otras proteínas, la relación entre la estructura y el alineamiento de secuencias puede estar significativamente determinada por acoplamiento a larga distancia. Asimismo, proponemos un procedimiento para describir la relación estructura-alineamiento, el cual, está basado en la dependencia del número de residuos acoplados por encima de un umbral de covarianza dado con la distancia entre residuos. El análisis de 24 proteínas obtenidas de la base de datos CATH (Orengo et al., 1997) usando este procedimiento, produce resultados consistentes con un significativo papel del acoplamiento a larga distancia que sugiere que nuestra descripción estadística puede ser una simple y eficiente herramienta para estudiar la distribución de distancias de mutaciones correlacionadas y las diferencias en las características estructurales reflejadas en el alineamiento de secuencias.

6.2 Descripción estadística de la relación entre estructura y alineamiento de secuencias: aplicación a tiorredoxina.

Para estudiar la relación entre la estructura de proteínas y el alineamiento de secuencias vamos a realizar un análisis basado en la siguiente función:

$$\rho(r, \sigma^*) = \frac{N(r \pm \Delta r)}{2 \cdot \Delta r} \{P(|\sigma| \geq \sigma^* | r \pm \Delta r) - P(|\sigma| \geq \sigma^*)\} \quad (6.1)$$

donde $N(r \pm \Delta r)$ es el número de distancias entre residuos (entre carbonos- α) en el rango $\{r - \Delta r, r + \Delta r\}$; $P(|\sigma| \geq \sigma^*)$ es la probabilidad de encontrar parejas de residuos con valores absolutos de covarianza iguales o superiores que un valor umbral dado (σ^*) y $P(|\sigma| \geq \sigma^*, r \pm \Delta r)$ es la misma probabilidad pero condicionada al hecho de que las distancias entre residuos estén en el intervalo $r \pm r\Delta$. Estas probabilidades se calculan como:

$$P(|\sigma| \geq \sigma^*) = \frac{N(|\sigma| \geq \sigma^*)}{N} \quad (6.2)$$

$$P(|\sigma| \geq \sigma^* | r \pm \Delta r) = \frac{N(|\sigma| \geq \sigma^*, r \pm \Delta r)}{N(r \pm \Delta r)} \quad (6.3)$$

donde N es el número de parejas de residuos, que para el caso de tiorredoxina con 108 aminoácidos es 5778; $N(|\sigma| \geq \sigma^*)$ es el número de parejas de residuos con $|\sigma|$ igual o

mayor que el valor umbral (σ^*) y $N(|\sigma| \geq \sigma^*, r \pm \Delta r)$ es el número de parejas para las cuales simultáneamente $|\sigma| \geq \sigma^*$ y la distancia entre residuos está en el intervalo $\{r - \Delta r, r + \Delta r\}$.

La diferencia entre las dos probabilidades multiplicada por $N(r \pm \Delta r)$ da el número de parejas con $|\sigma| \geq \sigma^*$ y en el rango $\{r - \Delta r, r + \Delta r\}$ que es mayor del número esperado si la probabilidad de encontrar parejas con $|\sigma| \geq \sigma^*$ no depende del rango de distancia considerado. Por ejemplo, el número de parejas de residuos con valores absolutos de covarianza mayores que el umbral de $\sigma^* = 0.01$ es 3331 (este número se obtiene a partir del cálculo realizado en la sección 4.2 mediante la ecuación (4.1)) y, por consiguiente, $P(|\sigma| \geq 0.01)$ es 0.576. El número de parejas de residuos para los cuales la distancia entre residuos está dentro del intervalo $12 \pm 0.5 \text{ \AA}$ es 290; si la probabilidad de encontrar parejas con $|\sigma| \geq 0.01$ no depende de la distancia entre residuos, el valor de probabilidad de 0.576 se aplicaría al intervalo $12 \pm 0.5 \text{ \AA}$ y el número de parejas con $|\sigma| \geq 0.01$ dentro de ese intervalo sería $0.576 \cdot 290 \approx 167$. De cualquier manera, el número real es significativamente mayor, 190, indicando un exceso de parejas sobre el umbral de 23. Este es el mismo resultado que sería obtenido por sustracción de las dos probabilidades de las ecuaciones (6.2) y (6.3) y multiplicando por el número total de parejas entre el intervalo de distancias. Esto es, $P(|\sigma| \geq 0.01, 12 \pm 0.5) = 190/290 = 0.655$, $P(|\sigma| \geq 0.01) = 3331/5778 = 0.576$, $N(12 \pm 0.5 \text{ \AA}) = 290$ y $290 \cdot (0.655 - 0.576) \approx 23$. Es importante destacar que si bien en este ejemplo particular el exceso es un número positivo, puede en general tener cualquier signo. La indeterminación asociada al cálculo del número de parejas de residuos exceso puede ser estimada asumiendo la distribución binomial para $N(|\sigma| \geq \sigma^*)$ y $N(|\sigma| \geq \sigma^*, r \pm \Delta r)$ y usando procedimientos

estándar de cálculo de propagación de errores. Para el ejemplo dado aquí, el resultado incluye la incertidumbre asociada 23 ± 8 .

En la ecuación (6.1) el número exceso está dividido por el tamaño del intervalo de distancia ($2 \cdot \Delta r$) para acercarse a un número de exceso de parejas por Å (densidad). Rigurosamente en la ecuación (6.1) esta densidad vendría dada para el límite $\Delta r \rightarrow 0$. En la práctica, los errores estimados para ρ llegan a ser elevados para valores pequeños de Δr . Los cálculos presentados aquí emplean valores de Δr de 5 Å y 0.5 Å, los cuales ofrecen un aceptable compromiso entre la resolución y el error asociado, si bien $\Delta r = 5$ Å origina perfiles de ρ frente a r más suavizados.

El resultado del cálculo de ρ depende del valor elegido de σ^* . Si $\sigma^* = 0$, las dos posibilidades (ecuaciones (6.2) y (6.3)) se hacen uno y el valor de ρ es cero para todas las distancias. Si σ^* es elevado, habrá pocas parejas con $|\sigma| \geq \sigma^*$ y los valores de ρ serán necesariamente pequeños. Se podrían esperar valores de ρ elevados para muchas σ^* intermedias. Para determinar el valor de σ^* óptimo (σ_{opt}), se calcula la integral de los valores absolutos de ρ :

$$\eta(\sigma^*) = \int |\rho(r, \sigma^*)| \cdot dr \quad (6.4)$$

y tomamos como σ_{opt} el valor de σ^* que maximiza $\eta(\sigma^*)$.

Desde un punto de vista práctico, para los cálculos es conveniente definir el valor de σ^* en términos de la fracción de parejas de residuos por debajo del umbral, f^* :

$$f^* = \frac{N(|\sigma| < \sigma^*)}{N} \quad (6.5)$$

El valor de f^* especifica σ^* . La figura 6.1 muestra una representación de η frente a f^* para tiorredoxina con $\Delta r=5\text{\AA}$. Como puede verse claramente en esta figura, existe un máximo para $f^*=0.44$ (correspondiente a $\sigma_{\text{opt}} = 1.03 \cdot 10^{-2}$) y $\eta=137.5$, lo cual indica un número total de exceso de parejas de residuos del orden de cien. Esto es un resultado estadístico, por tanto no podemos asignar ese exceso a unas parejas específicas.

La representación de ρ frente a r para este valor de σ_{opt} , figura 6.2 A, indica que ρ tiende a valores positivos por debajo de 15\AA y negativos por encima de esa distancia entre residuos. Esto es, los valores pequeños de distancia entre residuos están favorecidos frente a los grandes para altos valores de covarianza. El valor máximo de ρ se sitúa para una distancia de 10\AA , claramente por encima de la distancia de contacto.

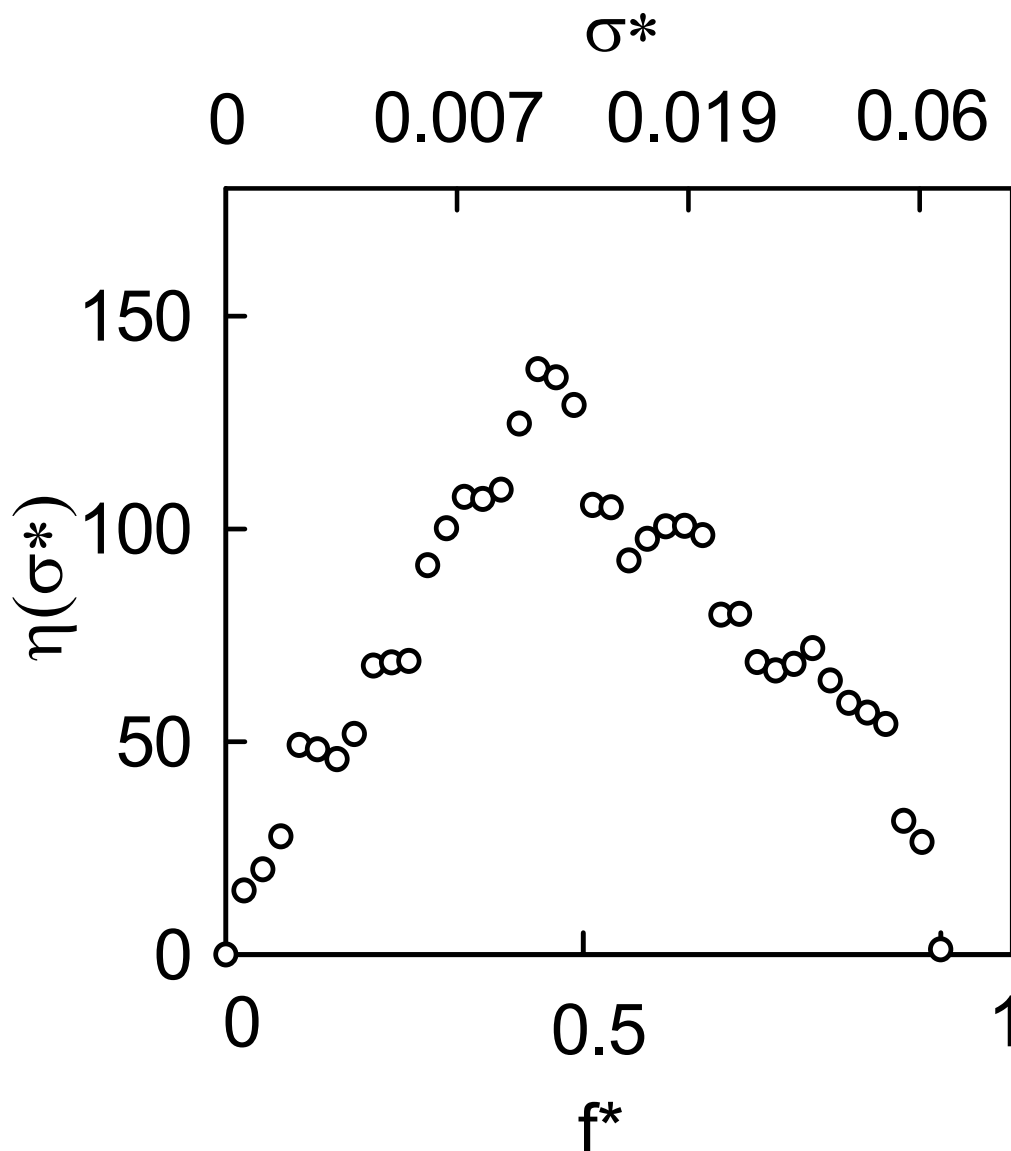


Figura 6.1. Representación de $\eta(\sigma^*)$ frente a f^* para tioredoxina (2trx). El máximo del pico da el σ^* usado para el cálculo de ρ .

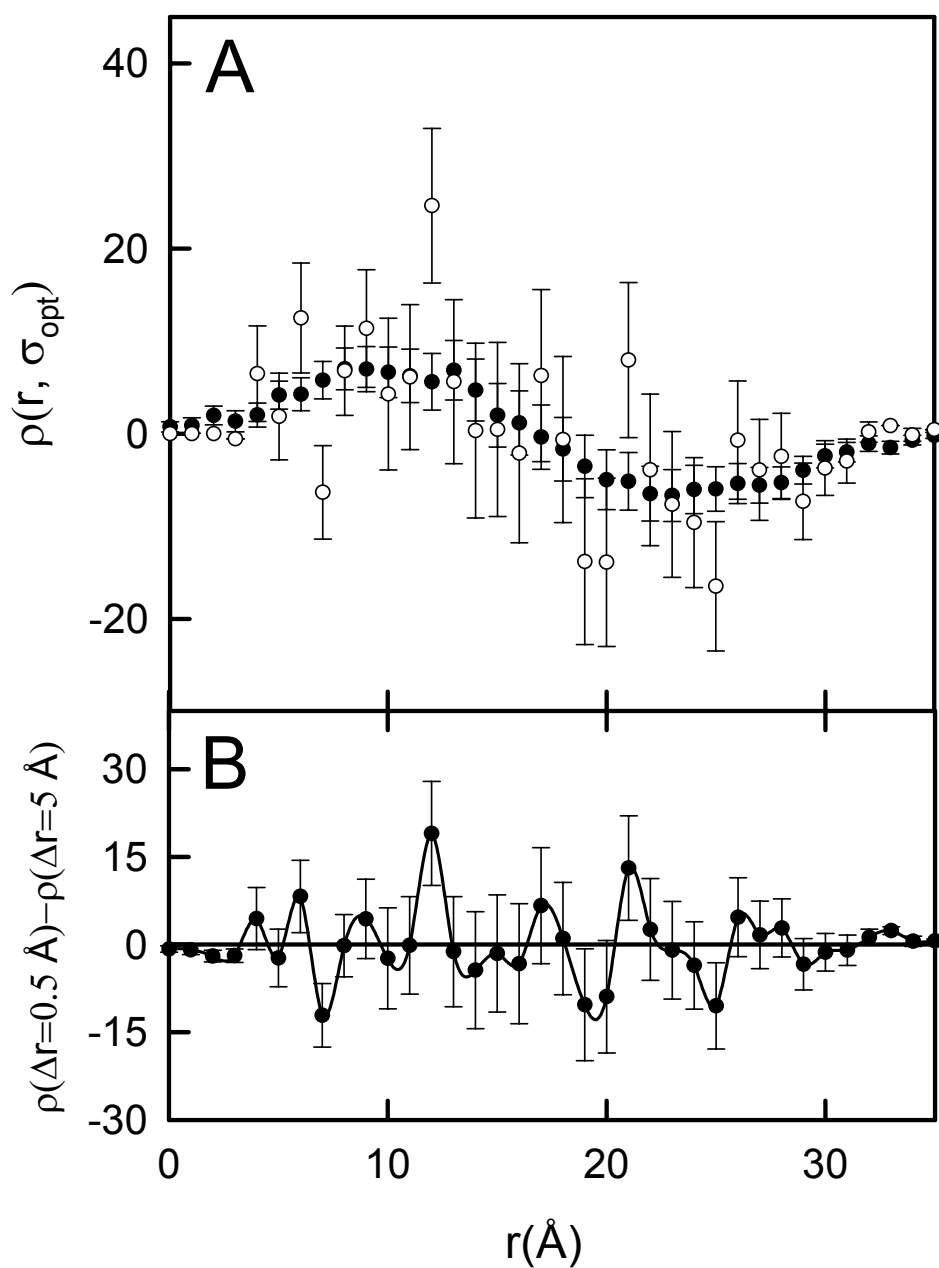


Figura 6.2. Análisis estadístico de la relación estructura-alineamiento para tiorredoxina basado en la función ρ . A) Representación de valores de ρ frente a distancia entre residuos (entre carbonos- α). Los símbolos se refieren al intervalo de distancia usado en el cálculo, símbolos rellenos para $\Delta r = 5 \text{\AA}$ y símbolos huecos para $\Delta r = 0.5 \text{\AA}$. B) Representación de la diferencia entre valores de ρ calculados con $\Delta r = 5 \text{\AA}$ y valores a $\Delta r = 0.5 \text{\AA}$. La línea conecta los puntos y se representa para guiar la visión.

El perfil de ρ frente a r calculado para $\Delta r=0.5\text{\AA}$ (figura 6.2 A) es similar al obtenido para $\Delta r=5\text{\AA}$ aunque con un mayor nivel de ruido. La diferencia entre los dos perfiles, mostrada en la figura 6.2 B parece estar modulada, con máximos sobre las distancias preferidas mostradas en la figura 4.1 B. Una posibilidad es que algo de este “ruido” realmente refleje las distancias preferidas para interacciones de largo alcance si éstas son transmitidas por una red de residuos conectados.

6.3 Análisis estadístico de la relación estructura-alineamientos para un set de 24 proteínas.

Para comprobar la aplicabilidad general del análisis de la relación entre la estructura y el alineamiento de secuencias basado en la función ρ , se ha llevado a cabo el análisis descrito anteriormente para un set de 24 proteínas extraídas de 41 arquitecturas representativas en la base de datos CATH, eliminando aquellas de más de 400 residuos para facilitar el cálculo. Es importante destacar que si bien la base de datos ofrece secuencias para dominios de proteínas, para los cálculos se usaron las secuencias completas para las cuales encontramos las coordenadas atómicas en el Protein Data Bank (archivos pdb). En la tabla 6.1 se muestran para estas proteínas, el número de aminoácidos, nombre de los ficheros pdb, y otros datos de interés. Los perfiles de ρ frente a r obtenidos con $\Delta r=5\text{\AA}$ y los valores de σ^* (Tabla 6.1) se muestran en la figura 6.3.

Para las 24 proteínas analizadas podemos ver las representaciones de η frente a f^* y ρ frente a las distancias con $\Delta r=5\text{\AA}$ y $\Delta r=0.5\text{\AA}$ en los apéndices B y C, respectivamente.

6. Relación estructura-alineamiento

Código pdb	Número de residuos	Número de secuencias	σ_{opt}	f^*_{opt}	$\eta(\sigma_{\text{opt}})$
1pdc	45	83	$2.56 \cdot 10^{-3}$	0.24	31.5
1cdf	46	28	$4.68 \cdot 10^{-3}$	0.14	50.7
1ahl	49	44	$6.17 \cdot 10^{-2}$	0.77	29.9
1npo	81	214	$2.17 \cdot 10^{-2}$	0.55	49.2
2hgf	97	10	$3.13 \cdot 10^{-2}$	0.43	57.3
2trx	108	491	$1.03 \cdot 10^{-2}$	0.44	137.5
1jpc	108	99	$3.36 \cdot 10^{-2}$	0.62	102.8
1ytf	115	5	$6.25 \cdot 10^{-2}$	0.82	44.17
2cy3	117	7	$4.00 \cdot 10^{-2}$	0.77	172.0
1hcd	118	68	$2.08 \cdot 10^{-2}$	0.63	157.3
1rie	127	69	$1.85 \cdot 10^{-2}$	0.45	401.0
1div	149	48	$2.22 \cdot 10^{-2}$	0.45	156.2
1cuk	203	5	$6.25 \cdot 10^{-2}$	0.76	228.32
1lrv	233	5	0.125	0.63	988.6
3aah	237	20	$1.13 \cdot 10^{-2}$	0.36	778.0
1bg5	252	38	$7.81 \cdot 10^{-4}$	0.40	3951.0
1plq	258	34	$3.67 \cdot 10^{-2}$	0.79	526.9
1lxa	262	36	$1.68 \cdot 10^{-2}$	0.46	604.6
3daa	277	89	$3.18 \cdot 10^{-2}$	0.75	727.0
1fl2	310	285	$3.14 \cdot 10^{-2}$	0.75	657.6
1ppr	312	57	$4.39 \cdot 10^{-4}$	0.44	1062.4
1aa8	340	29	$3.87 \cdot 10^{-2}$	0.54	1196.0
3bcl	350	33	0.1055	0.83	3344.58
1cem	362	9	$2.50 \cdot 10^{-2}$	0.93	346.0
1f8d	388	629	$6.71 \cdot 10^{-4}$	0.36	2483.0

Tabla 6.1. Set de proteínas analizadas. El número de residuos se refiere a los residuos para los cuales las coordenadas atómicas se dan en los archivos pdb. El número de secuencias está referido a los residuos en el alineamiento con similaridad con respecto a tiorredoxina mayor a 0.25. Se muestra el valor de la covarianza óptima para los cálculos de ρ con $\Delta r=5\text{Å}$, el correspondiente valor de f^* , ecuación (6.5) y el valor de la integral η ecuación (6.4).

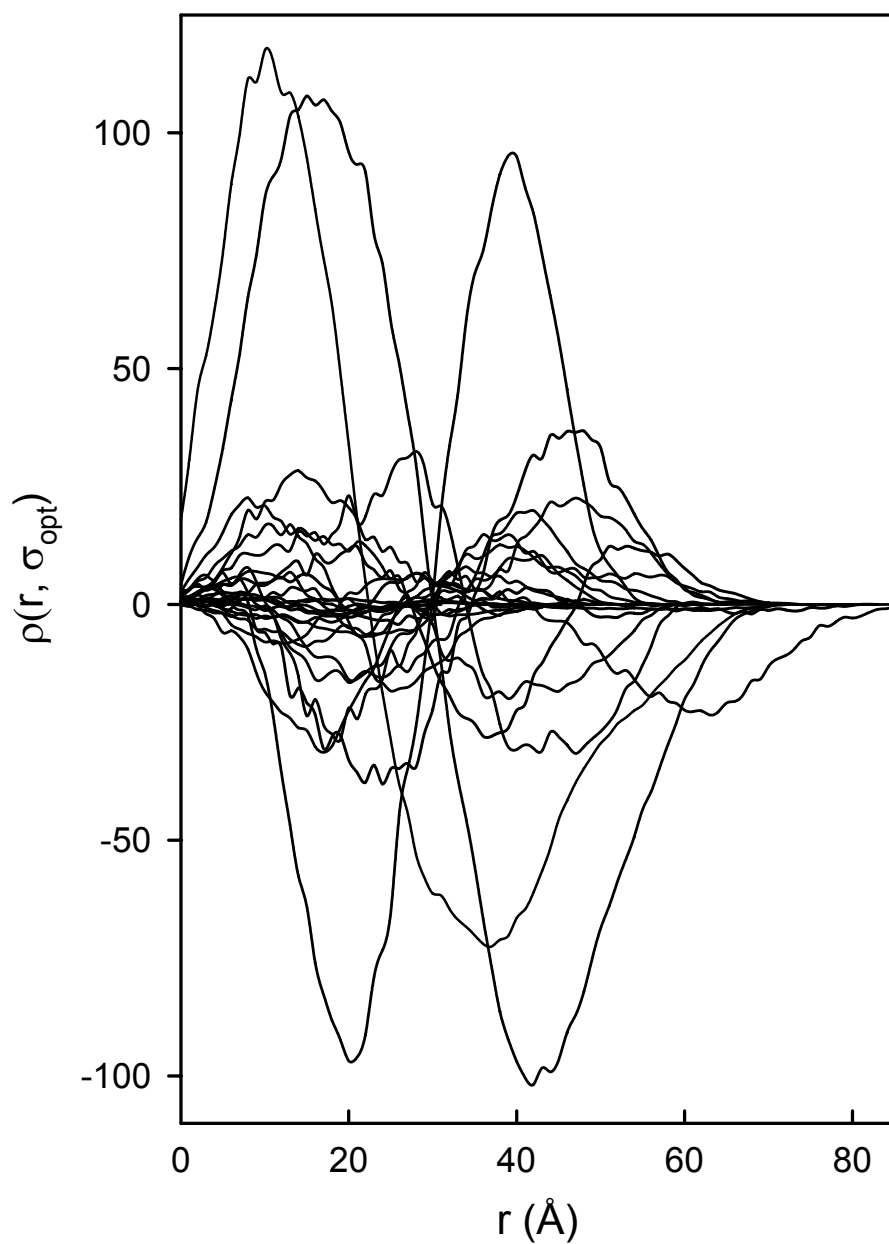


Figura 6.3. Análisis estadístico de la relación estructura-alineamiento para un set de 24 proteínas extraídas de las arquitecturas representativas de la base de datos CATH. Los perfiles de ρ frente a distancias entre residuos, carbonos- α , mostradas fueron calculadas con $\Delta r=5\text{\AA}$ y el valor de σ^* de acuerdo con el criterio de η (Tabla 6.1).

Es importante destacar que parece no haber una correlación fuerte entre la cantidad de información derivada del análisis y el tamaño de la proteína o el número de secuencias en el alineamiento (Tabla 6.1). En la figura 6.3 podemos observar que hay 4 tipos de comportamientos: 1) Para 5 proteínas (2hgf, 1ahl, 1vdf, 1pdc y 1npo) el perfil es esencialmente plano, dentro de la incertidumbre de los valores de ρ . En este caso, no se obtiene información de la relación entre la estructura y el alineamiento de secuencias derivada del análisis. 2) Para 6 proteínas (3bcl, 1ppr, 3daa, 1bg5, 1lrv y 1rie) los perfiles son similares al calculado para tiorredoxina, es decir, se observa un pico positivo para bajas distancias y un pico negativo para distancias mayores. 3) Para 9 proteínas (1jpc, 1f8d, 1cem, 1aa8, 1plq, 3aah, 1cuk, 1hcd y 2cy3) el comportamiento es contrario al anterior, el pico positivo para valores de ρ se observa para largas distancias y negativo para distancias cortas. 4) Para 4 proteínas (1fl2, 1lxa, 1div y 1ytf) se observan dos picos positivos separados.

Para comprobar la validez del procedimiento descrito, se puede hacer el cálculo y la representación de ρ frente a la distancia, pero con las distancias aleatorizadas, es decir, las distancias entre carbonos- α de los residuos, se toman al azar. Esto, en principio debería de producir perfiles de ρ frente a r esencialmente planos, y como podemos comprobar en las representaciones del apéndice C (en la representación para tiorredoxina, figura 6.2 A, se han omitido para mayor claridad), es lo que efectivamente sucede. En estas gráficas se representan cinco ejemplos de perfiles con las distancias aleatorizadas, todos ellos esencialmente planos.

6.4 Conclusiones

Los cálculos realizados sugieren que la relación entre la estructura de una proteína y el alineamiento de secuencias puede estar significativamente determinada por acoplamiento a larga distancia de residuos. Esto está reflejado en la existencia de mutaciones correlacionadas que implican posiciones alejadas en la estructura nativa. Un hecho que probablemente dificulte la derivación de contactos terciarios (mapas de contacto) a partir del alineamiento de secuencias. El adecuado procesamiento de datos puede conducir a altas precisiones en la asignación de contactos en proteínas a partir del alineamiento de secuencias. En tiorredoxina, se ha determinado una precisión de 60-70 % en la predicción de contactos a partir de correlaciones en el alineamiento de secuencias que implican ácidos carboxílicos (Godoy-Ruiz et al., 2004). Por tanto, parece conveniente desarrollar procedimientos para analizar la relación entre la estructura y el alineamiento de secuencias, los cuales tengan en cuenta la posibilidad de acoplamientos a larga distancia. En este sentido, los perfiles de ρ frente a la distancia entre residuos que hemos presentado, ofrecen representaciones de distribución de distancias de mutaciones correlacionadas en el alineamiento de secuencias. Este tipo de descripción estadística de la relación entre la estructura y el alineamiento ofrece una simple, pero eficiente herramienta para el estudio de diferentes características estructurales reflejadas en el alineamiento de secuencias. Por ejemplo, podría ser esgrimido que en algunos casos, la preferencia estadística para las correlaciones a larga distancia podría realmente ser debida a una alta conservación de un cierto número de residuos en el centro de la proteína (las distancias entre estos átomos en el centro y otros residuos en la proteína serán comparativamente cortas y los valores de covarianza para

parejas de residuos que implican estos residuos serán pequeñas, debido a la conservación). Esta característica estructural puede ser probada eliminando residuos altamente conservados previo cálculo de valores de covarianza y ρ . En la misma línea, se pueden multiplicar los valores de covarianza por funciones relacionadas con valores publicados de energías de contacto entre residuos (Hinds y Levitt, 1994; Miyazawa y Jeringan, 1999) para incrementar el peso de las interacciones en la descripción estadística. También, con las adecuadas definiciones de valores de δ en la ecuación de la covarianza, ecuación (4.1), sería posible estudiar la distribución de distancias de correlaciones para parejas de aminoácidos de un tipo específico. Pueden, además, emplearse otros tipos de análisis de valores de covarianza (Fodor y Aldrich, 1994). Finalmente, citar que diferentes subconjuntos de secuencias pueden contener diferente información estructural, una hipótesis que puede ser comprobada por agrupamiento de secuencias, previo al análisis estadístico, de acuerdo con la similaridad.

Los tipos de cálculos mencionados anteriormente pueden ayudar a determinar características estructurales a partir del alineamiento de secuencias y conducir a parámetros que describan la relación estructura-alineamiento (tales como valores de η) suficientemente sensibles a la estructura para ser usados en predicción.

7. Resumen y conclusiones

En este trabajo hemos llevado a cabo diferentes estudios que pueden resultar de gran interés en el diseño de proteínas y mejora de sus propiedades.

El primer aspecto que se abordó está relacionado con la línea de investigación principal del grupo en la actualidad, el estudio de las interacciones electrostáticas en proteínas. En concreto hemos explorado la eficiencia de diferentes sales en el apantallamiento de interacciones de carga en proteínas. El estudio del apantallamiento de dichas interacciones por sales tiene interés por dos razones. En primer lugar, el apantallamiento intercelular por concentraciones de sal puede modular tanto la estabilidad como las interacciones de las proteínas *in vivo*; por otro lado, la estimación experimental *in vitro* de las contribuciones debidas a las interacciones carga-carga en los procesos moleculares que implican proteínas se lleva generalmente a cabo mediante el estudio del efecto de sales en los procesos energéticos, asumiendo que estas interacciones están totalmente apantalladas a concentraciones moderadas de sal.

En esta tesis hemos explorado experimentalmente hasta qué punto la eficiencia de apantallamiento depende de la naturaleza de las sales. Para ello, hemos llevado a cabo una caracterización energética del efecto del NaCl (una sal no desnaturizante), cloruro de guanidinio (una sal desnaturizante), y tiocianato de guanidinio (un desnaturizante aún más fuerte) sobre la estabilidad de la forma silvestre y variante T14K de tiorredoxina de *E. coli*. Nuestros resultados sugieren una posible relación entre el orden de las sales en las series de Hofmeister y su capacidad de ser acumuladas/excluídas de la superficie de la proteína. Esto sugiere, por tanto, que la eficiencia de diferentes sales para apantallar interacciones carga-carga en proteínas

podría reflejar la posición de los iones constitutivos de dicha sal en las series de Hofmeister.

Por otra parte, hemos explorado la relación entre correlaciones en alineamientos de secuencias y características físicas de las proteínas. En concreto, un análisis del alineamiento de secuencias usando tiorredoxina de *E. coli* como secuencia de partida sugiere la existencia de acoplamiento a larga distancia entre tres posiciones. Hemos tomamos esta información como punto de partida para llevar a cabo una caracterización termodinámica, cinética y estructural de los mutantes simples, dobles y triples que se generan en las posiciones seleccionadas. Los resultados más relevantes son:

- El estado de transición para el plegamiento refleja los mismos efectos asociados a estructura residual que se observan en el estado desnaturalizado. Así, el efecto de la mutación sobre los valores cinéticos de m es opuesto en el estado de transición y el estado desplegado. El resultado es un gran efecto mutacional sobre las cinéticas de replegamiento.

- El estudio mutacional llevado a cabo parece sugerir que existe un valor máximo para el m de equilibrio de tiorredoxina, valor que podría relacionarse con la estructura global de estado desnaturalizado en términos de área expuesta al disolvente. Además el hecho de que exista este valor máximo explicaría la no aditividad que se ha encontrado en los mutantes múltiples.

El último punto de la tesis aborda el interés del estudio de mutaciones correlacionadas en alineamientos de secuencias en relación a la predicción de estructura en proteínas. La relación entre estructura y alineamientos puede estar determinada, hasta cierto punto, por el acoplamiento a larga distancia. La existencia de mutaciones correlacionadas que implican posiciones alejadas en la estructura nativa, *contamina* la información sobre contactos terciarios que se extrae del alineamiento de secuencias. En este sentido hemos desarrollado una herramienta general para explorar la distribución de distancias de mutaciones correlacionadas que podría, potencialmente, conducir a descriptores estructura-alineamientos de gran utilidad en predicción de estructura.

8. Apéndices

Apéndice A.1. Determinación del efecto de la concentración de desnaturalizante en los valores de m .

Los valores de m determinados en los apartados 3.9 y 3.10 son valores de $m_{1/2}$ pertenecientes a la línea de equilibrio C - T , definida por parejas de valores (C, T) para los cuales el cambio en la energía de Gibbs es cero. El análisis llevado a cabo sugiere que no hay efecto de la temperatura en los valores de m . En este apéndice se hará un análisis más formal y riguroso.

El efecto de la concentración de desnaturalizante en la determinación de los valores de m mediante calorimetría puede ser descrito por la siguiente derivada:

$$\left(\frac{dm}{dC}\right)_{\Delta G=0} \quad (\text{A1.1})$$

donde el subíndice $\Delta G = 0$ quiere decir que el efecto de C en m es calculado a lo largo de la línea de equilibrio C - T (T cambia con C para mantener $\Delta G = 0$).

Nuestro interés se centra en la derivada:

$$\left(\frac{\partial m}{\partial C}\right)_T \quad (\text{A1.2})$$

la cual describe las desviaciones de la linealidad de la dependencia de ΔG frente a C a una temperatura dada. Si ΔG cambia linealmente con C , m es constante, independiente

de C , y la derivada anterior es cero. Por consiguiente las desviaciones de la linealidad son transmitidas por valores de $(\partial m/\partial C)_T$ diferentes de cero.

Las ecuaciones (A1.1) y (A1.2) pueden ser relacionadas fácilmente mediante:

$$\left(\frac{dm}{dC}\right)_{\Delta G=0} = \left(\frac{\partial m}{\partial C}\right)_T + \left(\frac{\partial m}{\partial T}\right)_C \cdot \left(\frac{dT_m}{dC}\right) \quad (\text{A1.3})$$

donde la pendiente de la línea de equilibrio $[(\partial T/\partial C)_{\Delta G=0}]$ es, de hecho, el efecto de la concentración de desnaturalizante en la temperatura de desnaturalización $[(dT_m/dC)]$.

El problema es la evaluación del segundo término del miembro derecho de la ecuación (A1.3) ya que no conocemos el valor de la derivada $(\partial m/\partial T)_C$. No obstante el cambio de energía de Gibbs de desnaturalización es función tanto de C como de T y debe de cumplirse:

$$\left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial C \partial T}\right) = \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial T \partial C}\right) \quad (\text{A1.4})$$

Teniendo en cuenta esto y sabiendo que m y el cambio de entropía son las primeras derivadas de ΔG ($\Delta S = -(\partial \Delta G/\partial T)_C$) y m está descrita según la ecuación (3.11), tenemos:

$$\left(\frac{\partial m}{\partial T}\right)_C = \left(\frac{\partial \Delta S}{\partial C}\right)_T \quad (\text{A1.5})$$

y entonces la ecuación (A1.3), queda como:

$$\left(\frac{dm}{dC}\right)_{\Delta G=0} = \left(\frac{\partial m}{\partial C}\right)_T + \left(\frac{\partial \Delta S}{\partial C}\right)_T \cdot \left(\frac{dT_m}{dC}\right) \quad (\text{A1.6})$$

Los valores de ΔS pueden ser fácilmente calculados como $\Delta H_m/T_m$, pero éstos corresponden a la línea de equilibrio. La pendiente de una representación de ΔS ($=\Delta H_m/T_m$) frente a T_m , para diferentes concentraciones de desnaturalizante, es:

$$\left(\frac{d\Delta S}{dT}\right)_{\Delta G=0} \quad (\text{A1.7})$$

Podemos obtener una expresión para esta derivada empleando las derivadas parciales:

$$\left(\frac{d\Delta S}{dT}\right)_{\Delta G=0} = \left(\frac{\partial \Delta S}{\partial T}\right)_C + \frac{\left(\frac{\partial \Delta S}{\partial C}\right)_T}{dT_m/dC} \quad (\text{A1.8})$$

resolviendo para $(\partial \Delta S/\partial C)_T$,

$$\left(\frac{\partial \Delta S}{\partial C}\right)_T = \left\{ \left(\frac{d\Delta S}{dT}\right)_{\Delta G=0} - \frac{\Delta C_P}{T} \right\} \cdot \left(\frac{dT_m}{dC}\right) \quad (\text{A1.9})$$

donde se ha empleado la relación termodinámica: $(\partial \Delta S/\partial T)_C = \Delta C_P/T$.

Sustituyendo la ecuación (A1.9) en (A1.6) y resolviendo para $(\partial m/\partial C)_T$ obtenemos:

$$\left(\frac{\partial m}{\partial C}\right)_T = \left(\frac{dm}{dC}\right)_{\Delta G=0} + \left\{ \frac{\Delta C_p}{T} - \left(\frac{d\Delta S}{dT}\right)_{\Delta G=0} \right\} \left(\frac{dT_m}{dC}\right)^2 \quad (\text{A1.10})$$

que permite calcular la derivada $(\partial m/\partial C)_T$, en el límite de baja concentración de desnaturalizante ($C \rightarrow 0$).

Para evaluar el segundo término del miembro derecho de la ecuación (A1.10), primero se hace la representación de ΔS (calculada como $\Delta H_m/T_m$) frente a T_m para el rango de concentración de cloruro de guanidinio entre 0-1 M. La pendiente obtenida es $1.71 \times 10^{-2} \pm 0.06 \times 10^{-2} \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-2}\cdot\text{mol}^{-1}$, y es una estimación de la derivada $(d\Delta S/dT)_{\Delta G=0}$ en la región de bajas concentraciones de desnaturalizante. El valor de ΔC_p se obtuvo de la bibliografía (Georgescu et al., 2001), donde se determinan varios valores, siendo el valor medio $6.1 \pm 0.4 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ y usando como valor de temperatura T_m , en ausencia de desnaturalizante, obtenemos para $\Delta C_p/T$ un valor de $1.69 \times 10^{-2} \pm 0.11 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-2}\cdot\text{mol}^{-1}$. Por lo tanto, el corchete $\{\Delta C_p/T - (d\Delta S/dT)_{\Delta G=0}\}$ en la ecuación (A1.10) resulta ser cero con una incertidumbre de $\sim \pm 0.13 \times 10 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-2}\cdot\text{mol}^{-1}$. Finalmente, la derivada dT_m/dC a baja concentración de desnaturalizante puede ser calculada de los datos representados en la figura 3.11. El resultado es $-18.3 \pm 2.7 \text{ K}\cdot\text{M}^{-1}$ del ajuste lineal de T_m frente a C en el rango de concentración de desnaturalizante 0-1 M. Usando todos estos valores, el segundo término de la ecuación (A1.10) es cero con una incertidumbre de $\pm 0.6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-2}$.

La derivada $(dm/dC)_{\Delta G=0}$ a baja concentración de desnaturalizante puede ser calculada a partir de los datos de $m_{1/2}$ mostrados en la figura 3.13 siendo del orden de $-30 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-2}$. Queda claro que el segundo término del miembro derecho de la ecuación (A1.10) no es significativo comparado con $(dm/dC)_{\Delta G=0}$. Podemos concluir que:

$$\left(\frac{\partial m}{\partial C}\right)_T \cong \left(\frac{dm}{dC}\right)_{\Delta G=0} \quad (\text{A1.11})$$

a baja concentración de cloruro de guanidinio, y por tanto, el acusado descenso de m observado a bajas concentraciones de desnaturalizante refleja la dependencia con la concentración de m y revela que la dependencia de ΔG frente a C es claramente no lineal a bajas concentraciones de desnaturalizante. Estos mismos cálculos pueden aplicarse para el tiocianato de guanidinio.

Apéndice A.2. Desviación de la linealidad de la dependencia de ΔG frente a concentración de desnaturizante causada por uniones específicas de desnaturizante al estado nativo.

La unión específica de moléculas de desnaturizante, o iones, al estado nativo de la proteína causa desviaciones de la linealidad de la dependencia de ΔG con la concentración, de manera tal que la extrapolación lineal desde altas concentraciones de desnaturizante sobreestima el valor de la energía libre de Gibbs a concentración cero de desnaturizante. La razón es que, las uniones al estado nativo siempre tienen un efecto estabilizante. Así, a baja concentración de desnaturizante, el efecto estabilizante de las uniones específicas de desnaturizante, cancelará hasta cierto punto el efecto desnaturizante, dando lugar a un menor valor de m . A continuación se demuestran estas ideas mediante el análisis de un modelo de unión simple.

Aceptando que la proteína nativa puede existir como forma ligada (NL) y no ligada (N), donde el ligando es, en este caso, una molécula de desnaturizante o ion, entonces:



siendo la unión, fuerte, específica y estequiométrica, pudiendo ser descrita por una constante de equilibrio en la forma:

$$K_L = \frac{[NL]}{[N] \times C} \quad (\text{A2.2})$$

donde C es la concentración de ligando, en nuestro caso el desnaturalizante.

Ya que estamos interesados en las desviaciones de la linealidad que resultan de la unión, tomamos, como punto de partida para el análisis, que el cambio en la energía libre de Gibbs para la desnaturalización de la proteína no ligada cambia linealmente con la concentración de desnaturalizante:

$$K^* = \frac{[D]}{[N]} \quad (\text{A2.3})$$

$$\Delta G^* = -RT \cdot \ln K^* \quad (\text{A2.4})$$

$$\Delta G^* = \Delta G_w - m^* \cdot C \quad (\text{A2.5})$$

donde se han usado asteriscos para designar parámetros pertenecientes a la desnaturalización de la proteína no ligada, ΔG_w es el cambio de energía de Gibbs en ausencia de desnaturalizante, y m^* se ha tomado constante (independiente de la concentración de desnaturalizante).

No obstante, la constante de equilibrio que se puede determinar experimentalmente no es K^* , sino:

$$K = \frac{[D]}{[N] + [NL]} \quad (\text{A2.7})$$

la cual incluye la concentración total de proteína nativa (ligada más no ligada). Y el cambio de energía de Gibbs:

$$\Delta G = -RT \times \ln K \quad (\text{A2.7})$$

La relación entre ΔG y ΔG^* puede ser determinada a partir de la ecuación (A2.2), así tenemos que $[NL] = K_L \cdot [N] \cdot C$, por lo que K (ecuación A2.6) puede ser escrita como $K^*/(1 + K_L \cdot C)$ y ΔG como:

$$\Delta G = \Delta G^* + RT \times \ln(1 + K_L \times C) \quad (\text{A2.8})$$

La expresión de m se puede obtener a partir de su definición (ecuación 3.11):

$$m = m^* - \frac{RT \times K_L}{1 + K_L \times C} \quad (\text{A2.9})$$

Para altos valores de C , el segundo término del miembro derecho, se aproxima a cero y $m = m^*$. Para $C = 0$, m tiende a $m^* - RT \times K_L$, el cual es menor que el valor a altas concentraciones de desnaturizante. La ecuación (A2.9) predice un crecimiento de m al incrementar la concentración de desnaturizante, y por tanto, las desviaciones de la linealidad de ΔG con C son tales que la extrapolación lineal sobreestima el valor del

cambio de energía de Gibbs en ausencia de desnaturalizante. Esta conclusión puede verificarse como sigue:

Sea C' la concentración de desnaturalizante para la cual ΔG es cero a la temperatura de interés. Asumamos que hemos realizado un experimento de desnaturalización química del cual podemos determinar el valor de C' y el efecto de la concentración de desnaturalizante en ΔG en las cercanías de C' , es decir, podemos determinar C' y el valor de m correspondiente a C' . La estimación de ΔG por la extrapolación lineal sería:

$$\Delta G_w^{LEM} = m(C') \times C' \quad (A2.10)$$

y usando la ecuación (A2.9):

$$\Delta G_w^{LEM} = m^* \times C' - \frac{RT \times K_L \times C'}{1 + K_L \times C'} \quad (A2.11)$$

Aplicando la ecuación (A2.5) a la concentración C' , tenemos:

$$m^* \times C' = \Delta G_w - \Delta G^*(C') = \Delta G_w + RT \times \ln(1 + K_L \times C') \quad (A2.12)$$

donde se ha usado para $\Delta G^*(C')$ la expresión dada por la ecuación (A2.8) (para $C = C'$, $\Delta G=0$, y $\Delta G^*(C') = -RT \cdot \ln(1 + K_L \cdot C')$). Sustituyendo (A2.12) en (A2.11), tenemos:

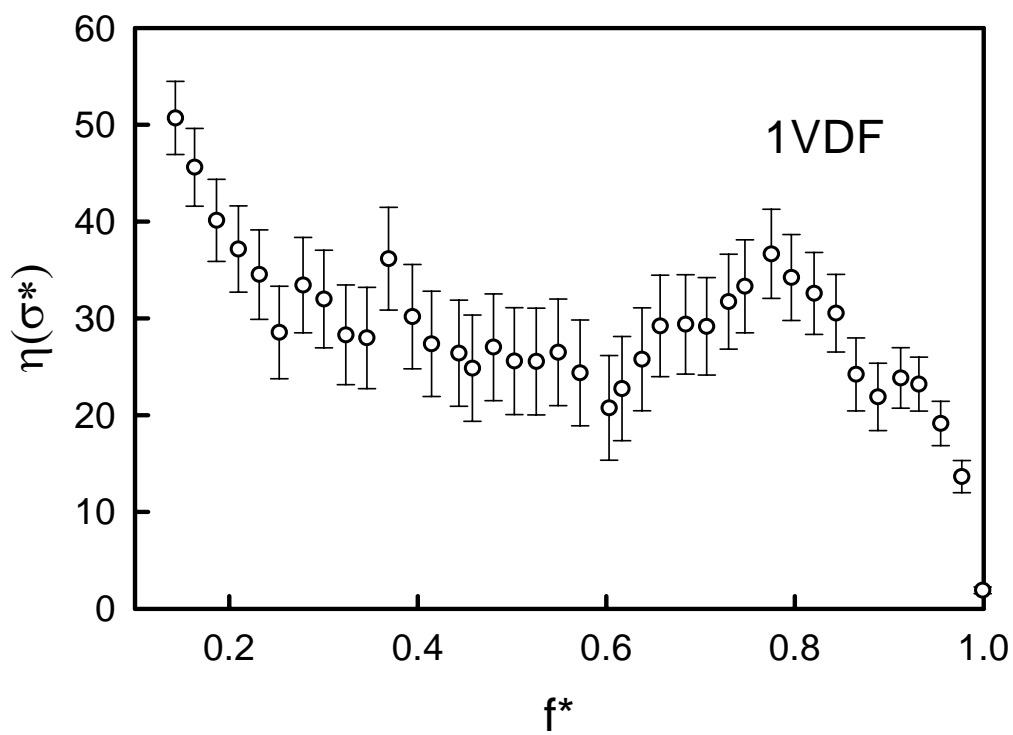
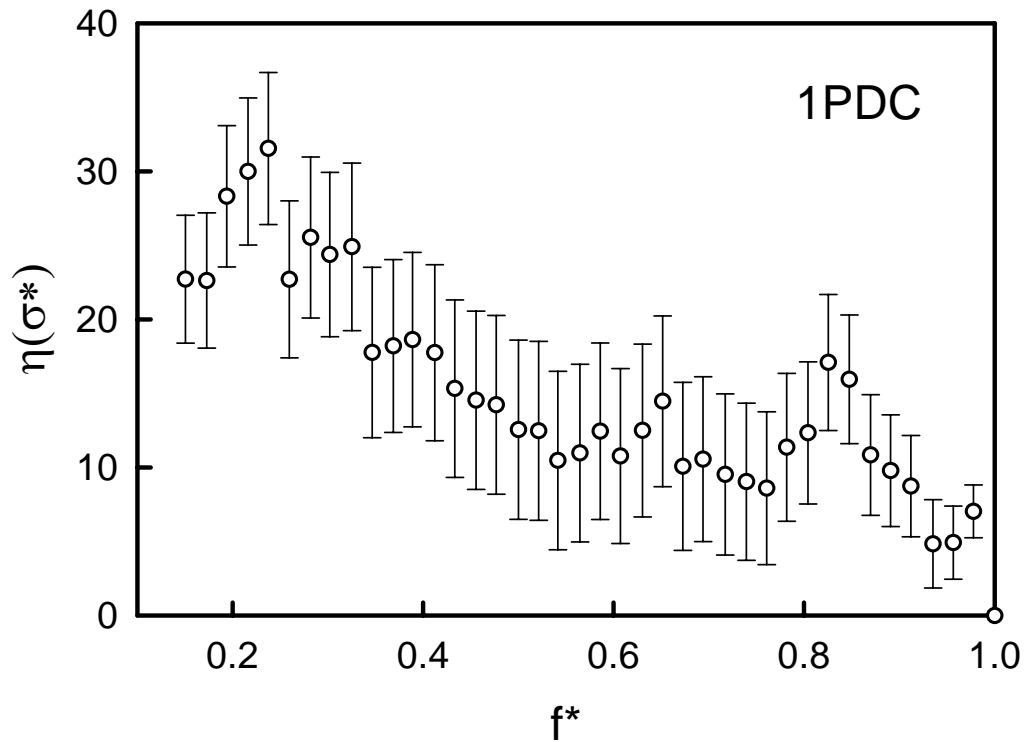
$$\Delta G_W^{LEM} = \Delta G_W + RT \times \left\{ \ln(1 + K_L \times C') - \frac{K_L \times C'}{1 + K_L \times C'} \right\} \quad (\text{A2.13})$$

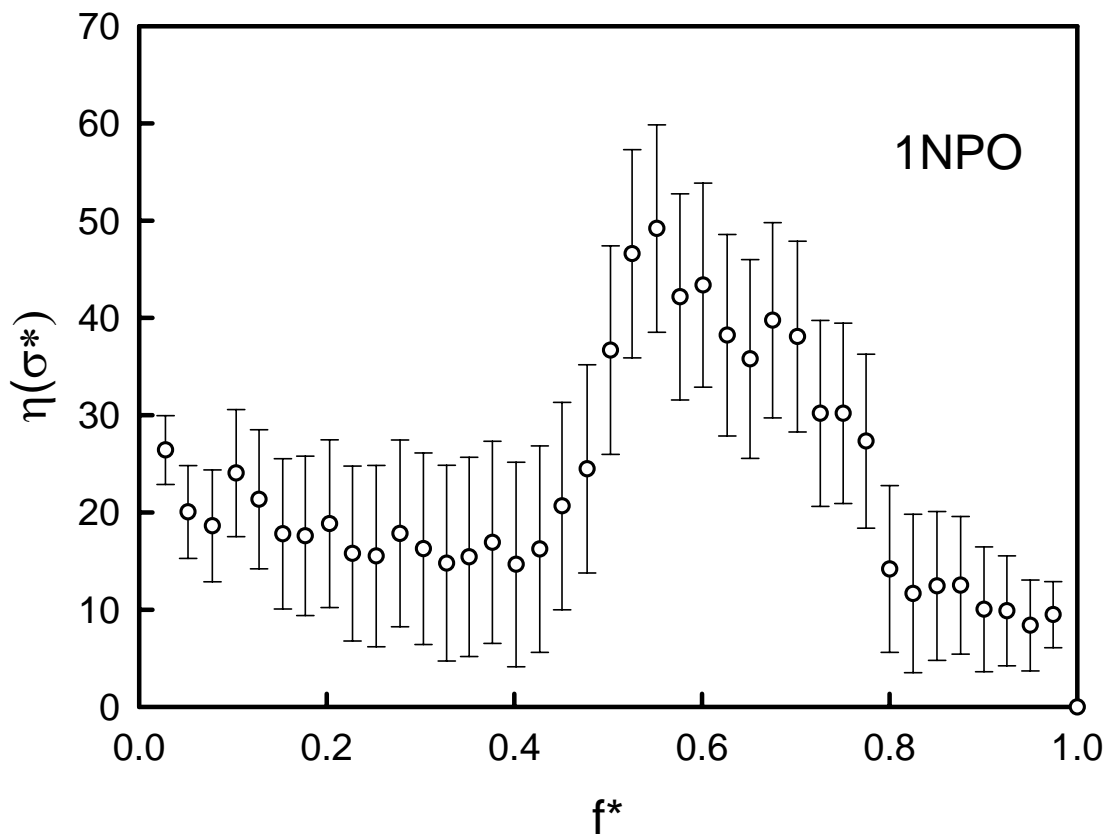
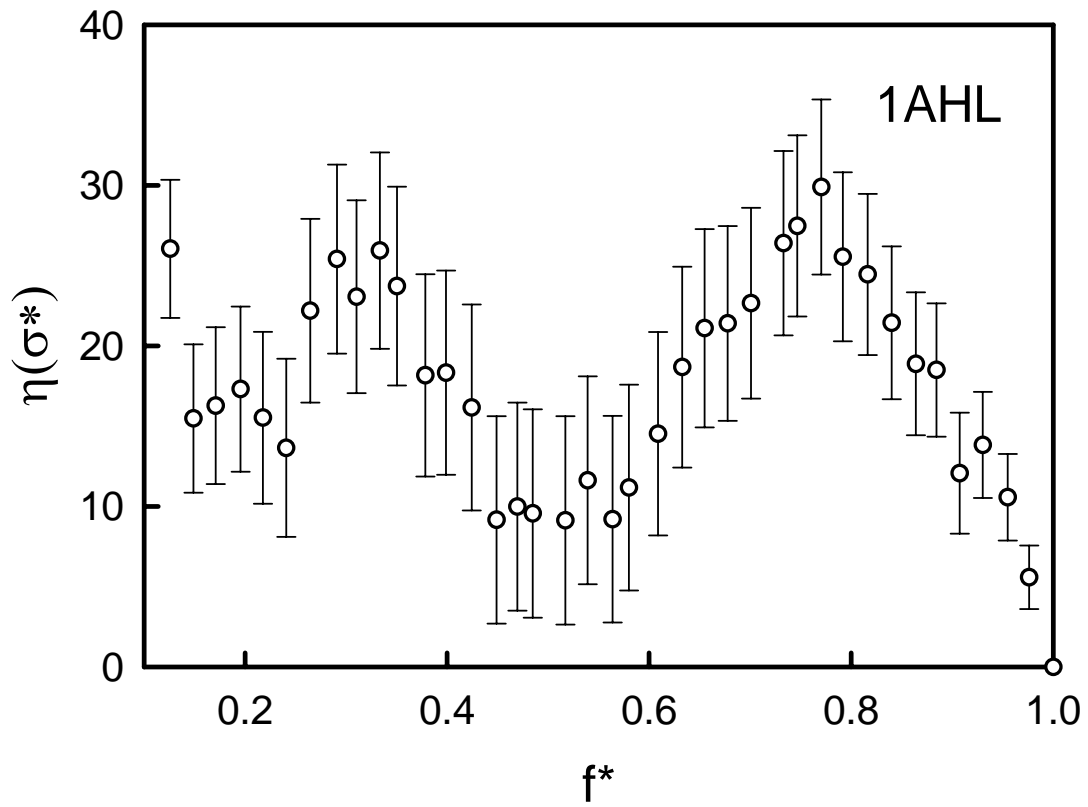
La diferencia entre corchetes en la ecuación anterior es necesariamente un número positivo ya que, $\ln(1 + x)$ es siempre mayor que $x/(1+x)$ para cualquier valor positivo de x ; aquí $x = K_L \times C'$. Concluimos pues que:

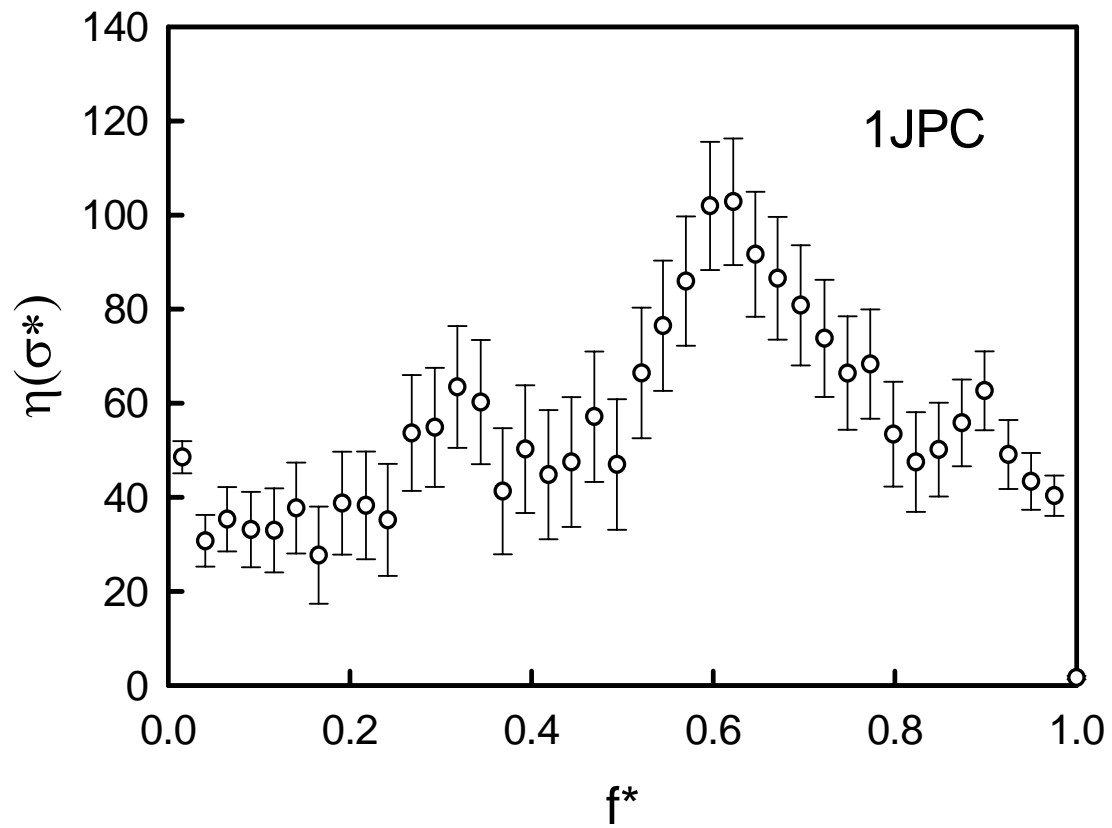
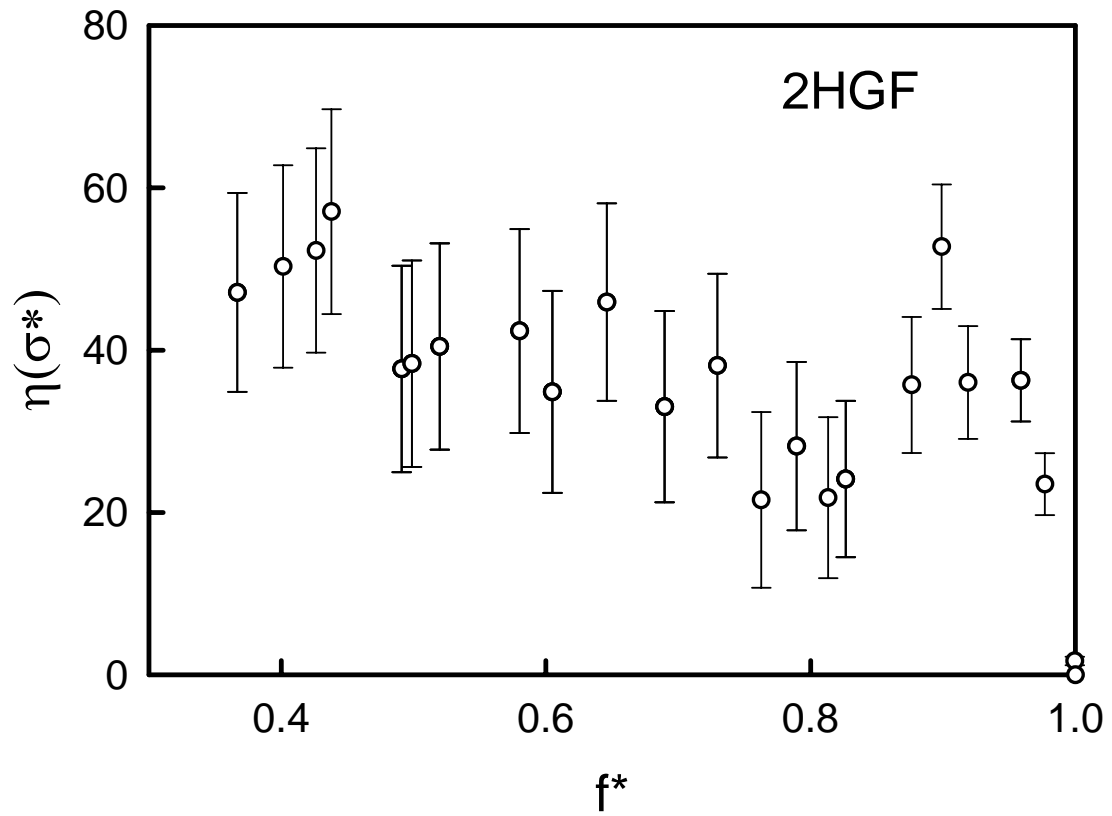
$$\Delta G_W^{LEM} > \Delta G_W \quad (\text{A2.14})$$

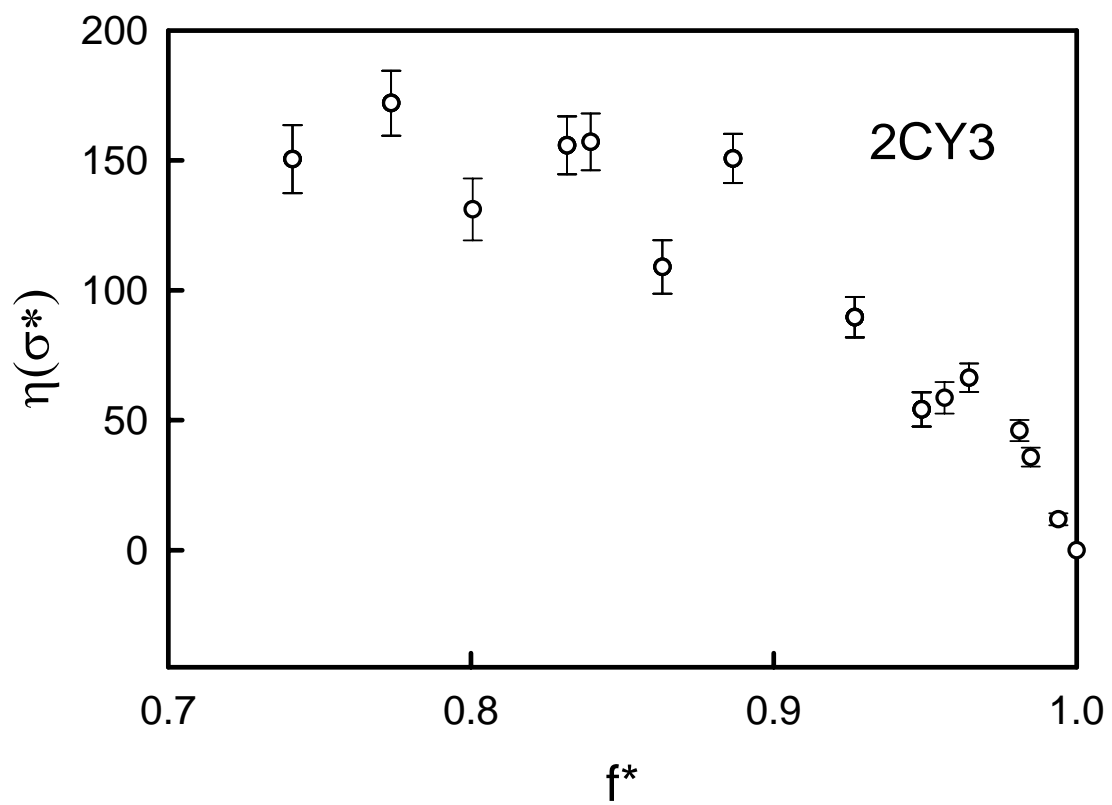
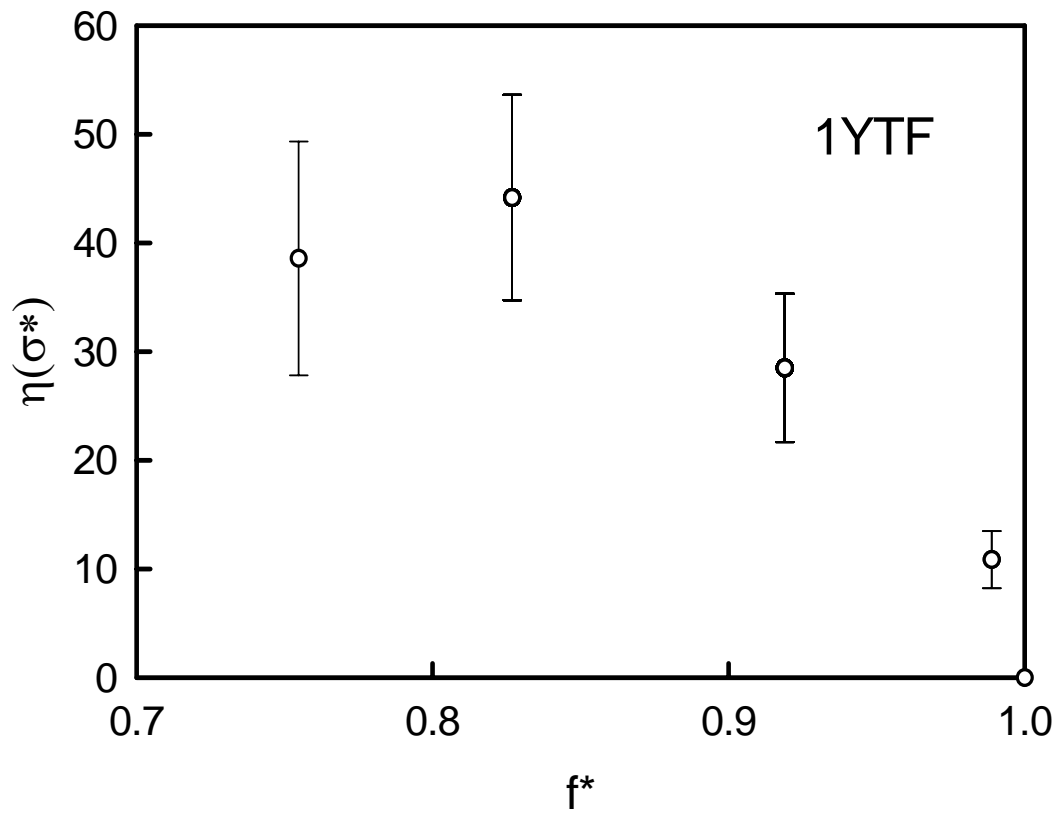
y la extrapolación lineal sobreestima el valor del cambio de energía de Gibbs en ausencia de desnaturalizante.

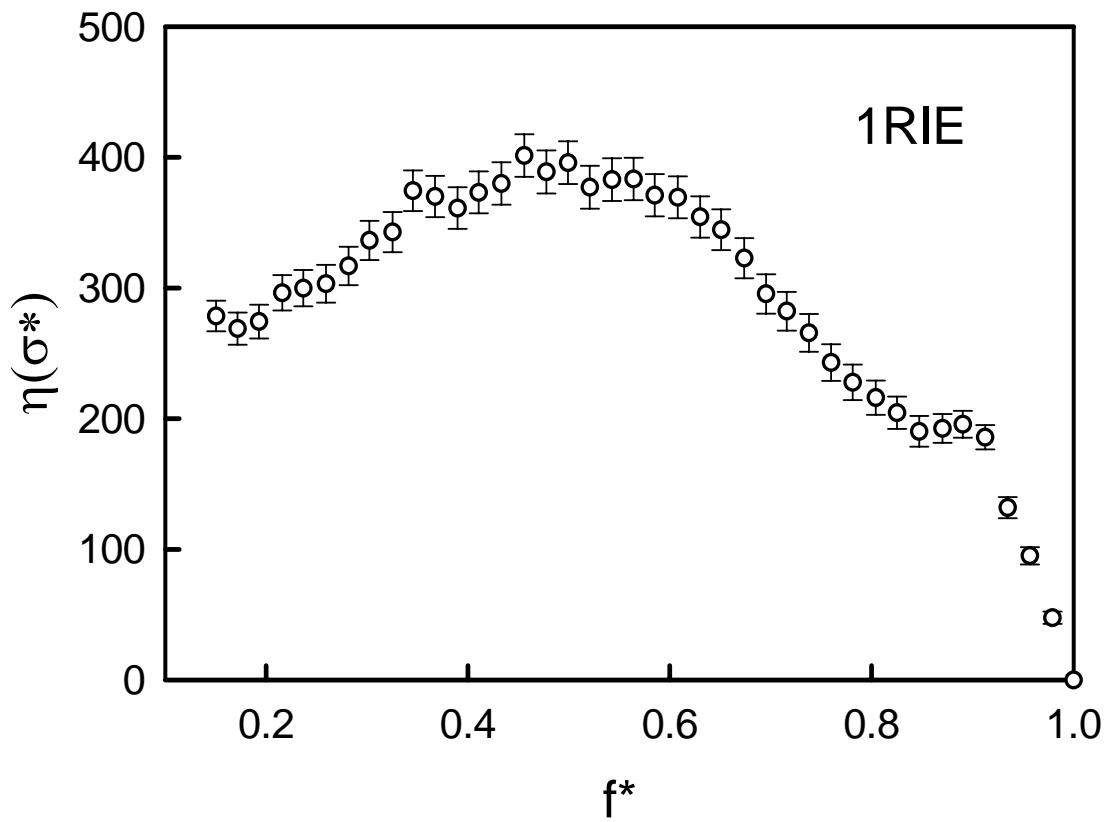
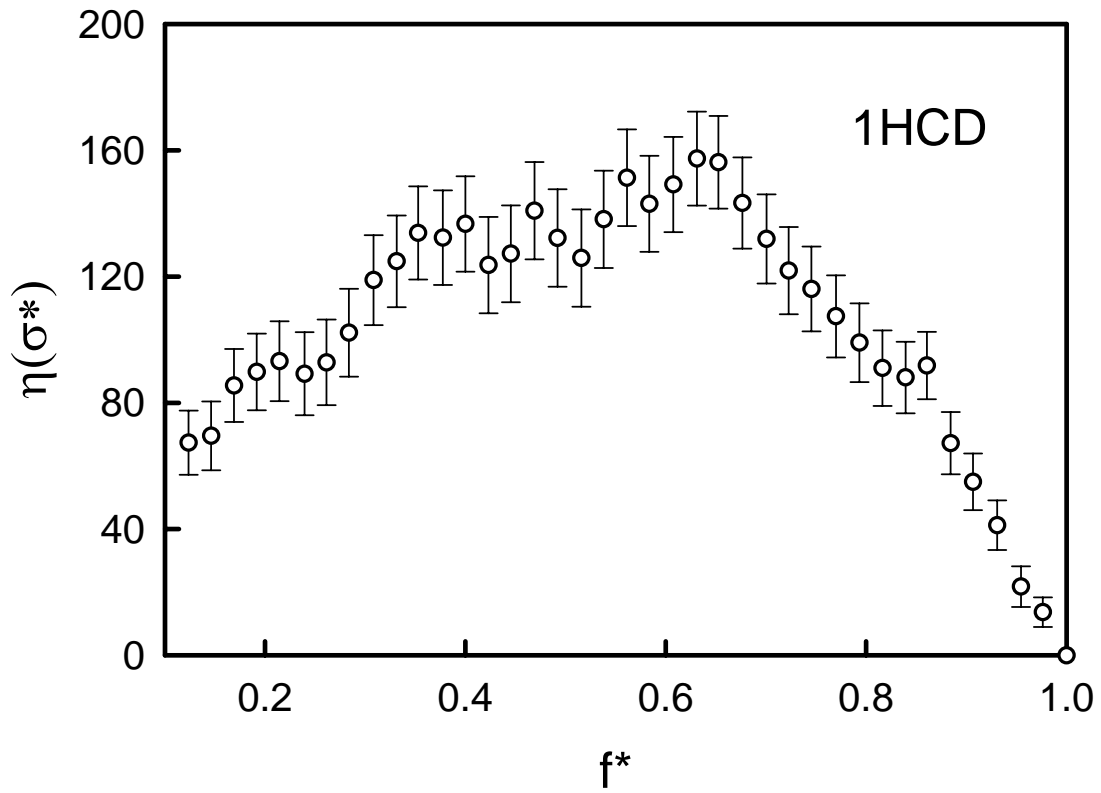
Apéndice B: Representaciones de η frente a f^*

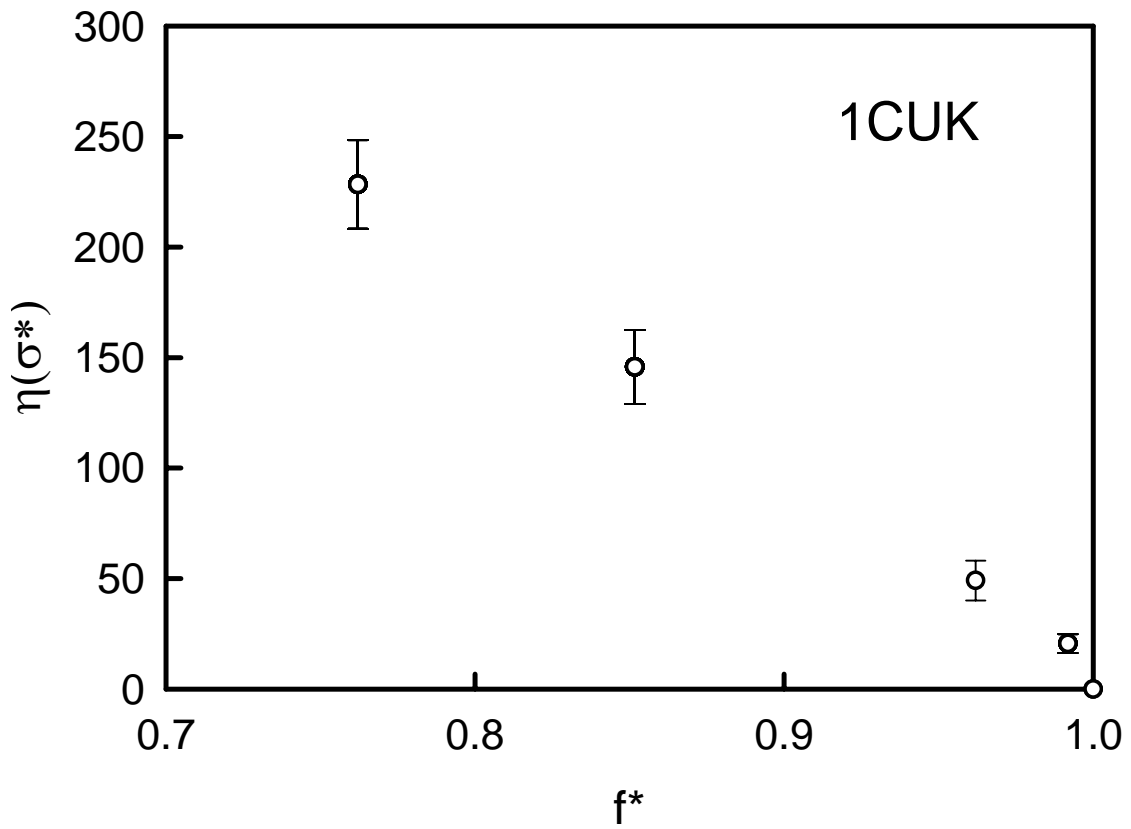
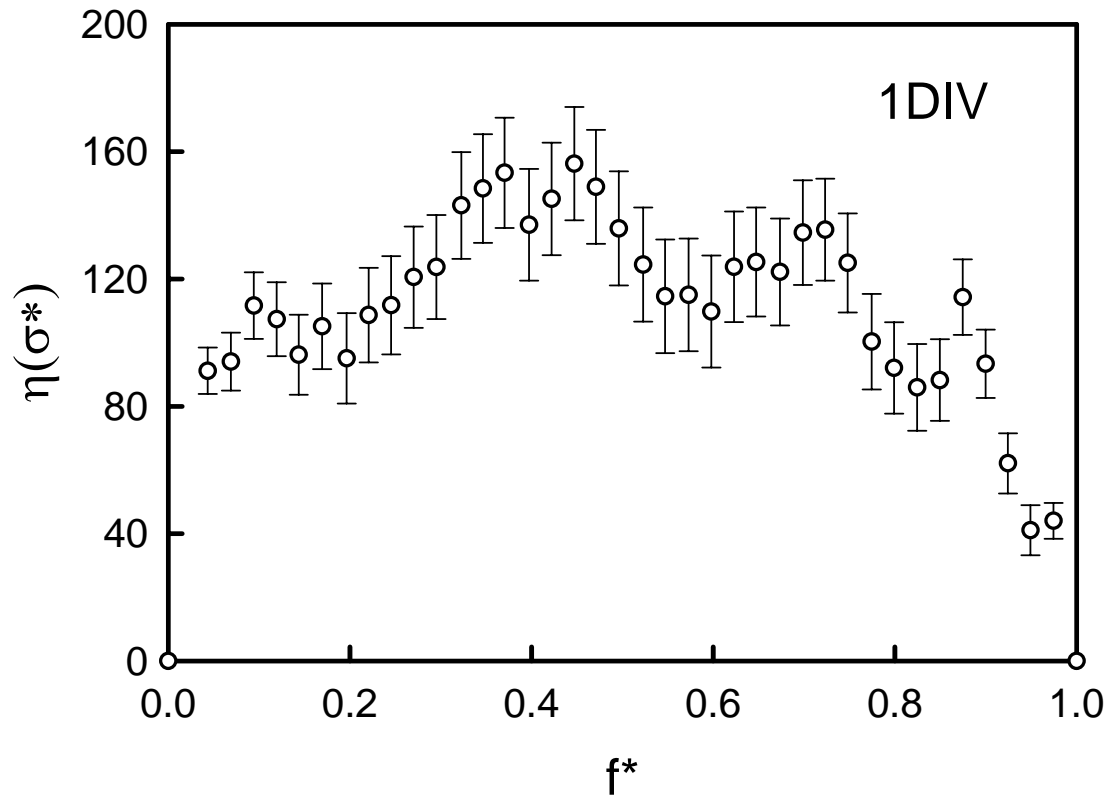


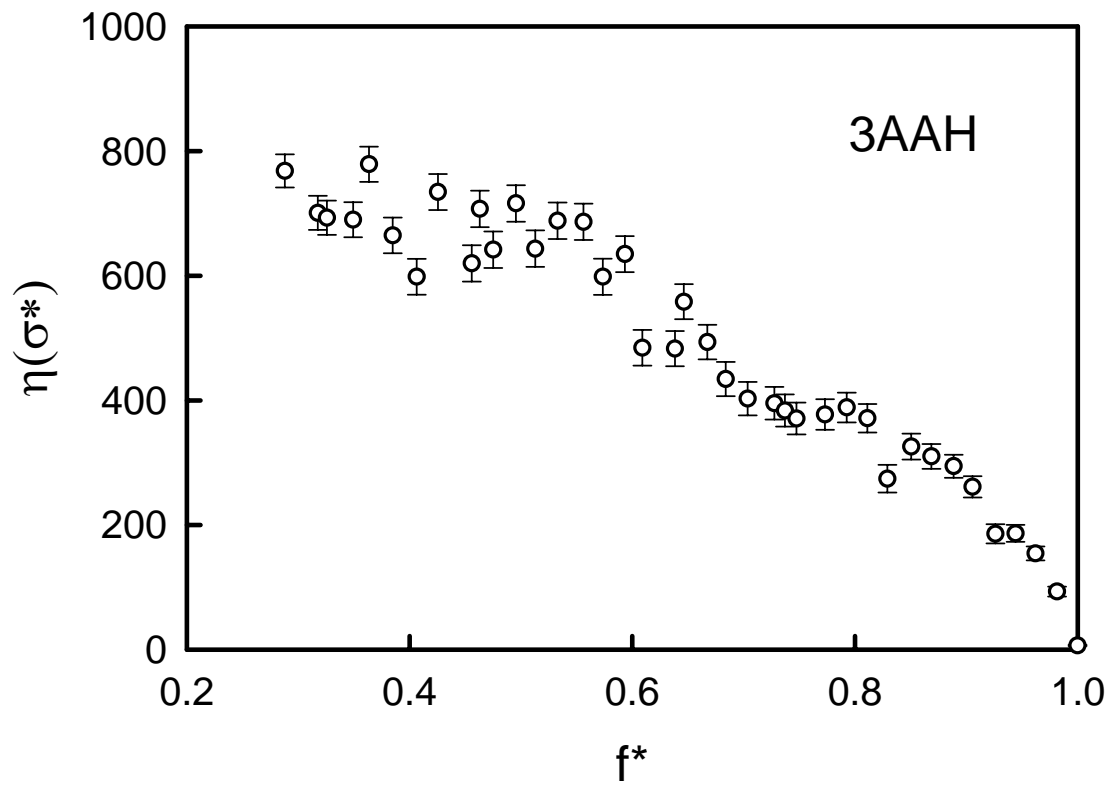
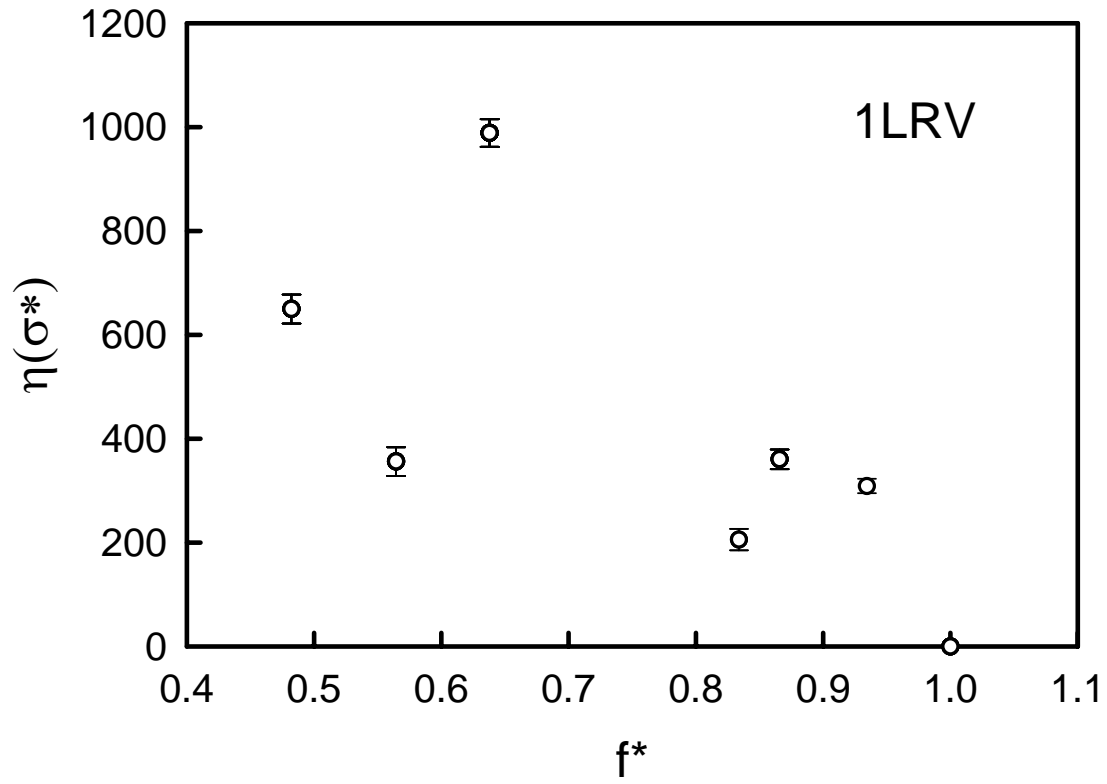


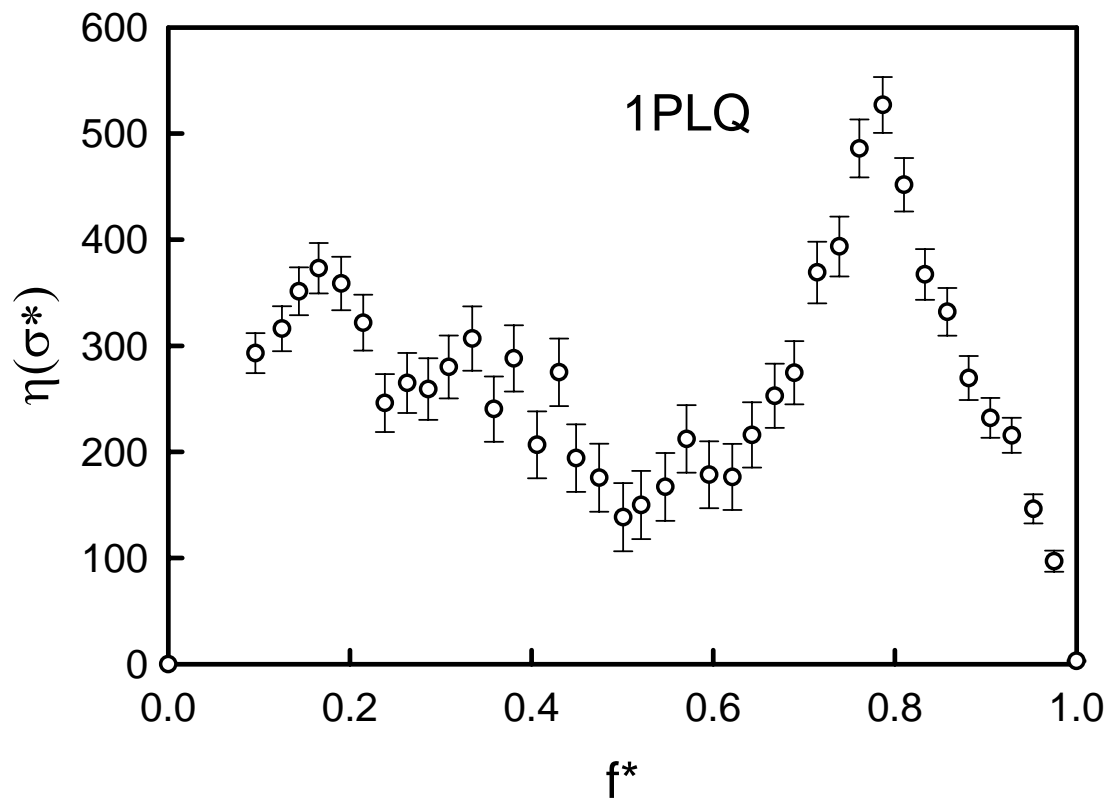
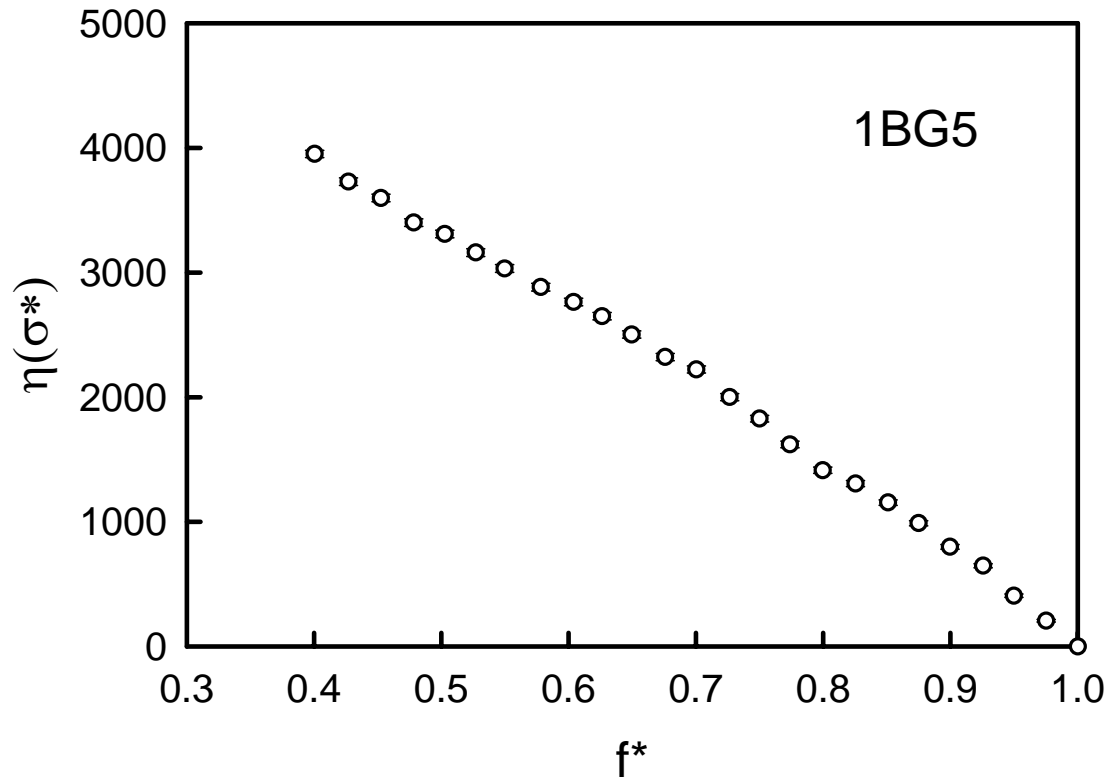


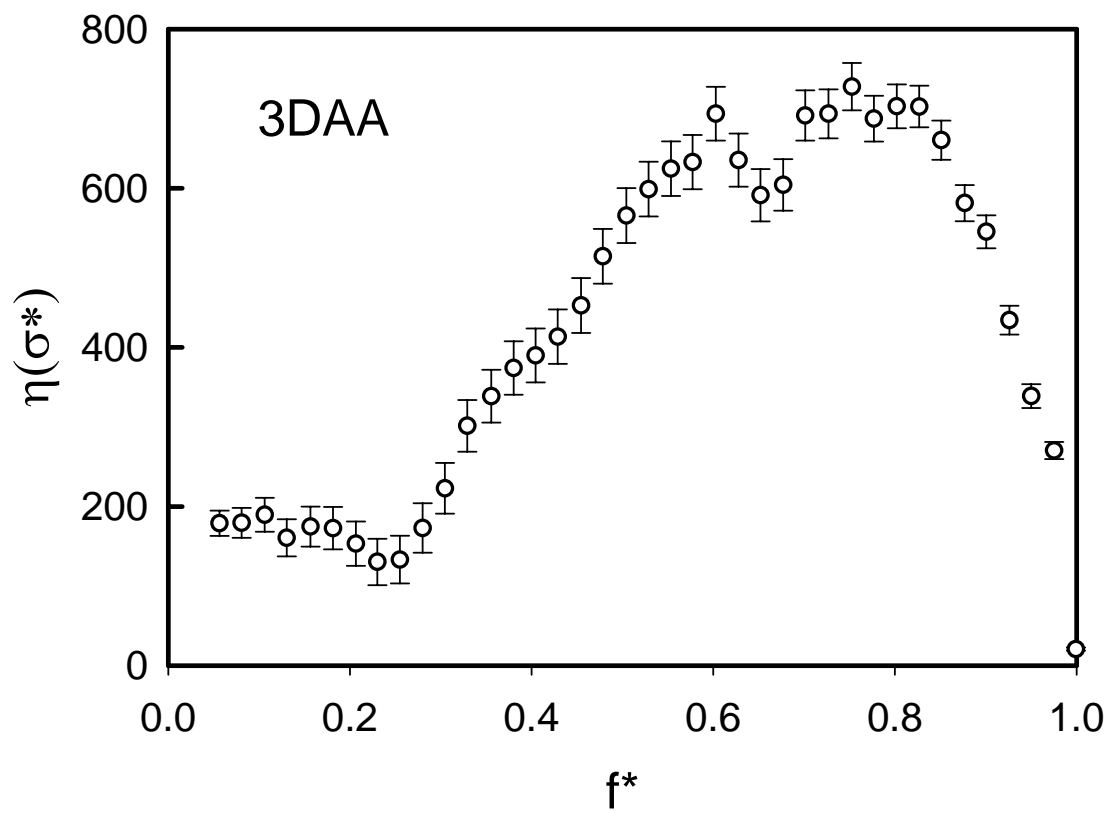
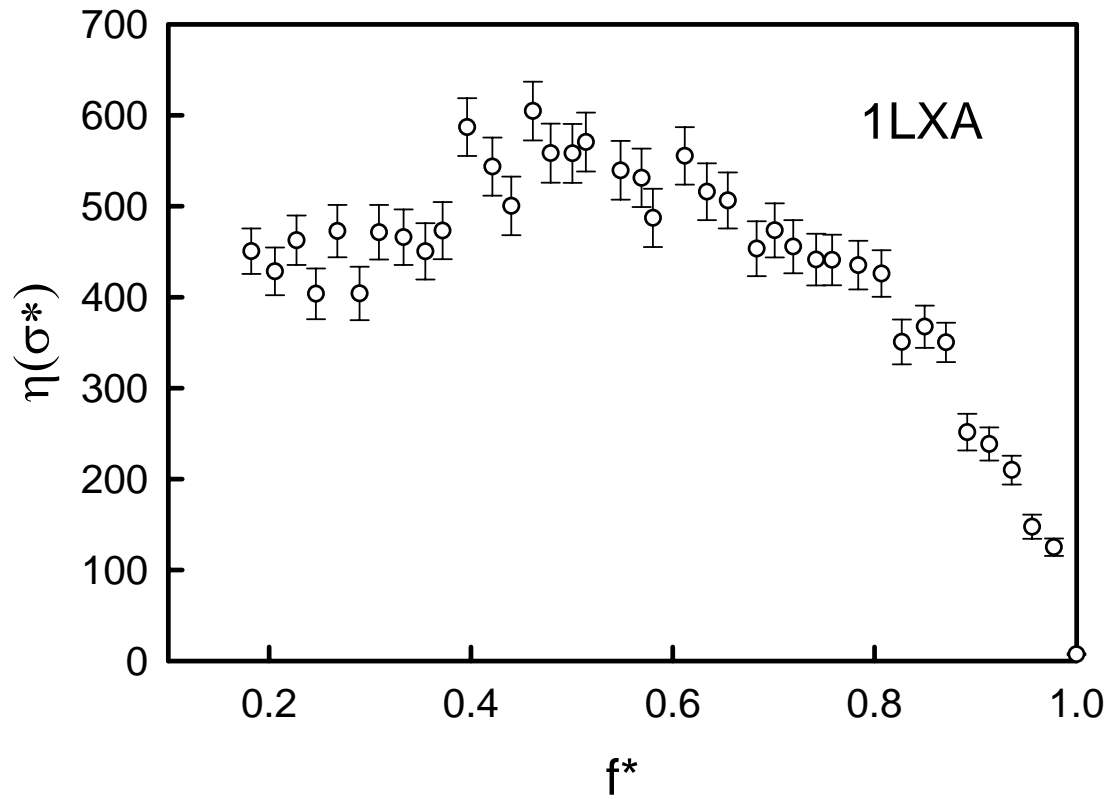


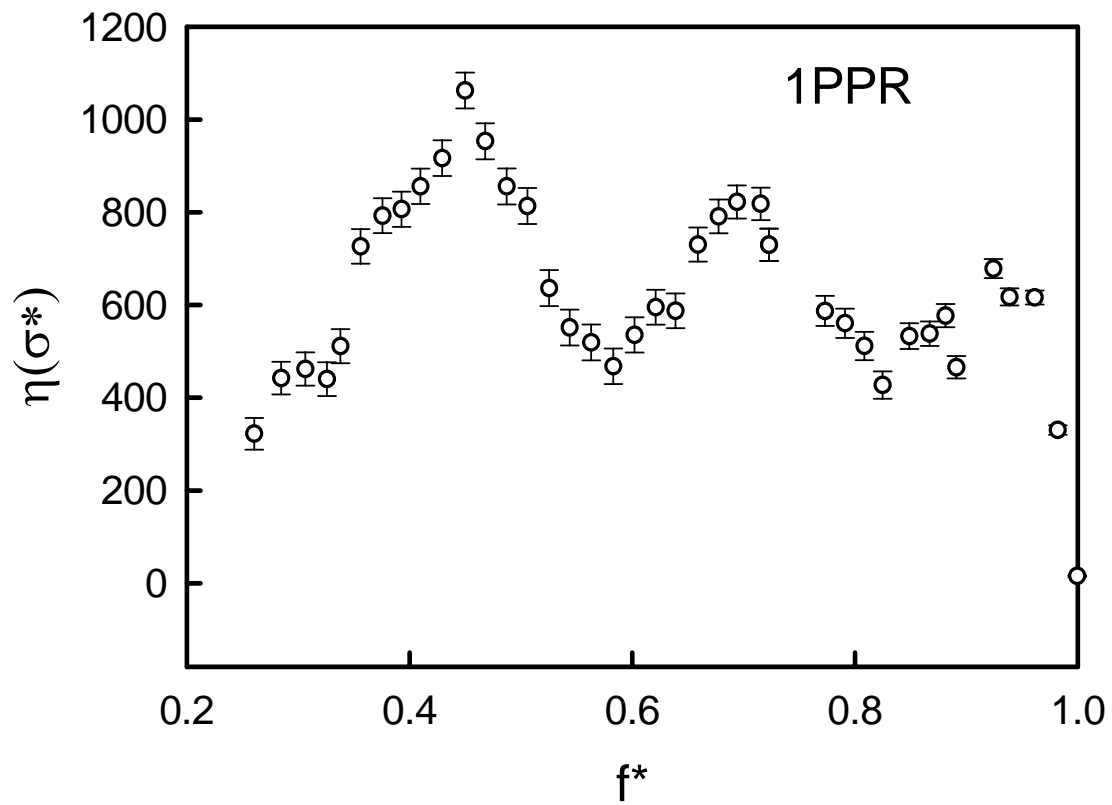
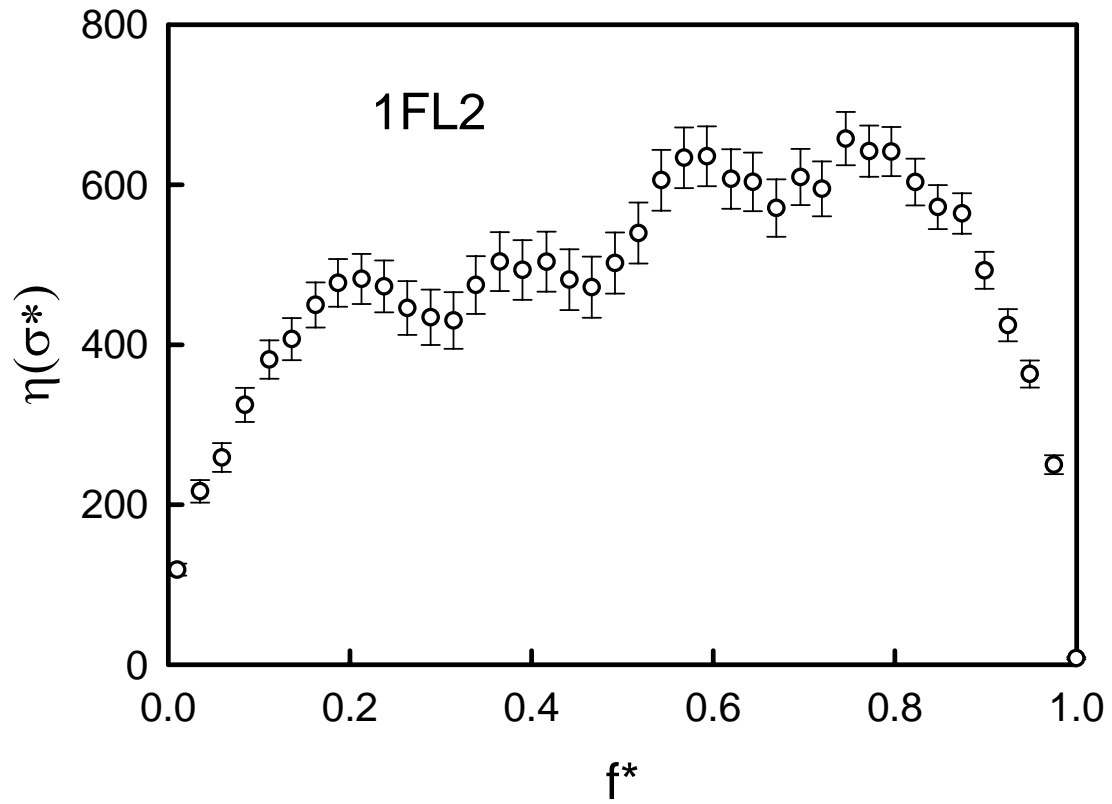


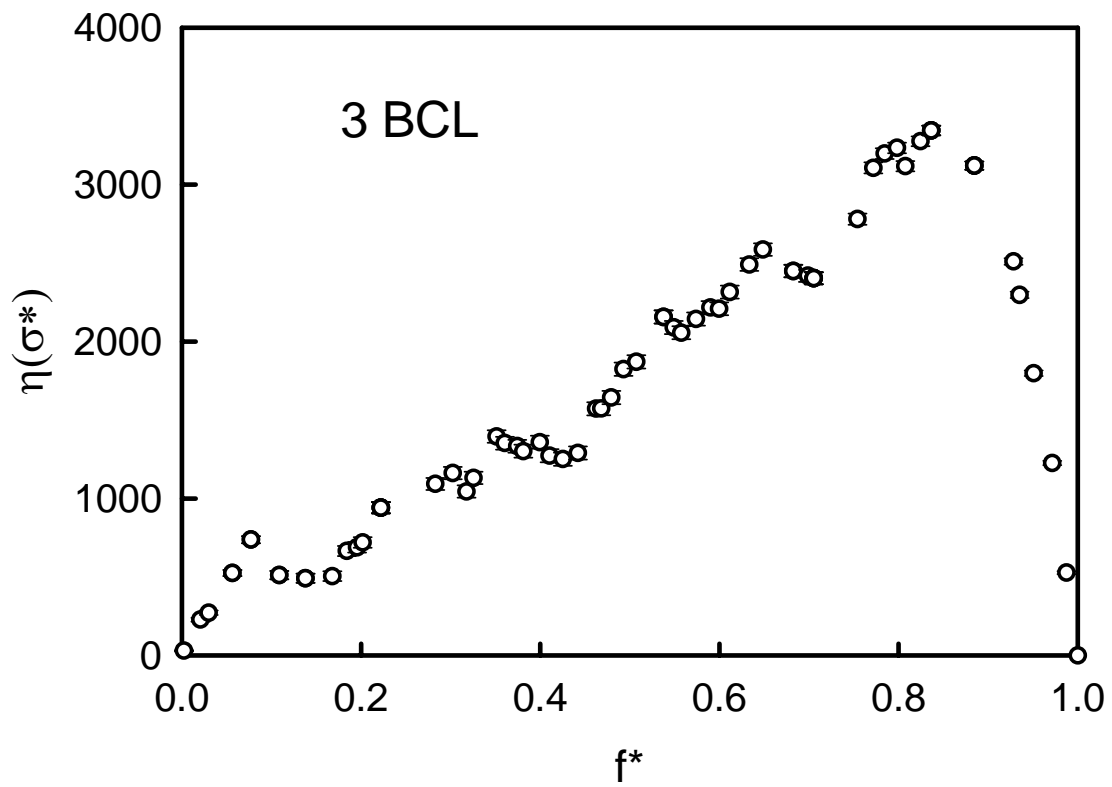
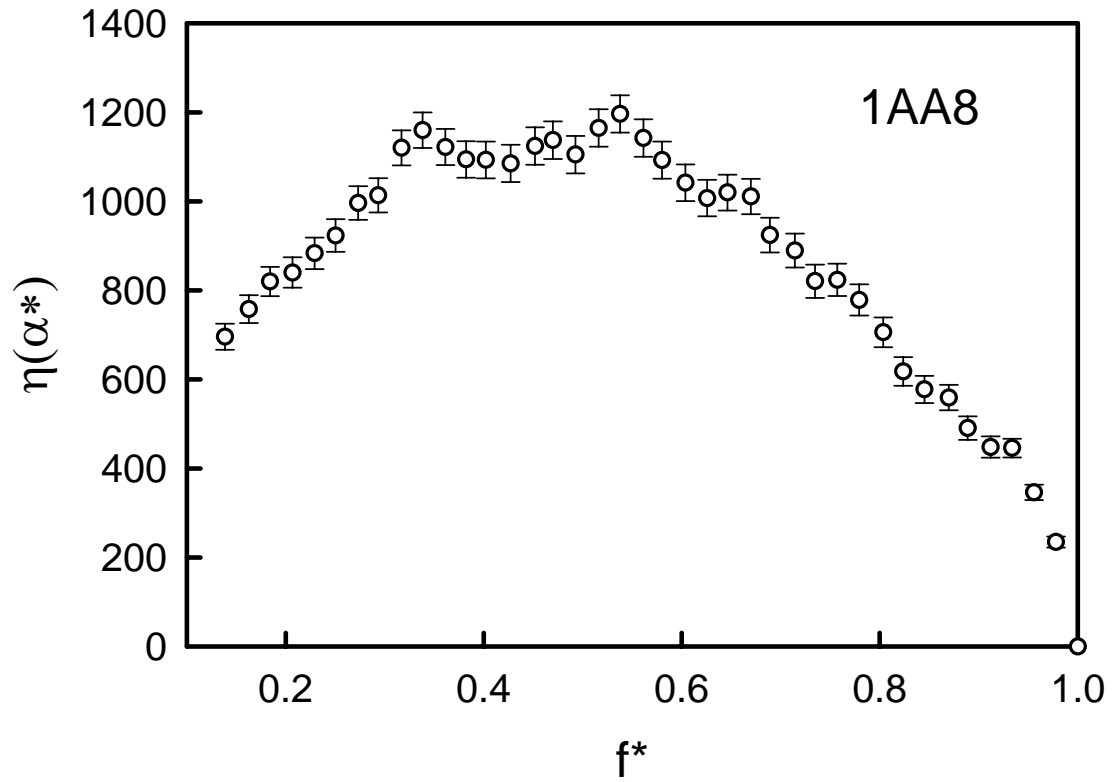


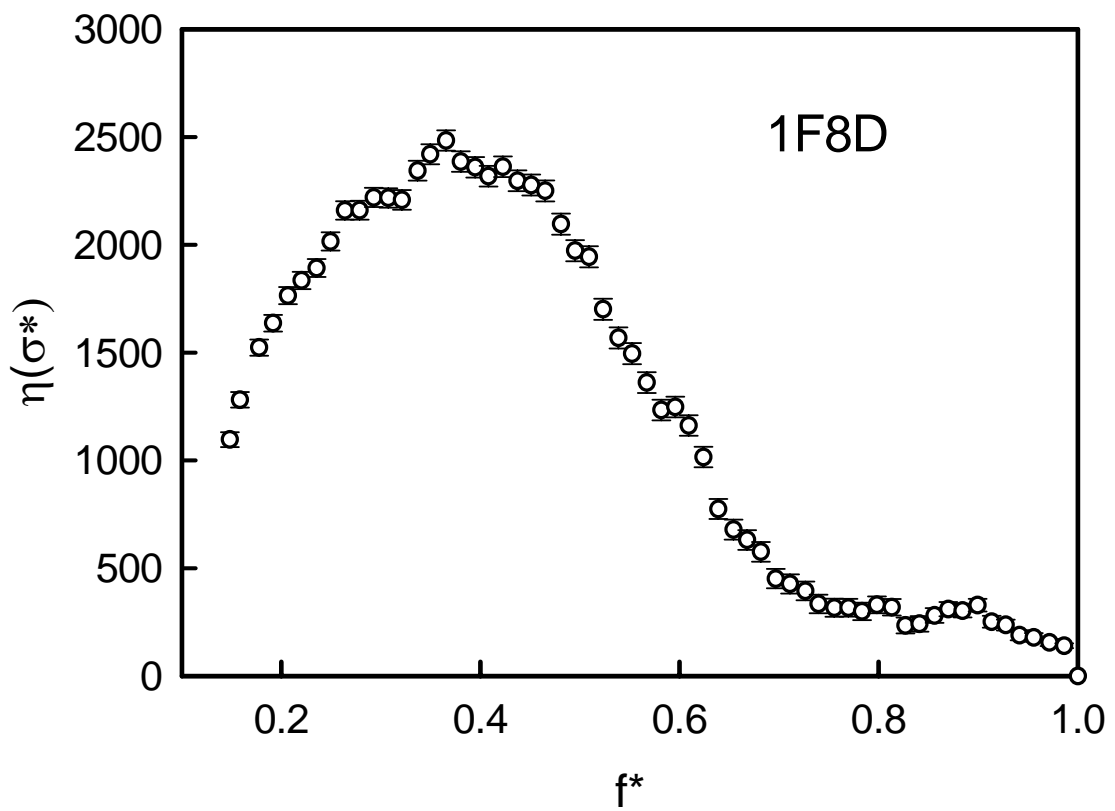
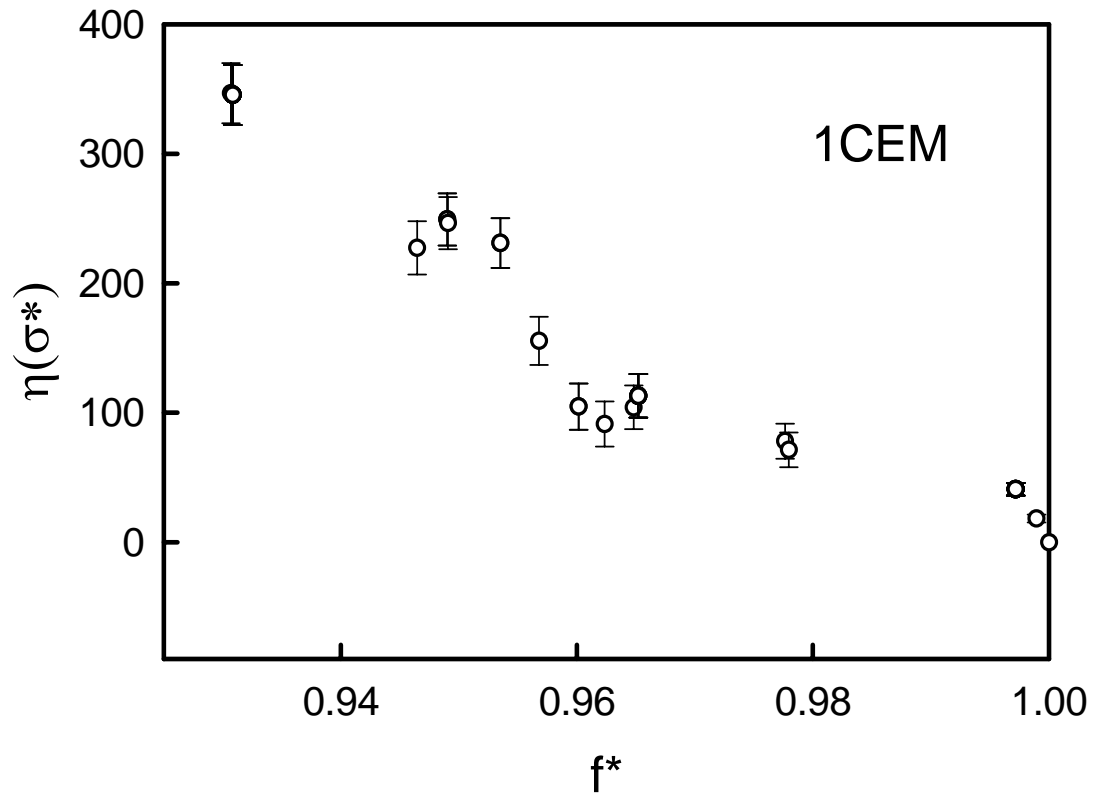






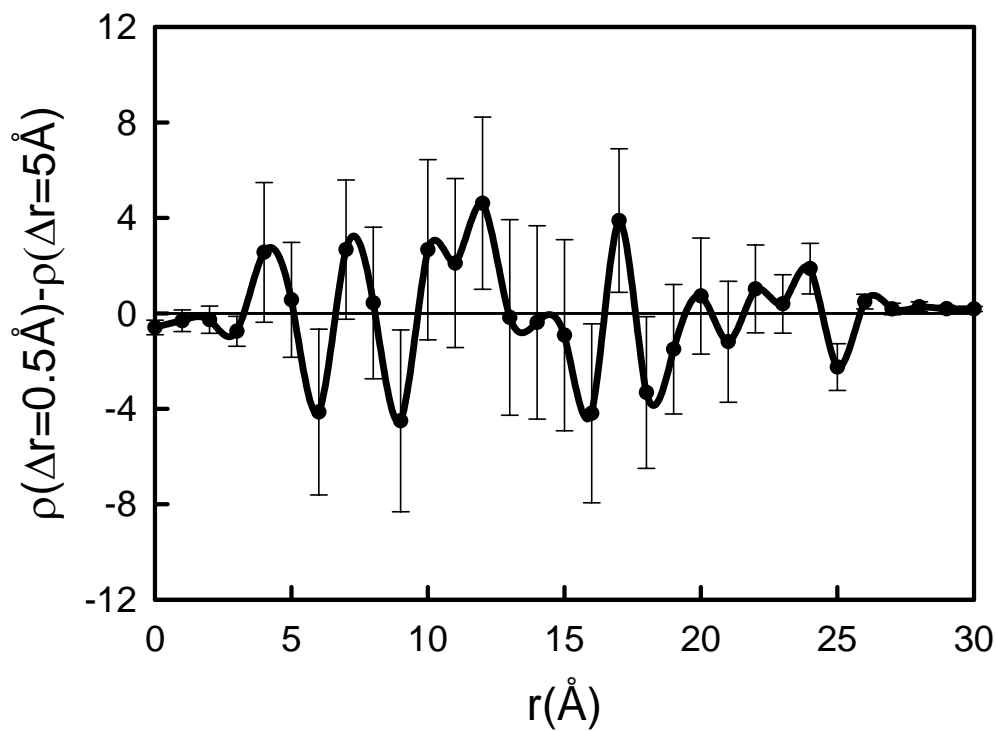
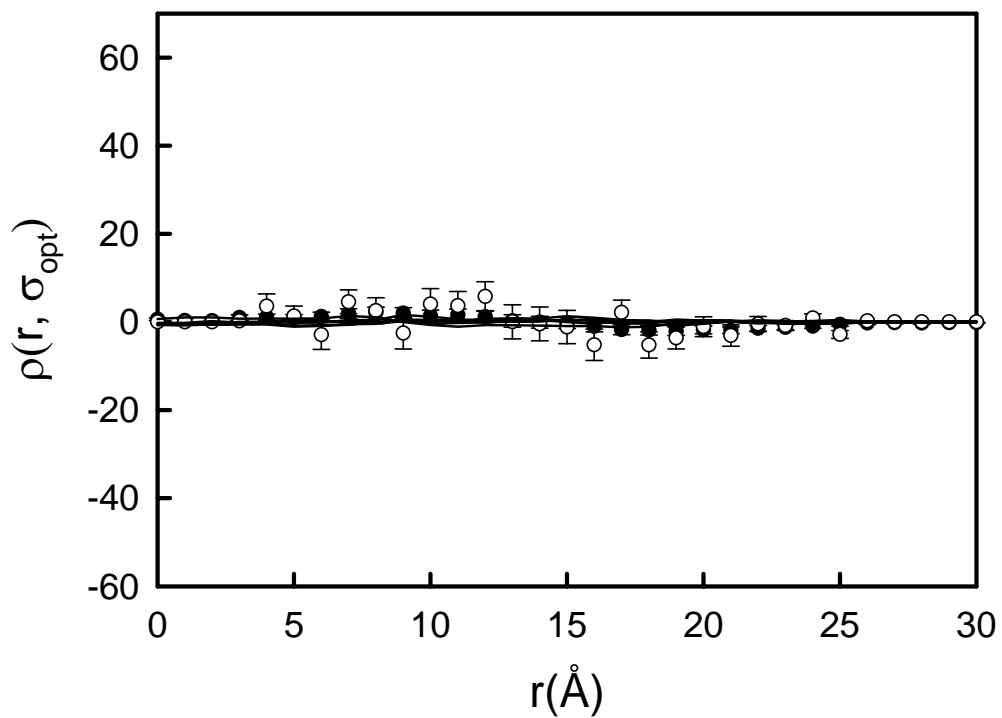




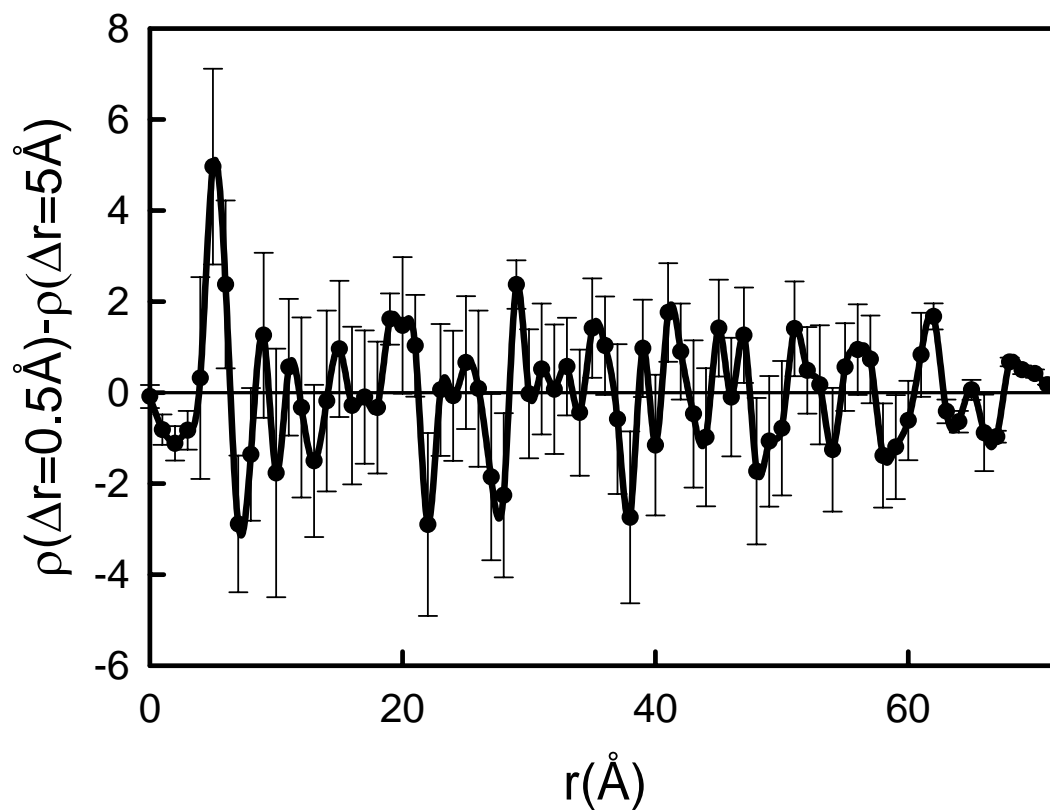
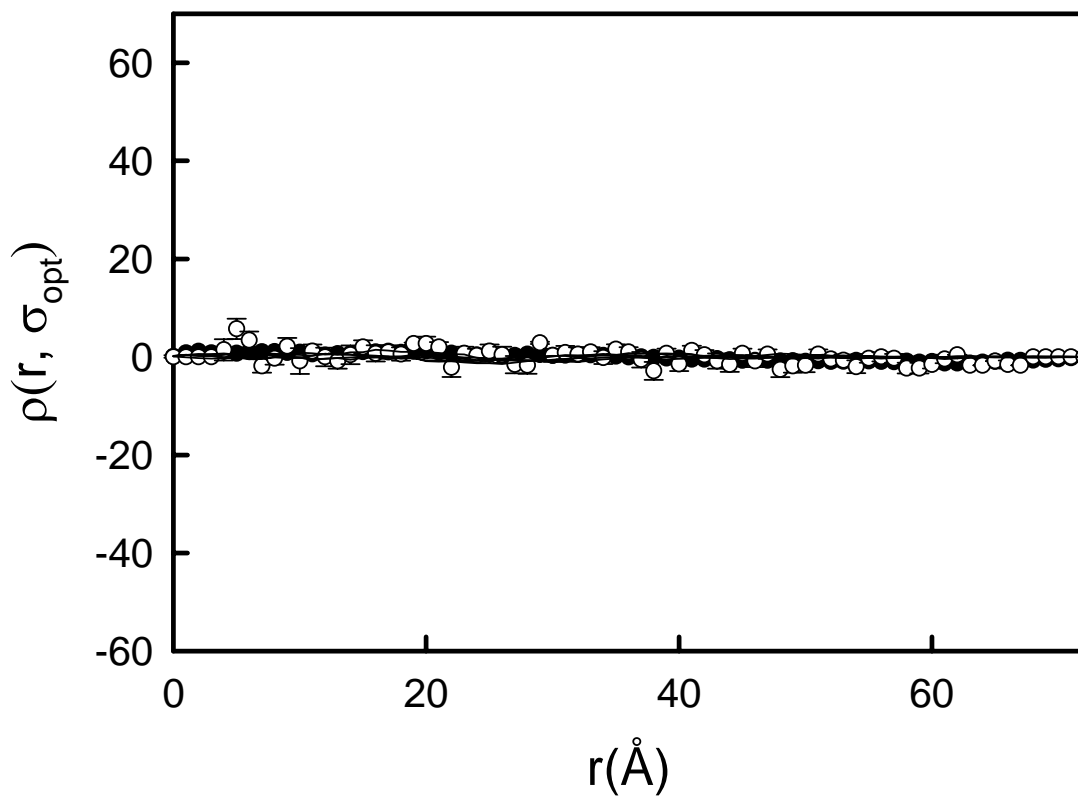


Apéndice C: Representaciones de ρ frente a distancia

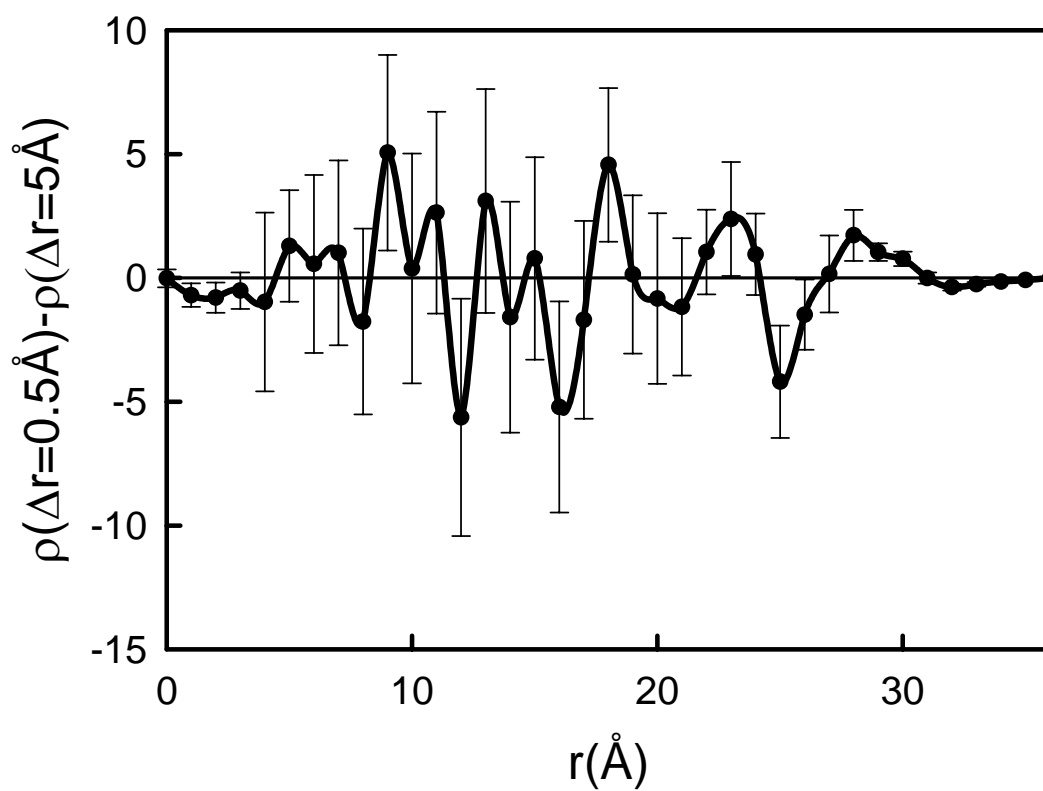
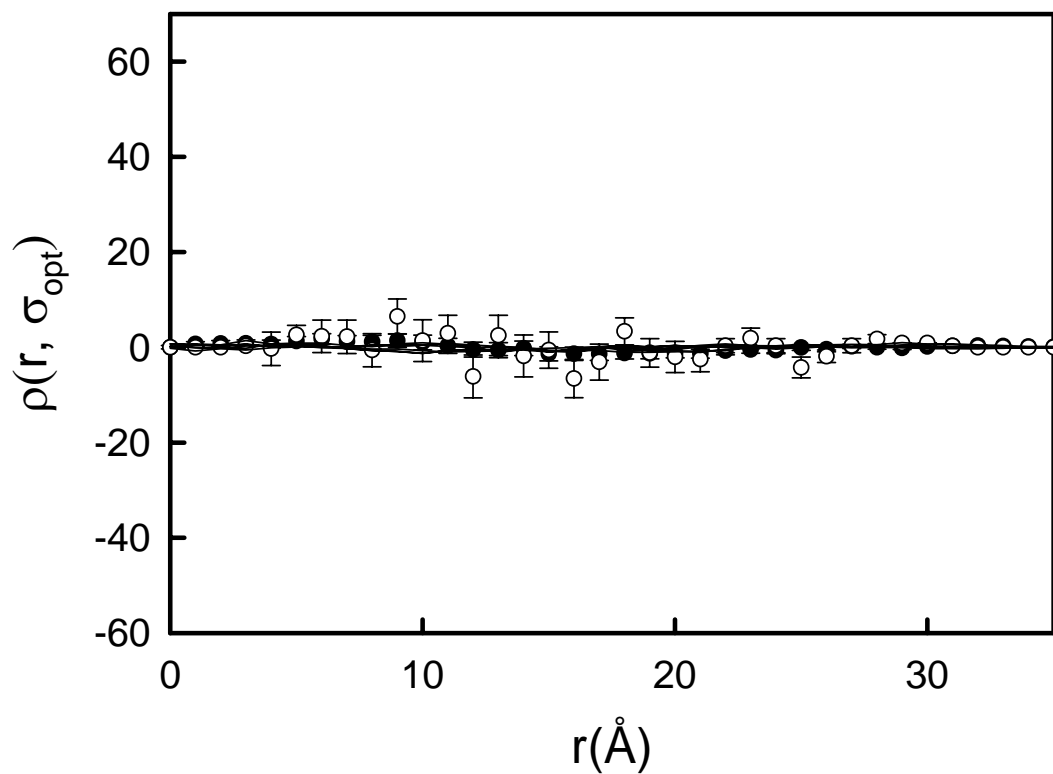
1PDC



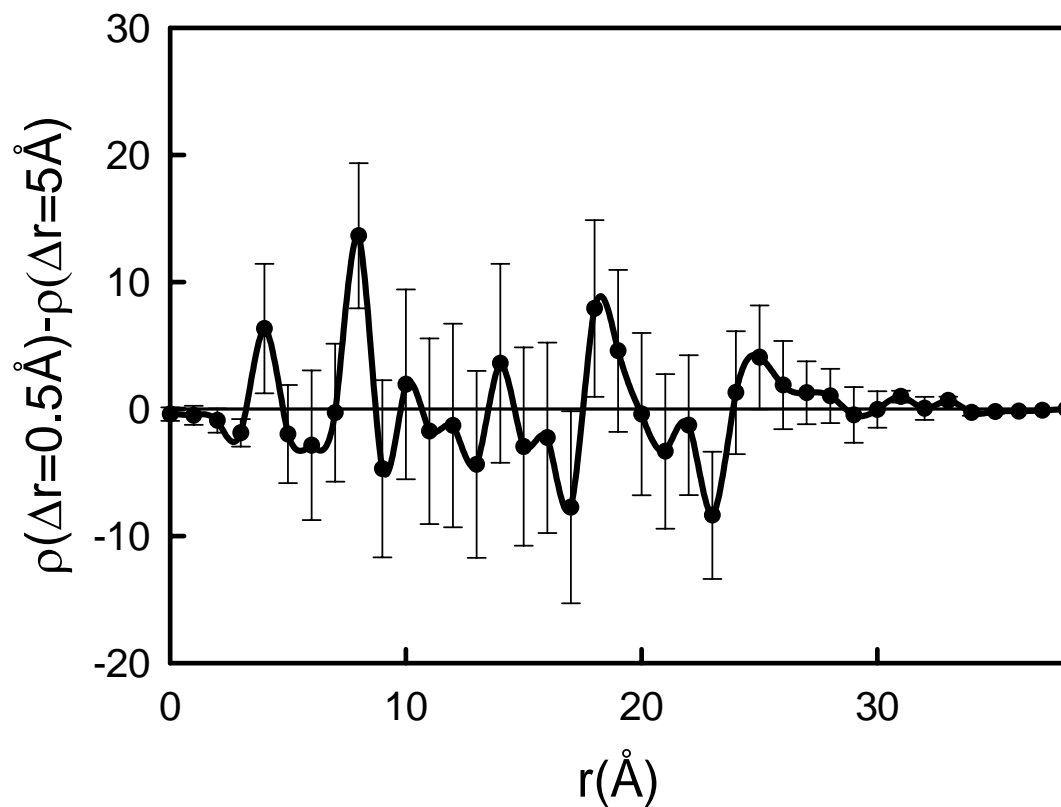
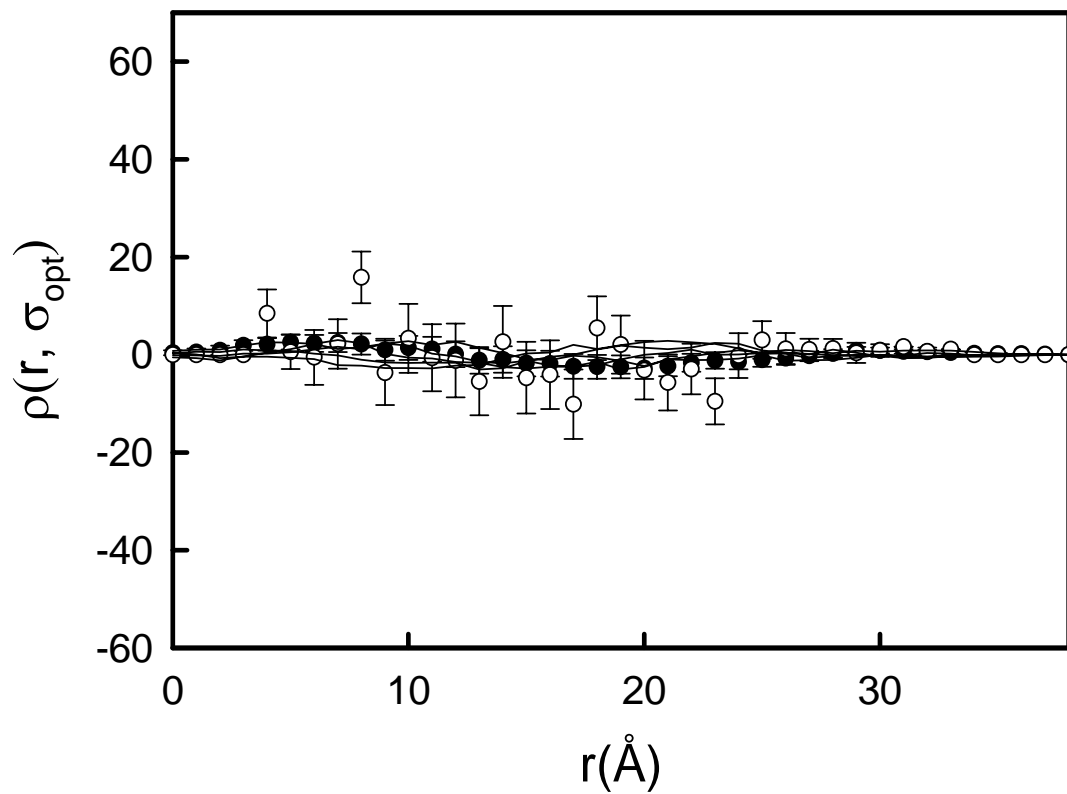
1VDF



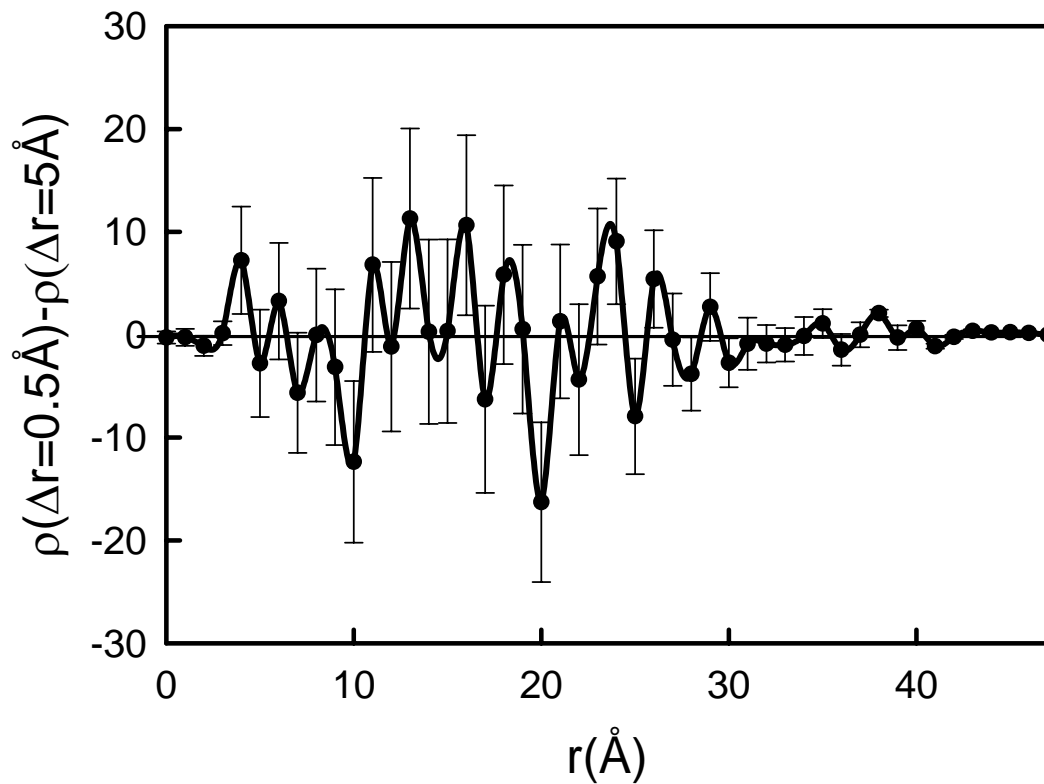
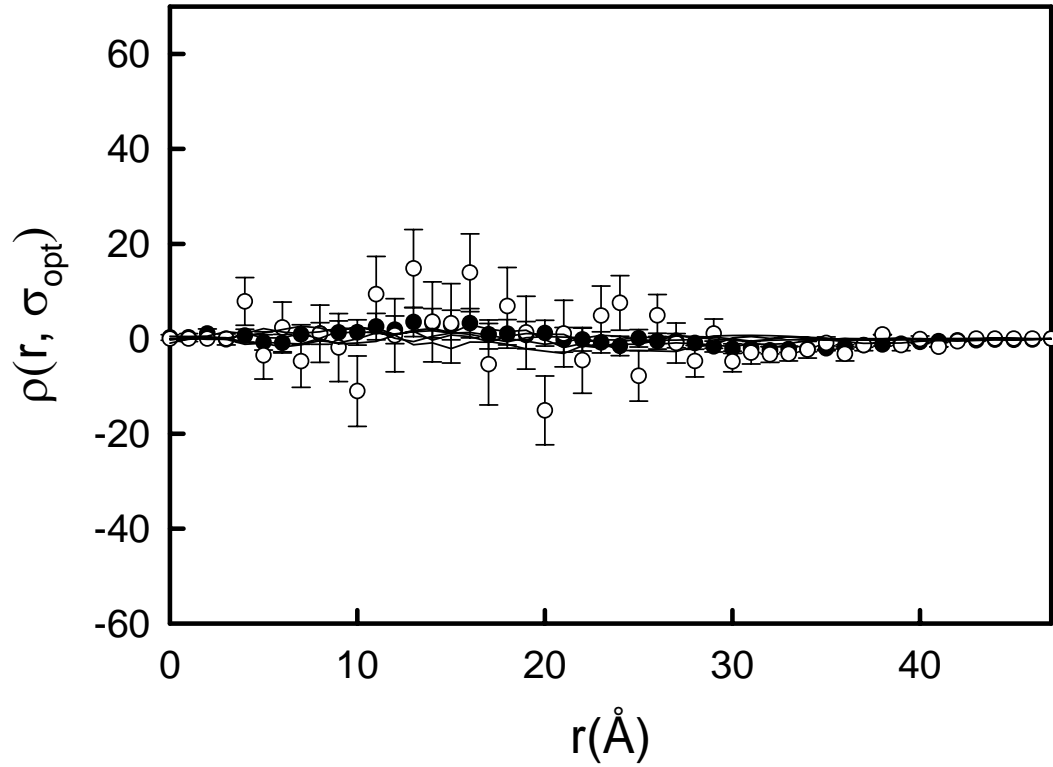
1AHL



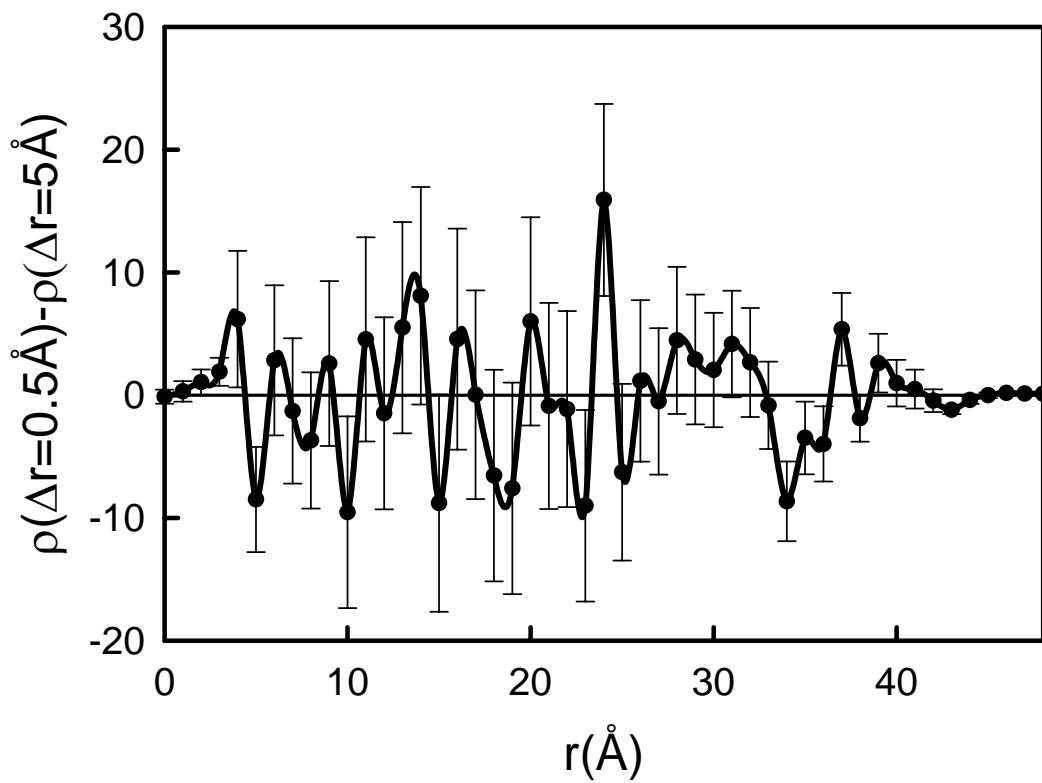
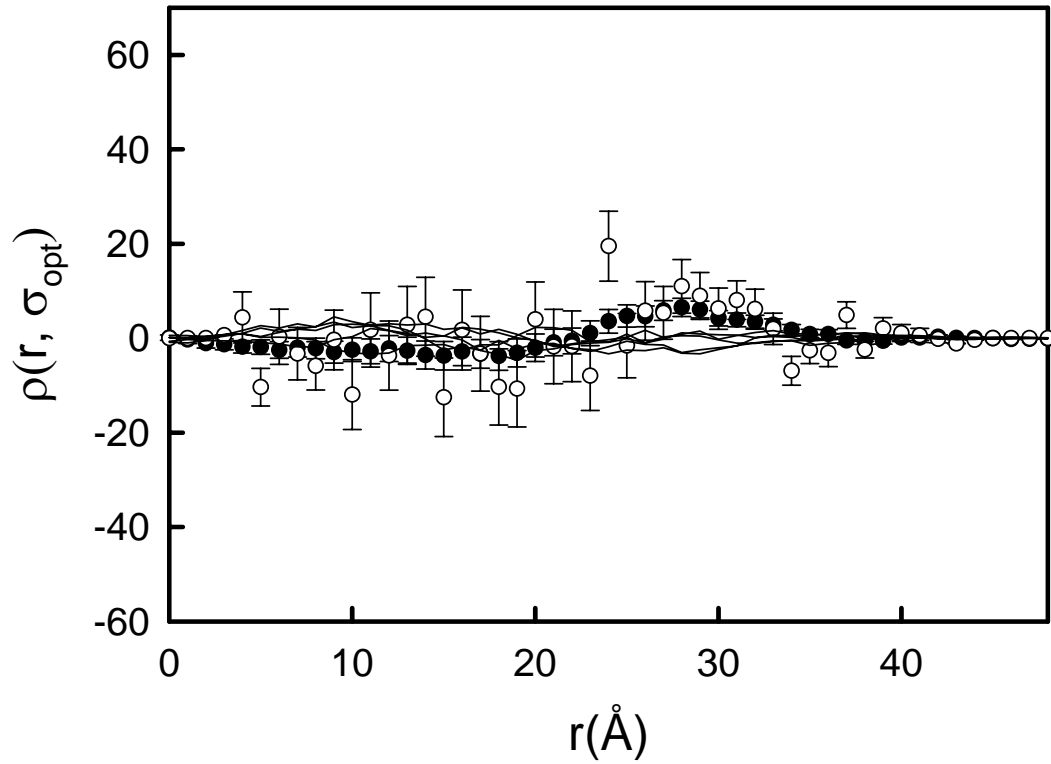
1NPO



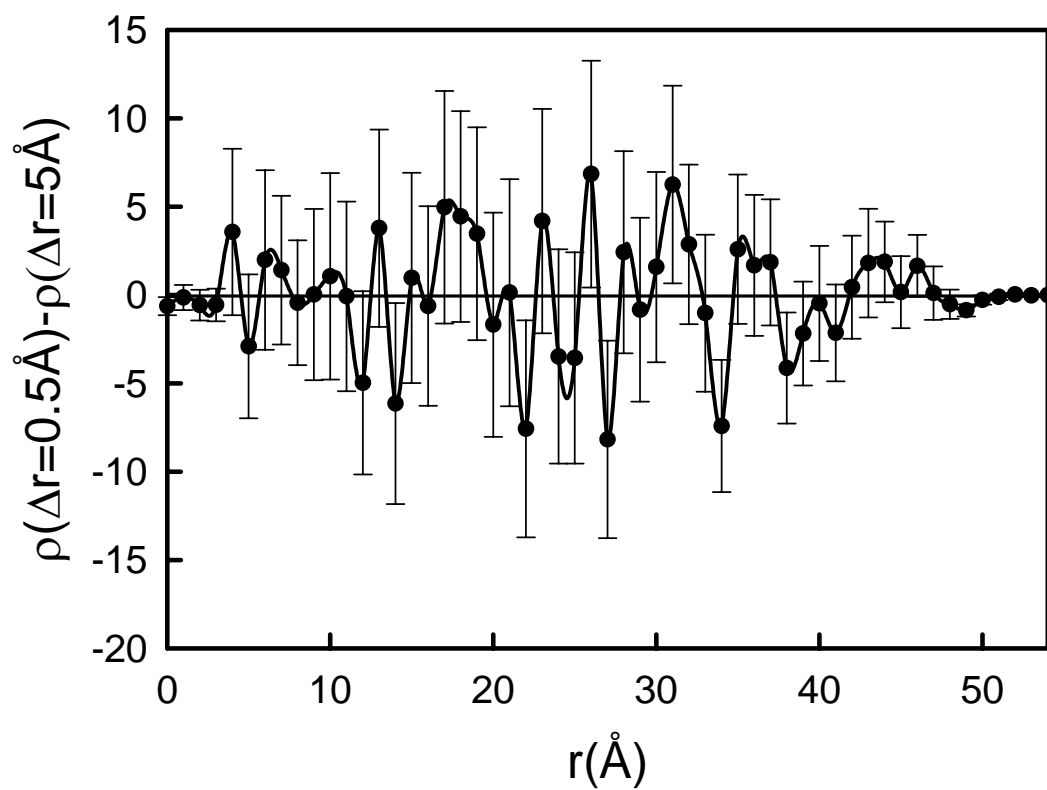
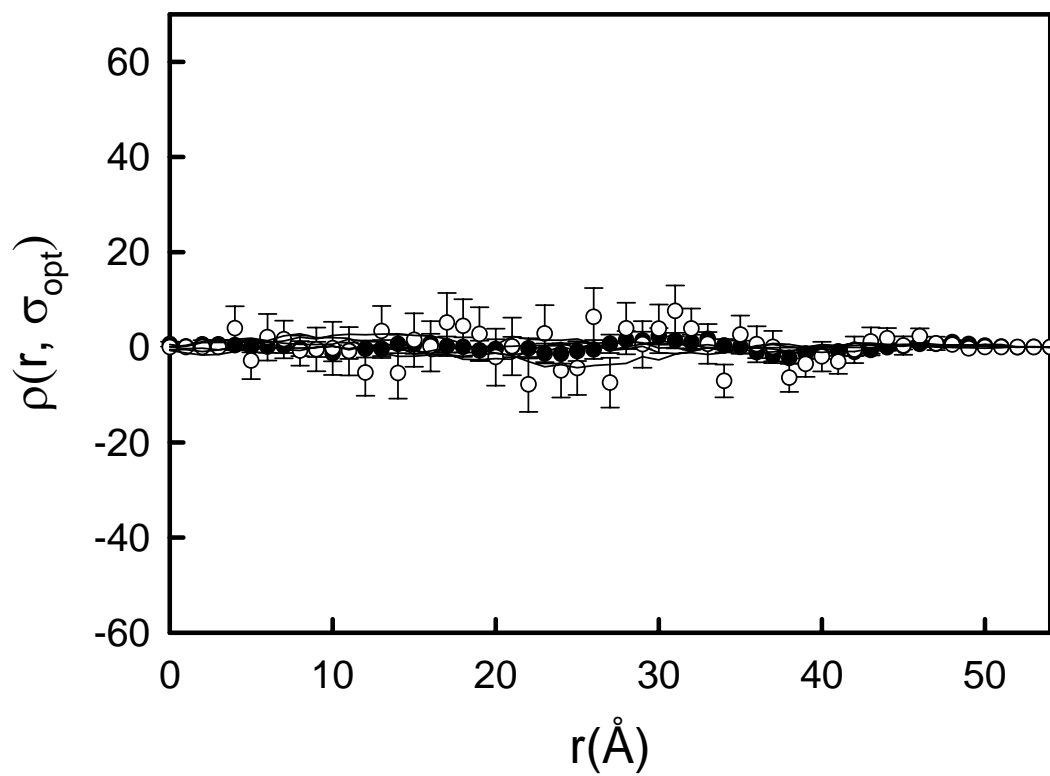
2HGF



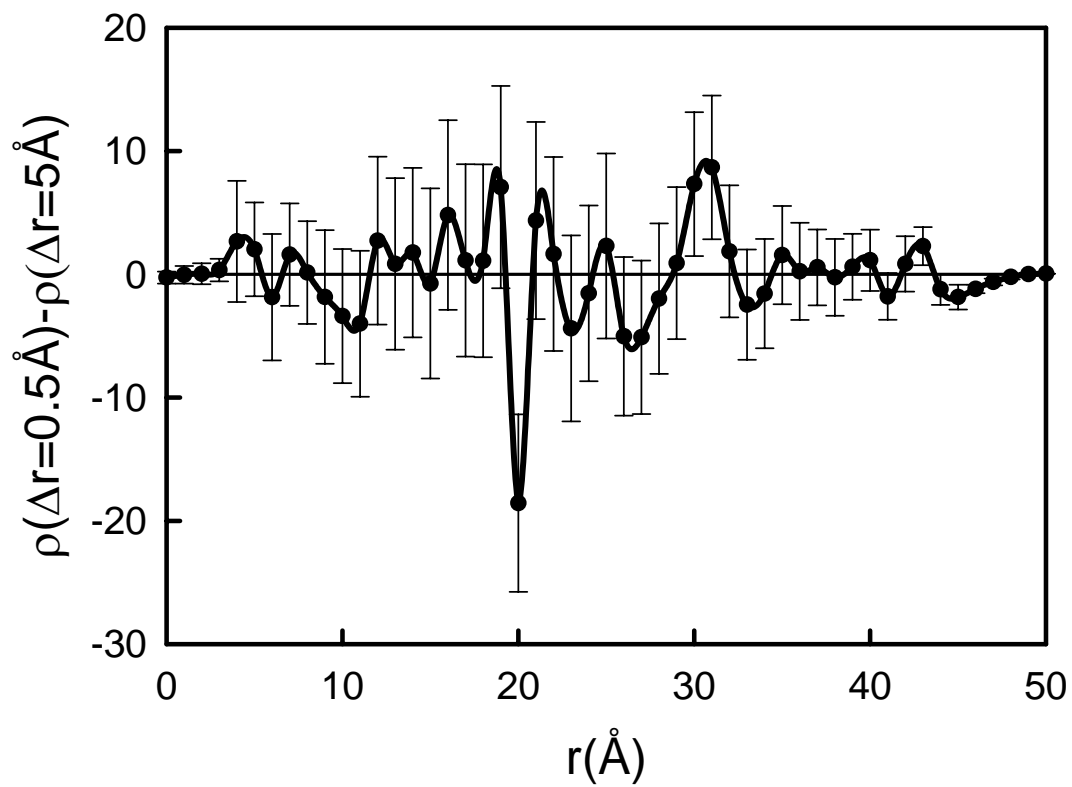
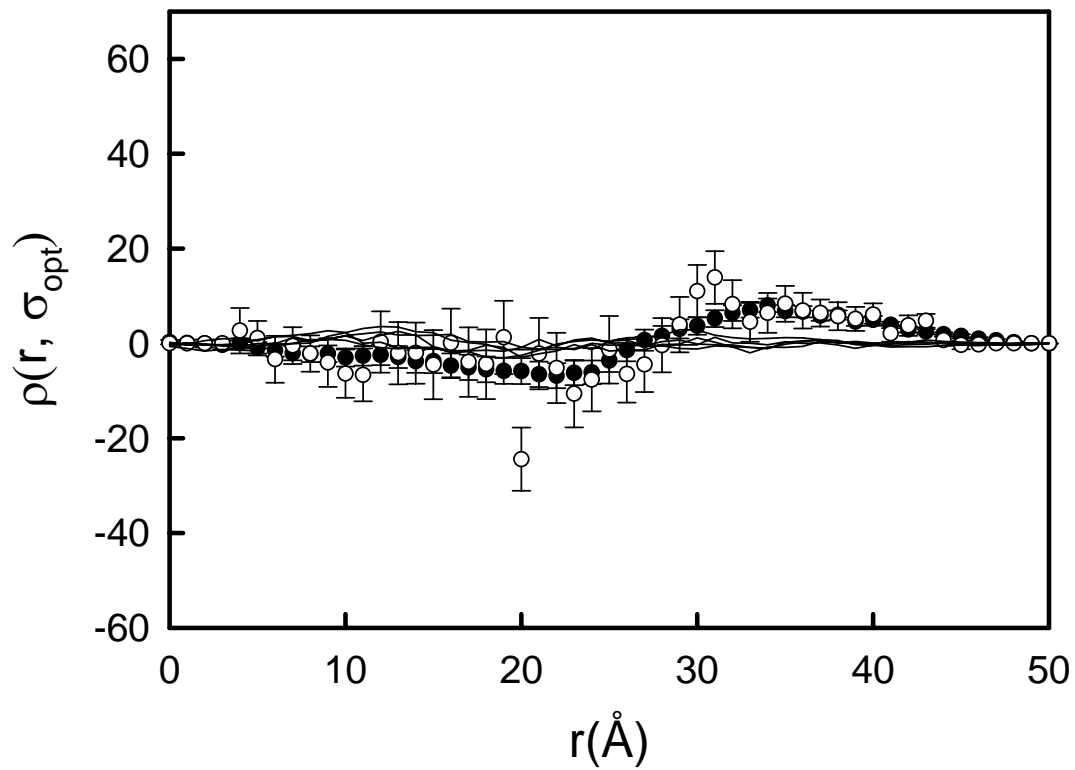
1JPC



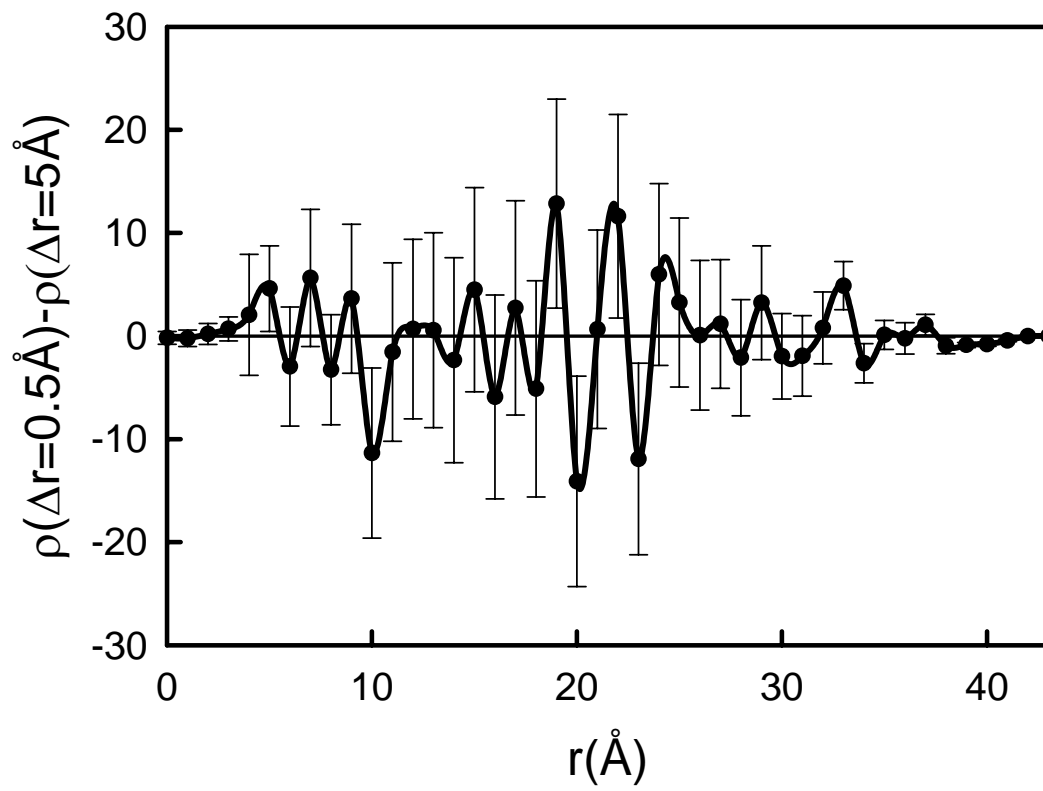
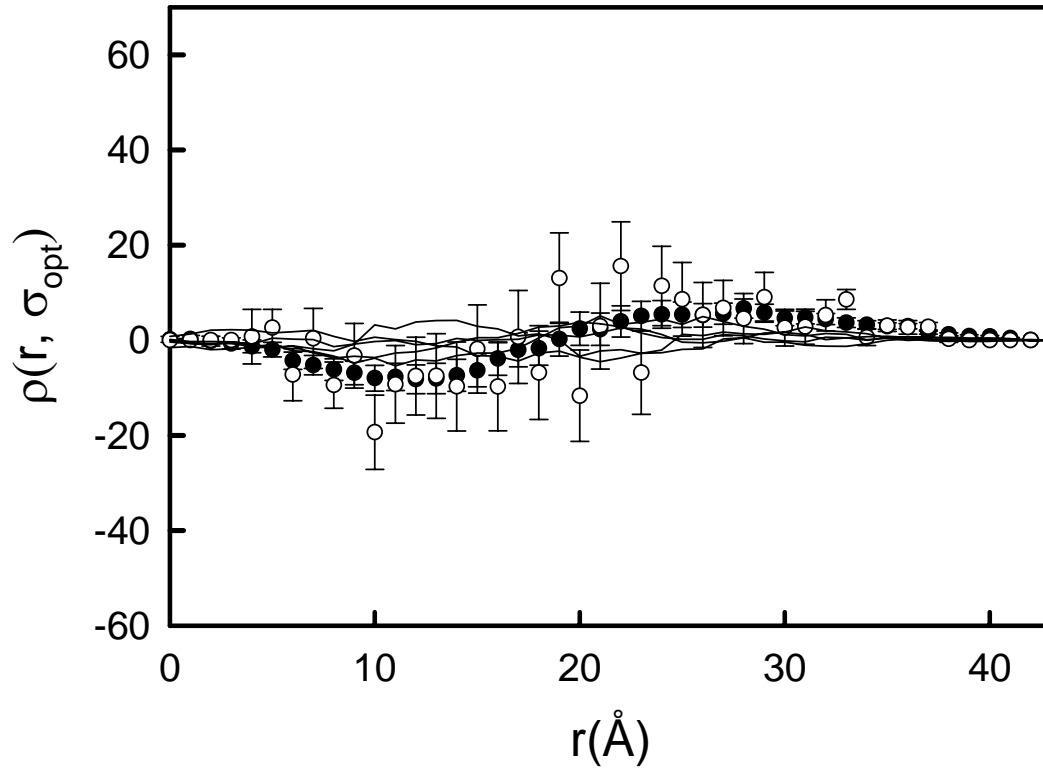
1YTF



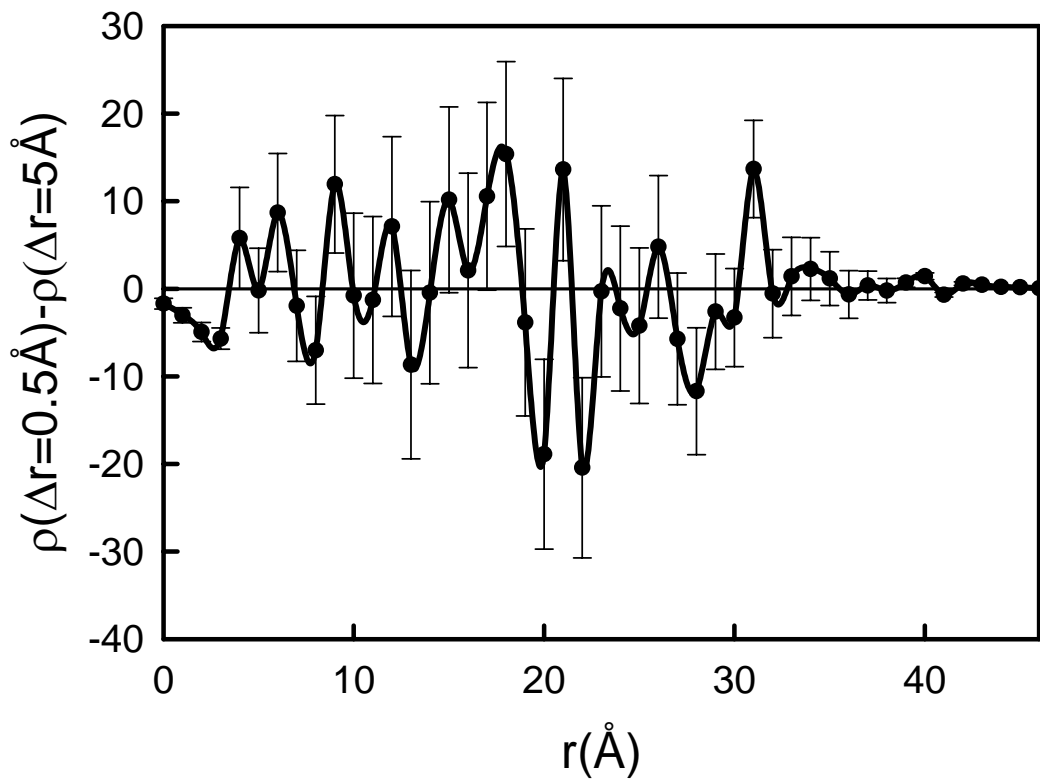
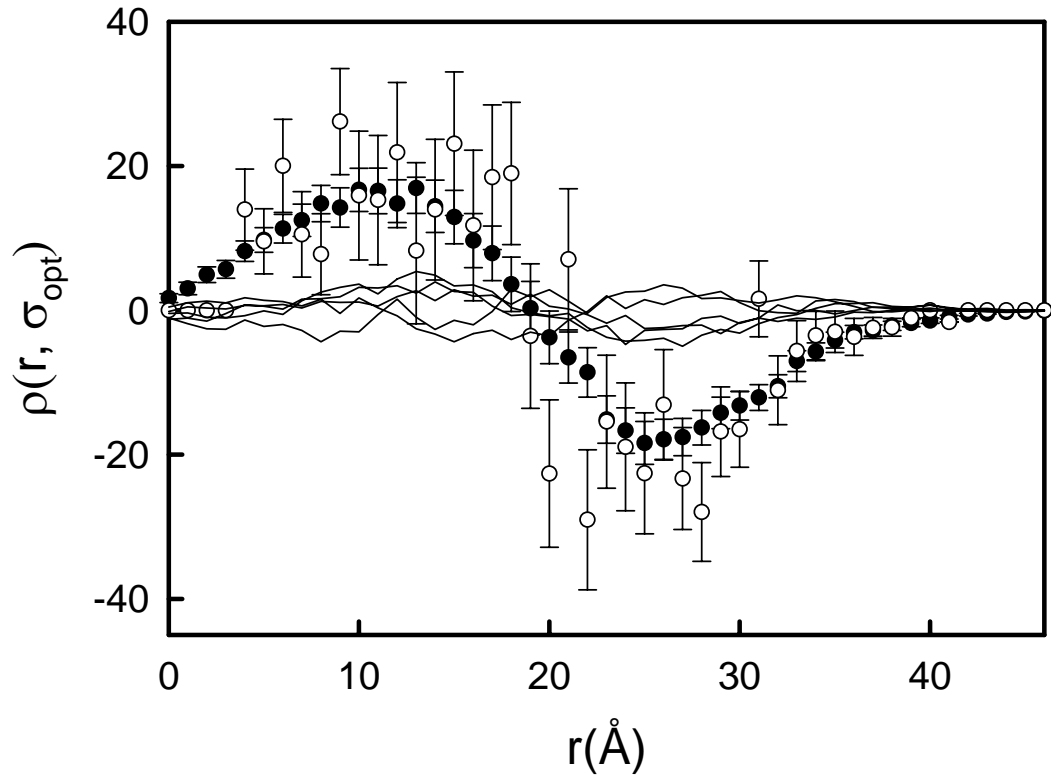
2CY3



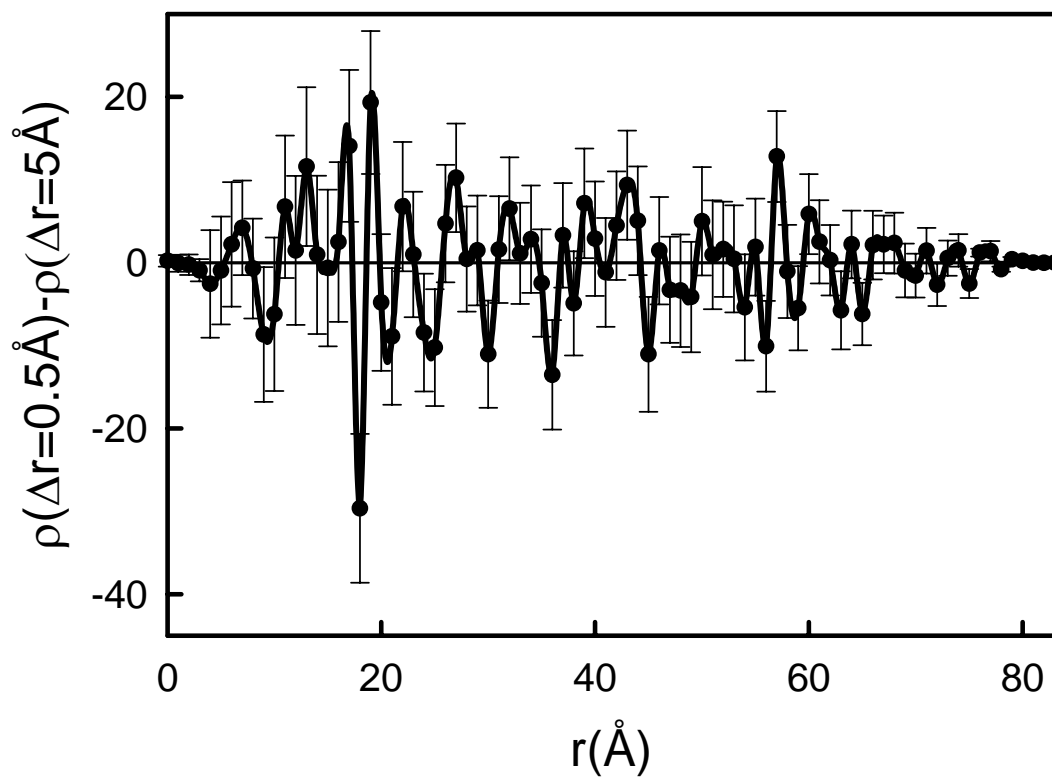
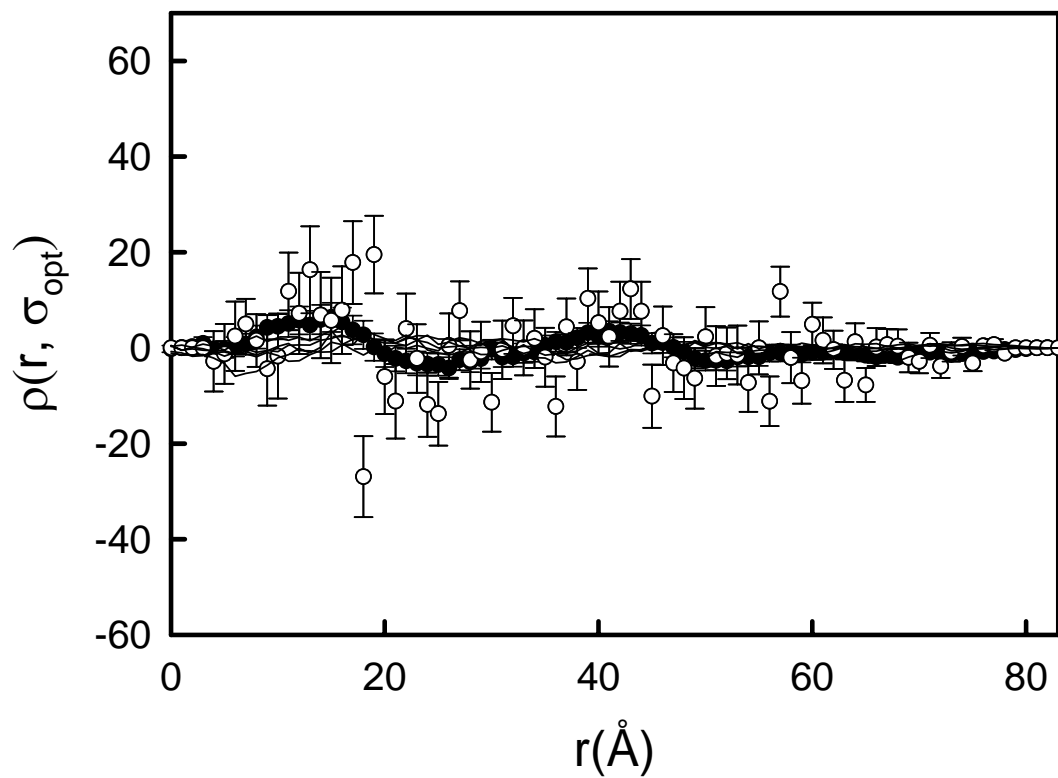
1HCD



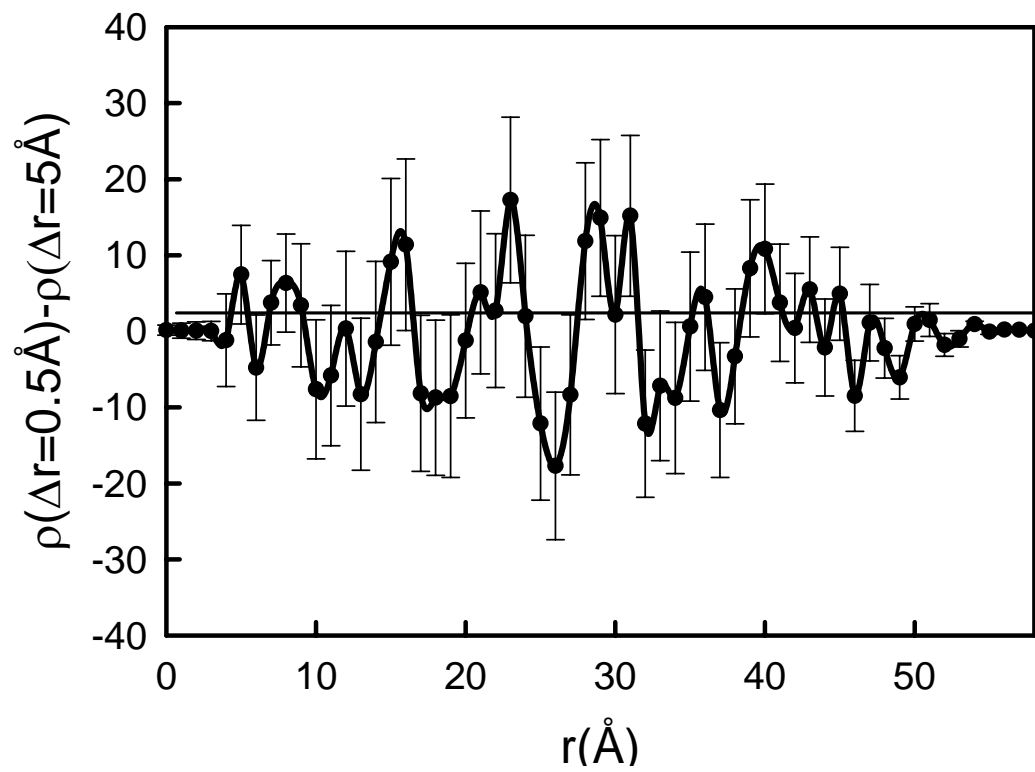
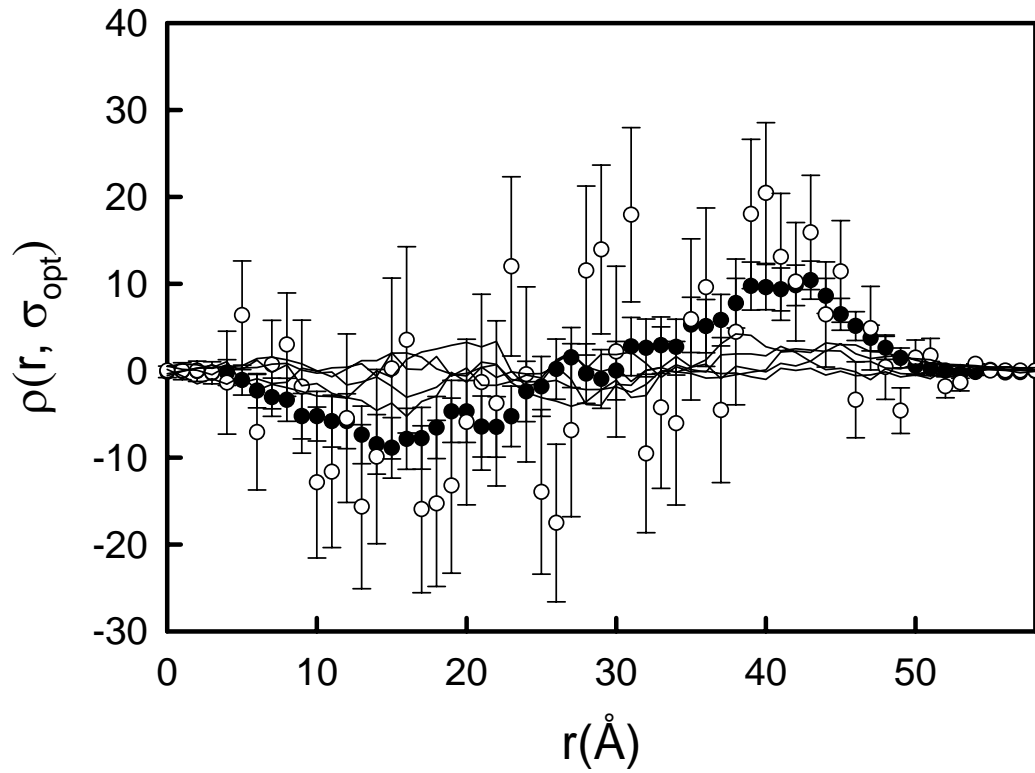
1RIE



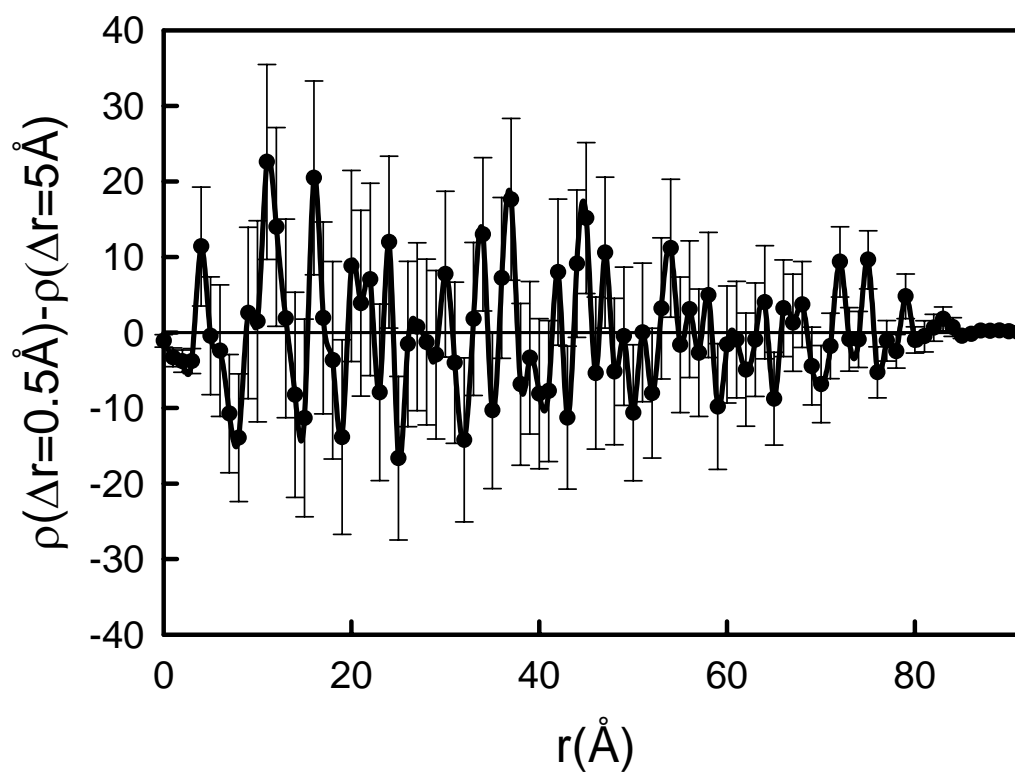
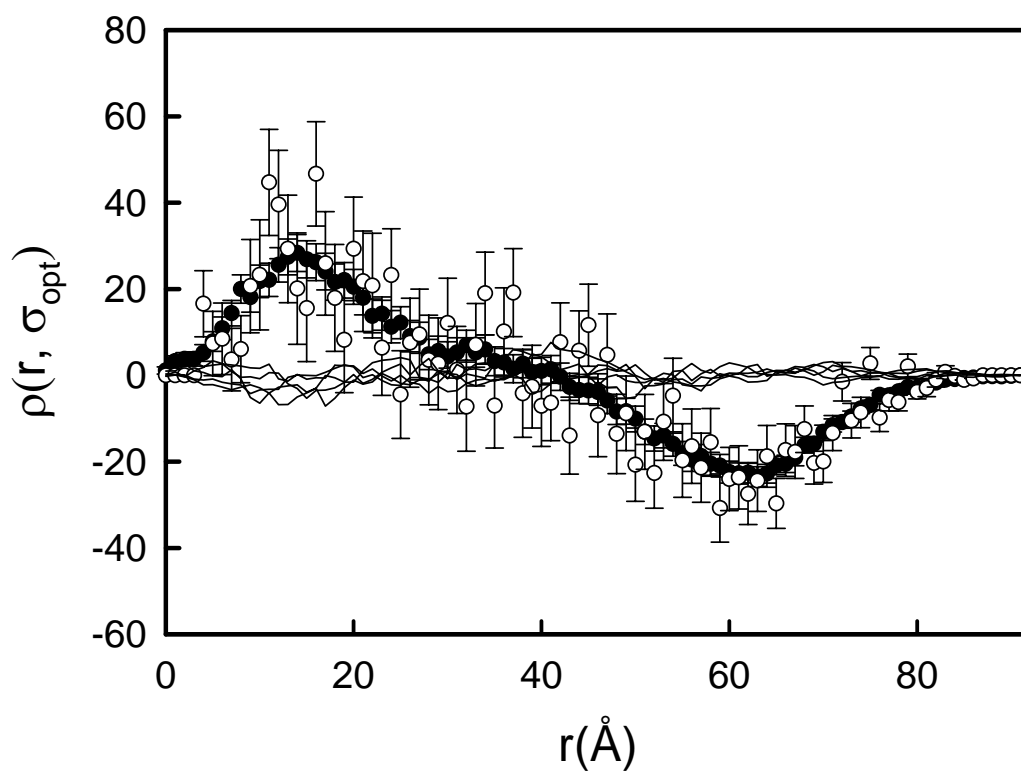
1DIV



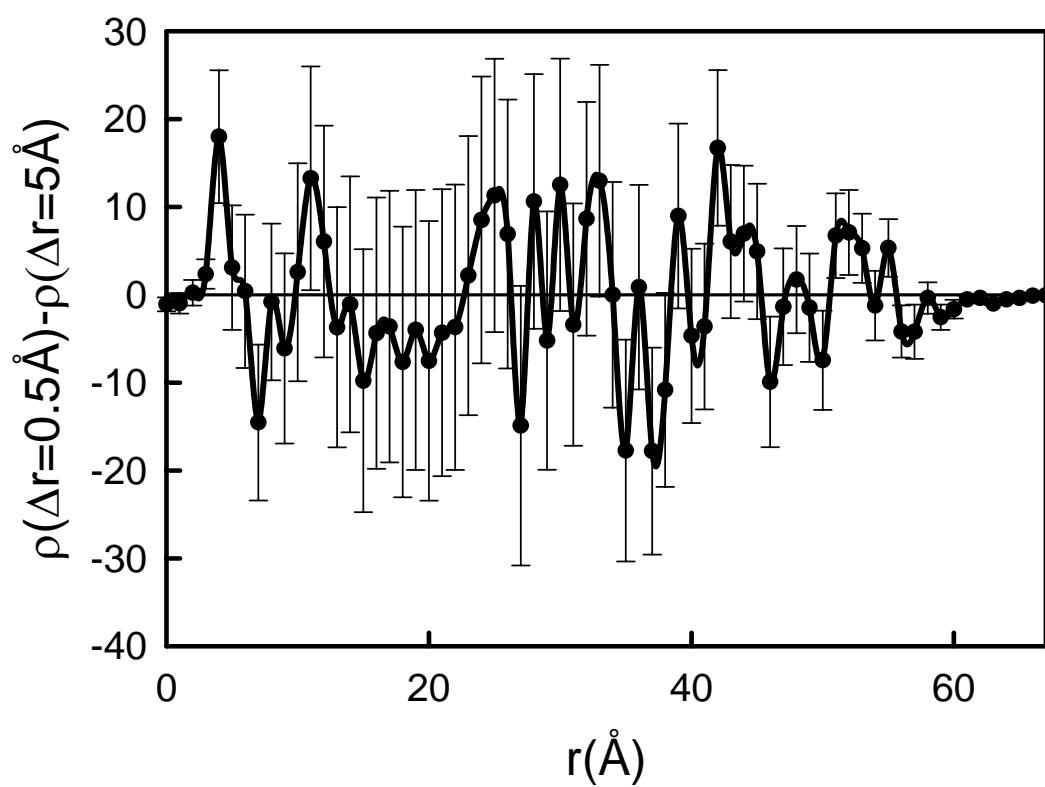
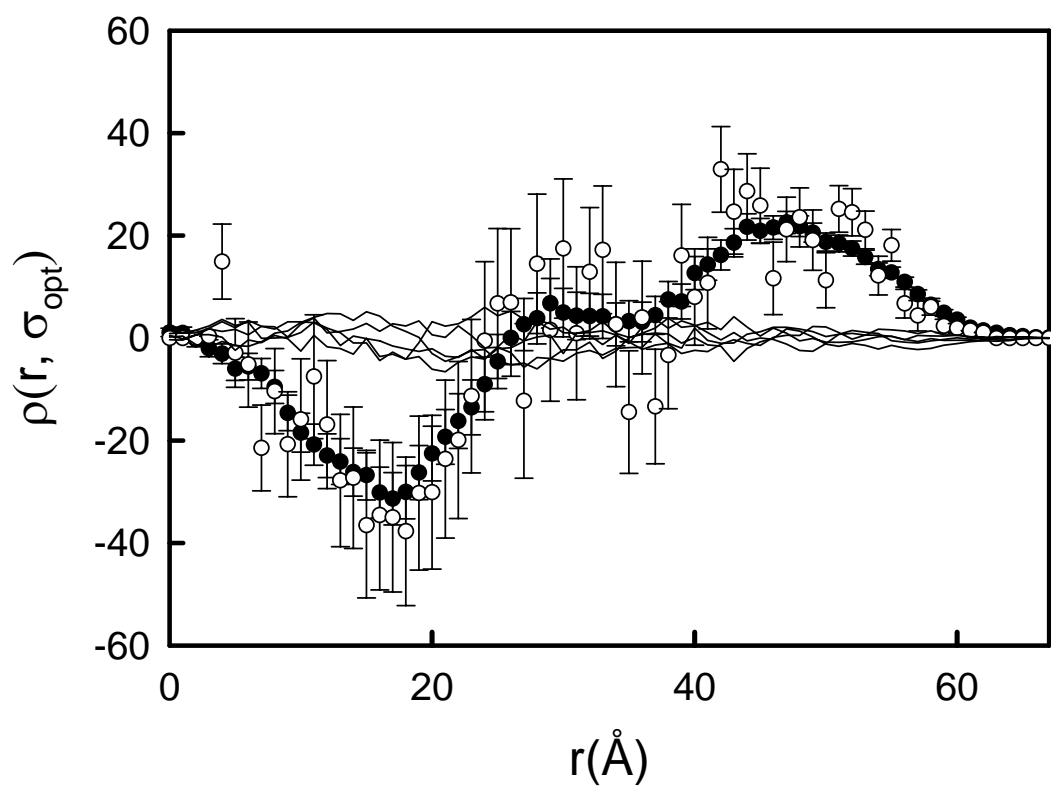
1CUK



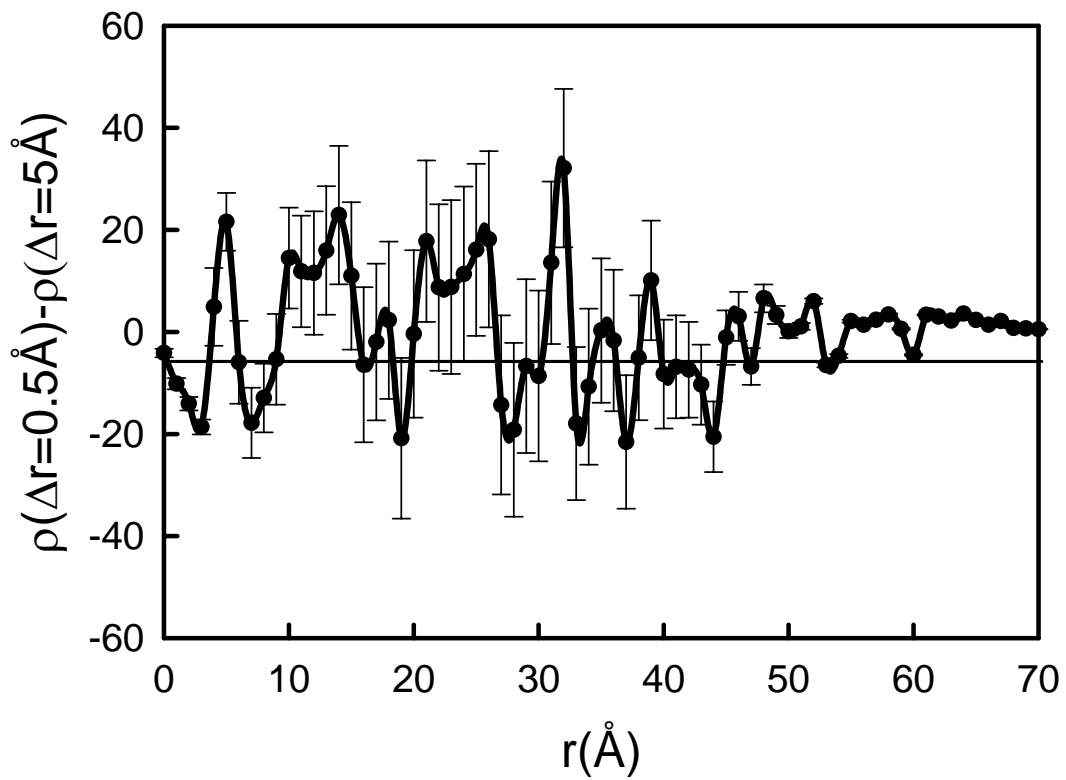
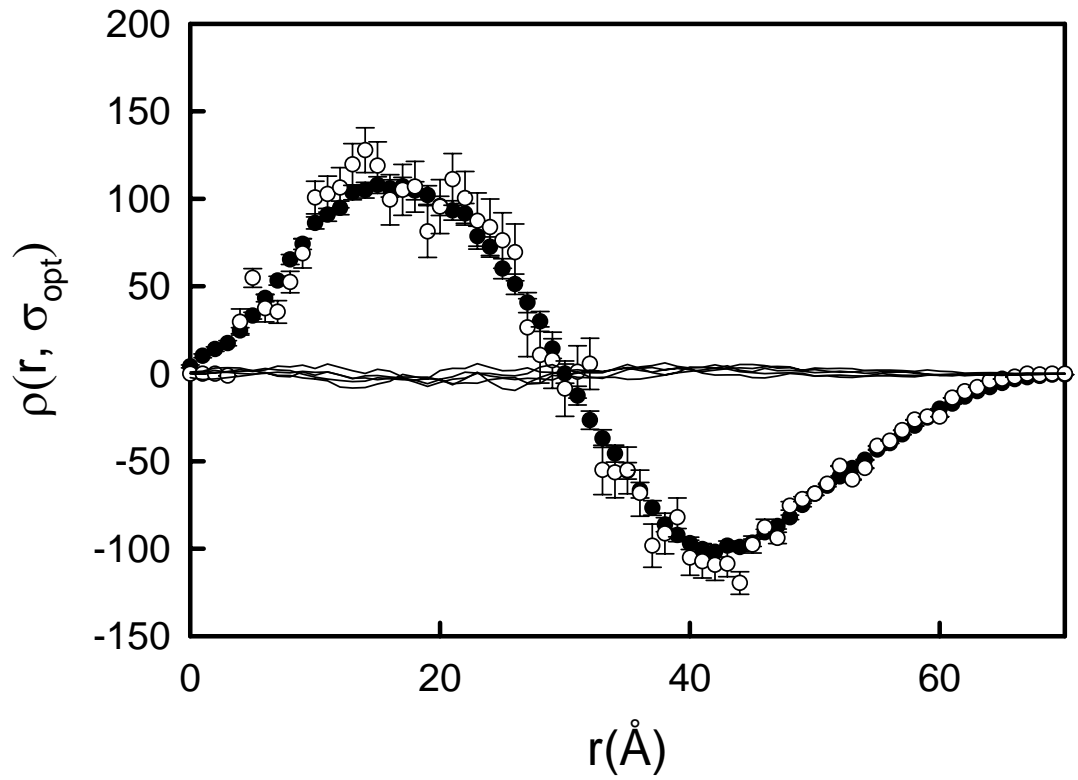
1LRV



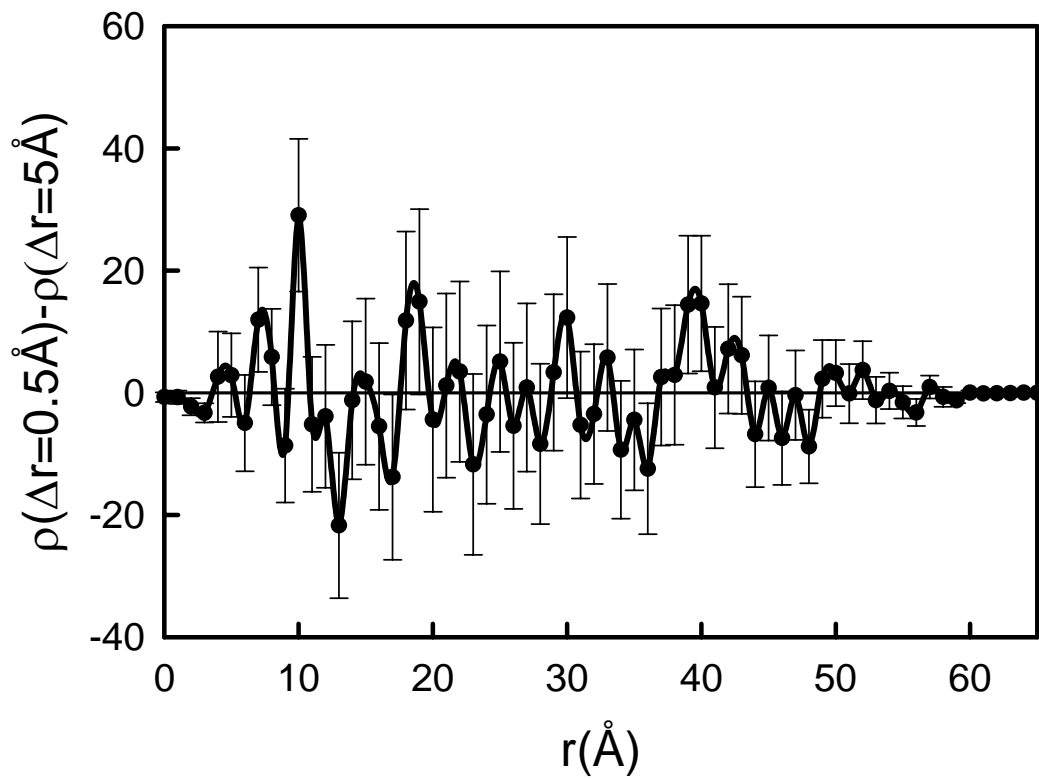
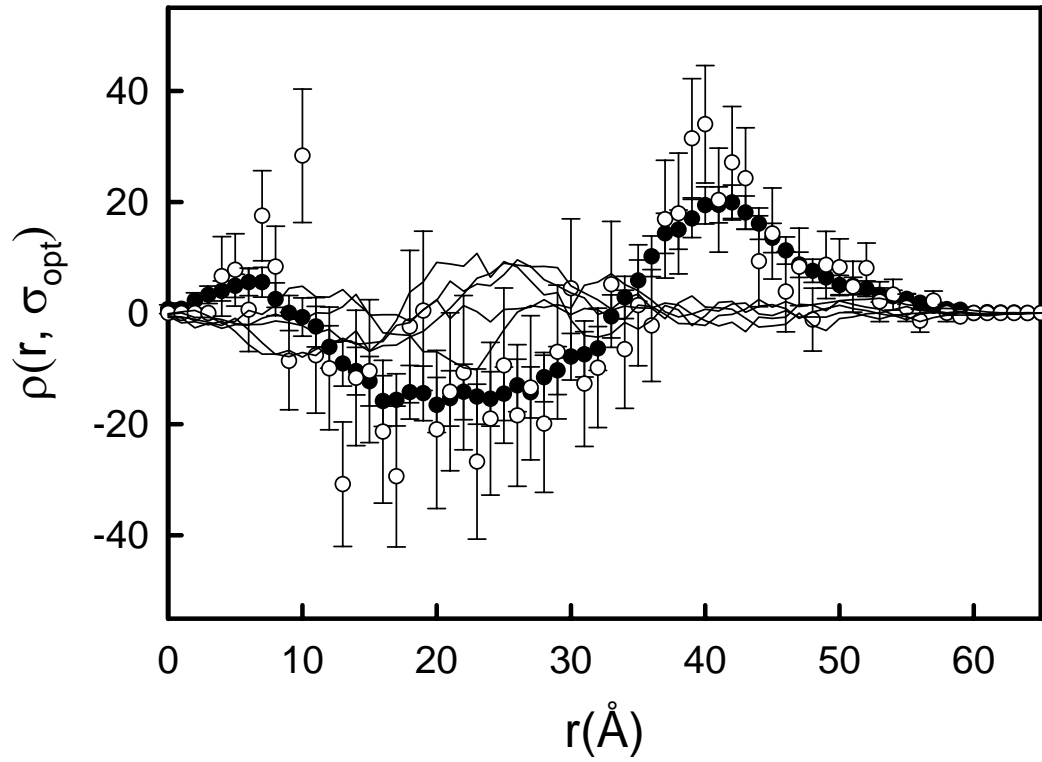
3AAH



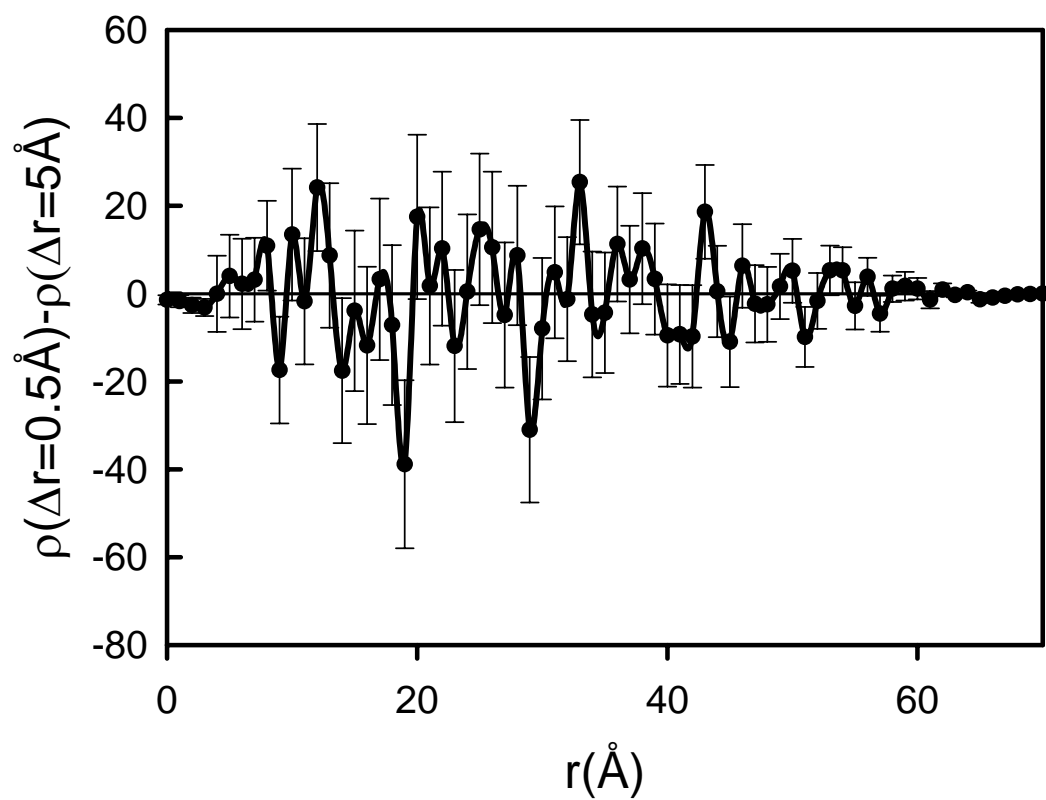
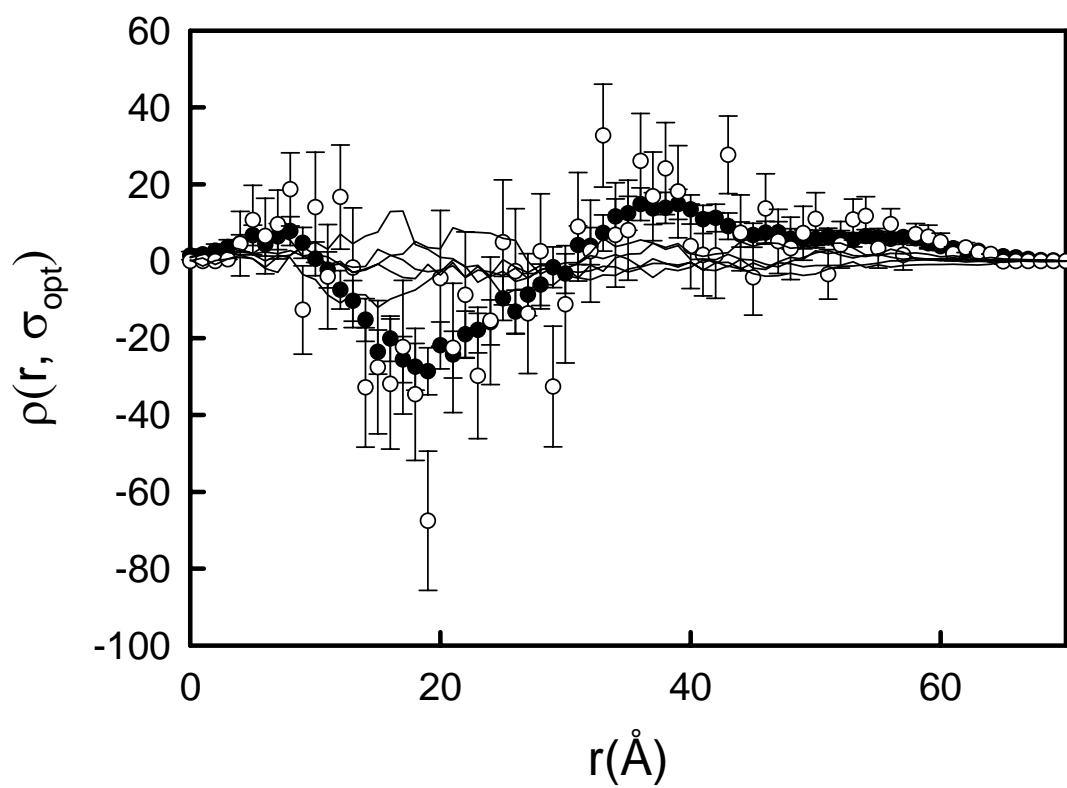
1BG5



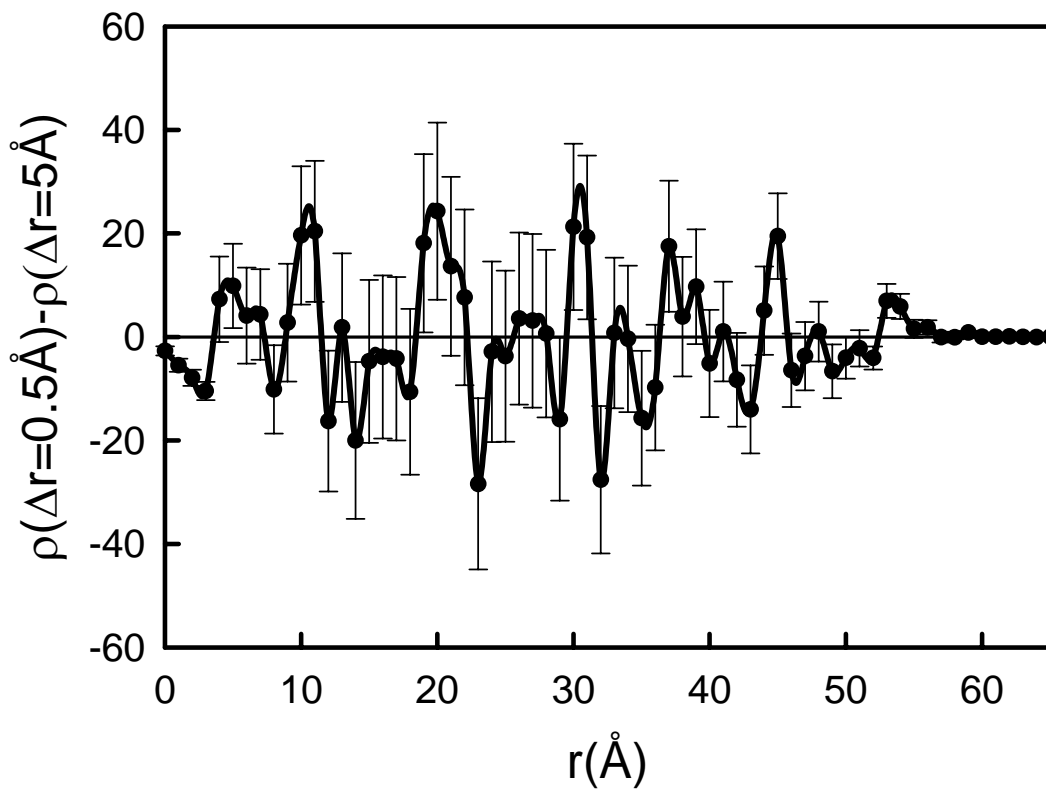
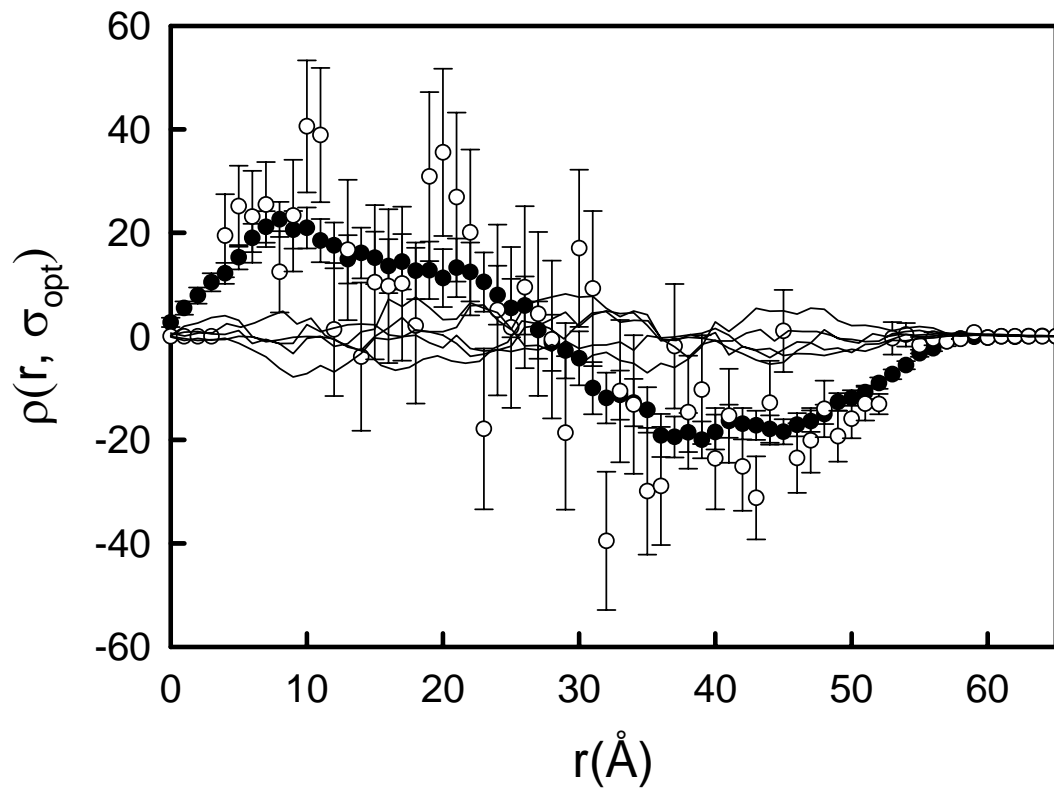
1PLQ



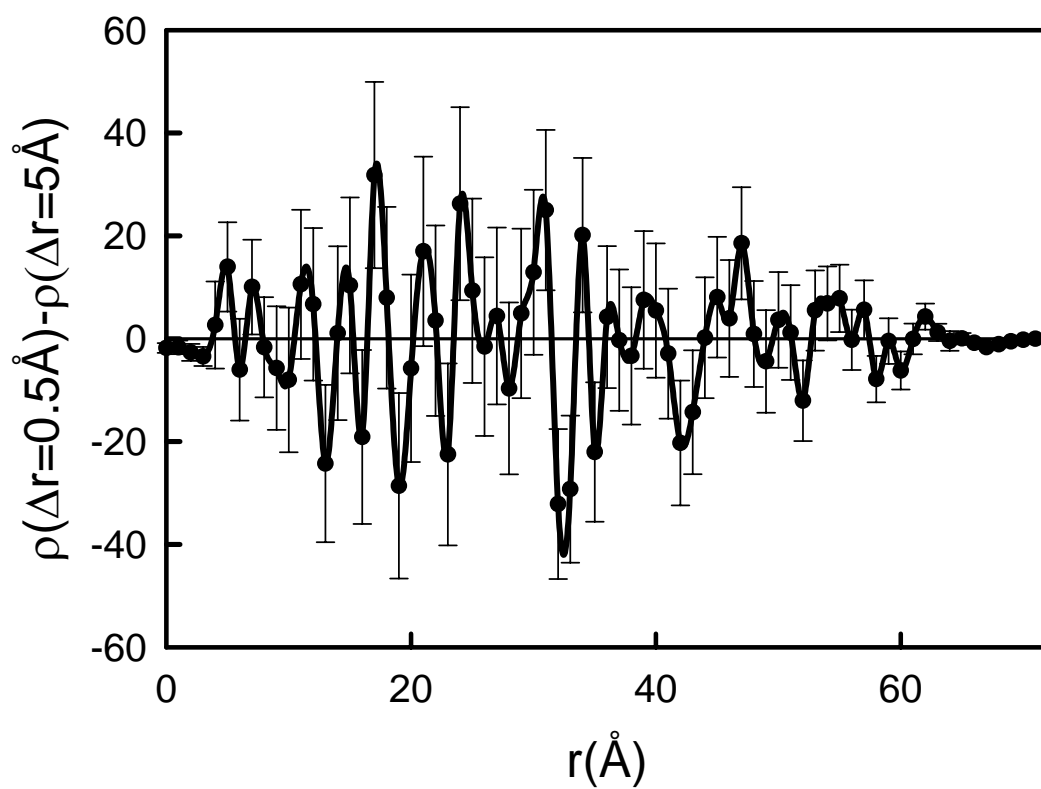
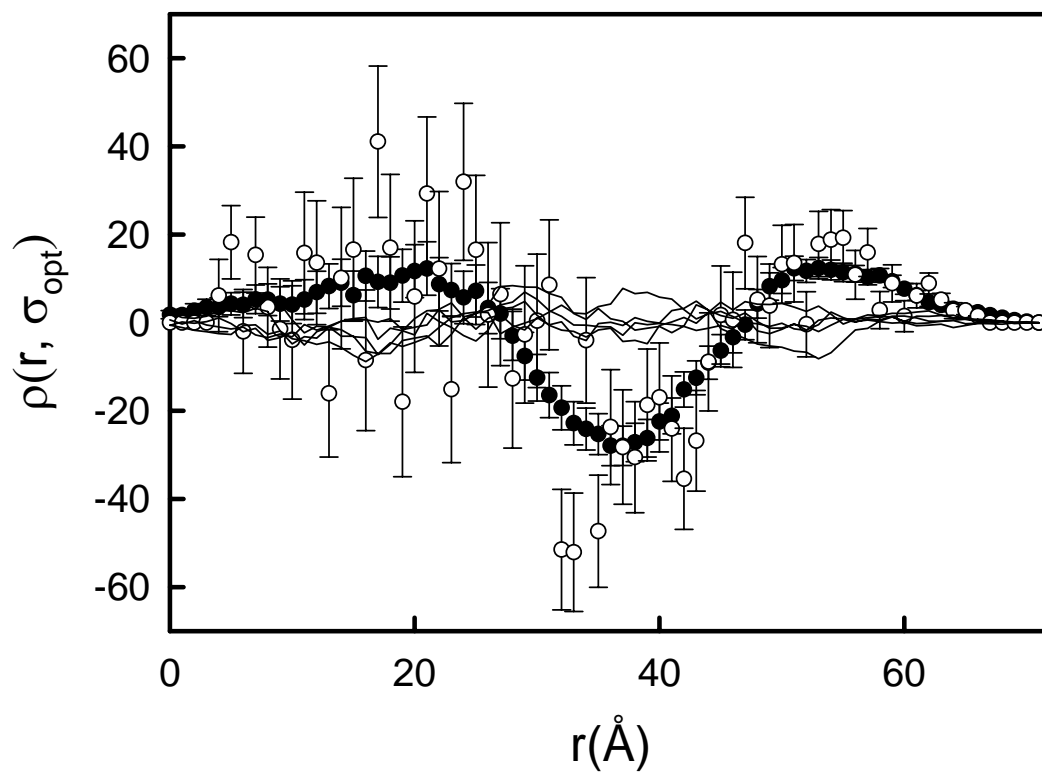
1LXA



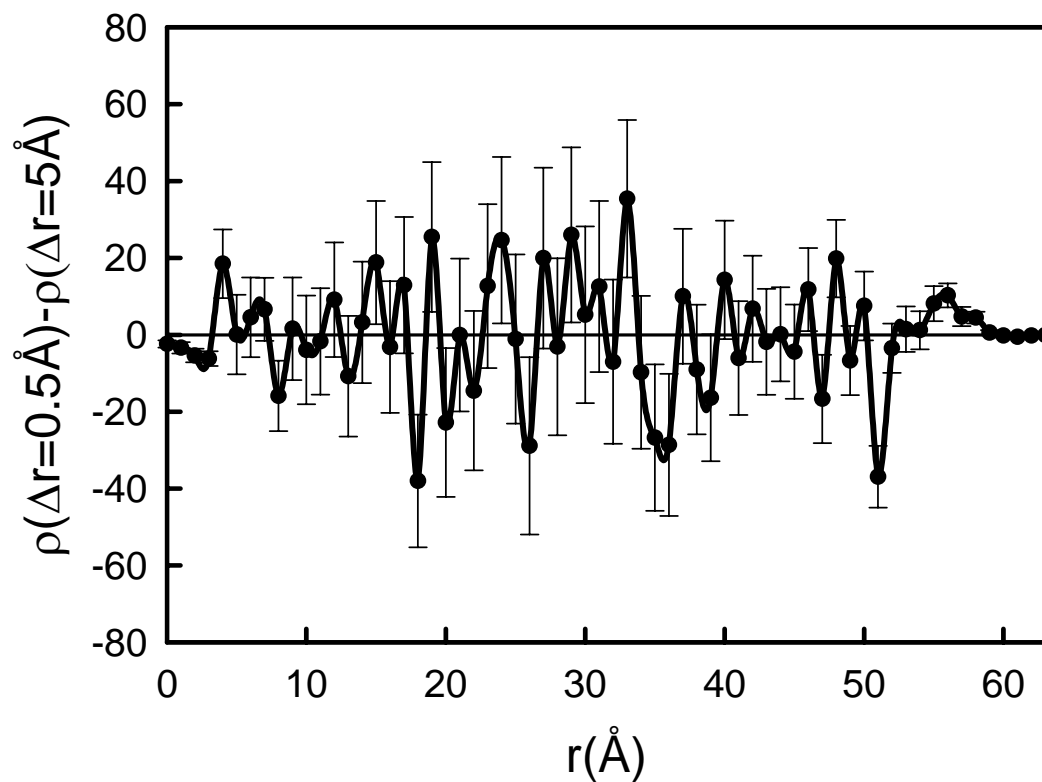
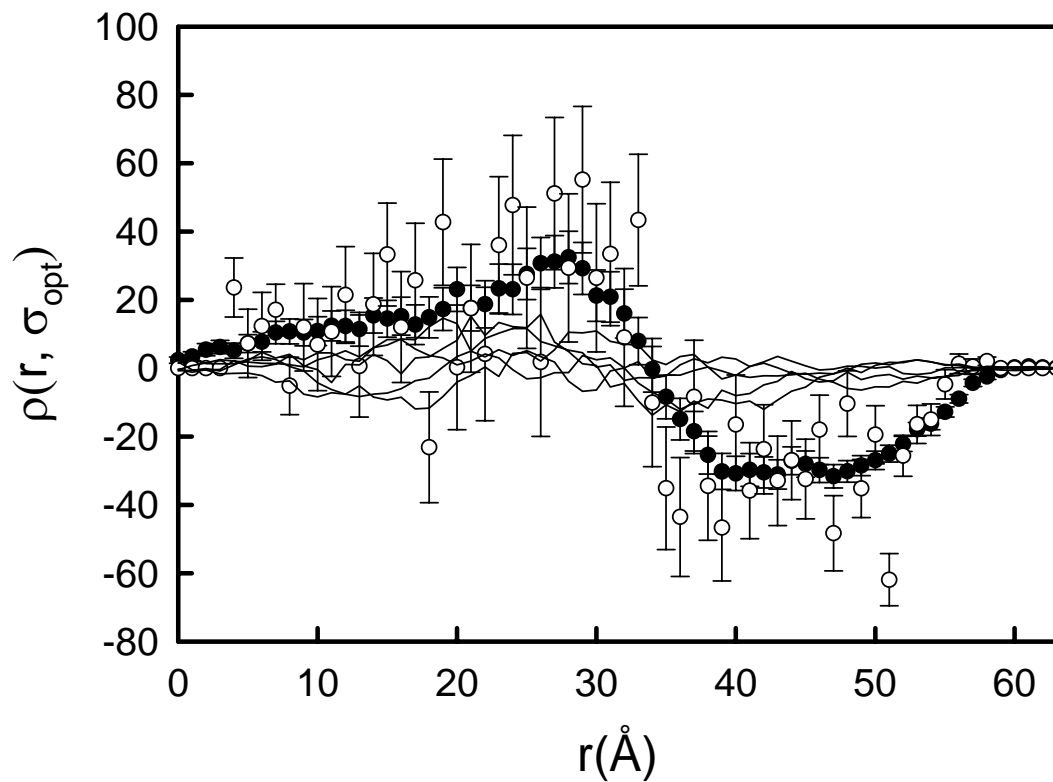
3DAA



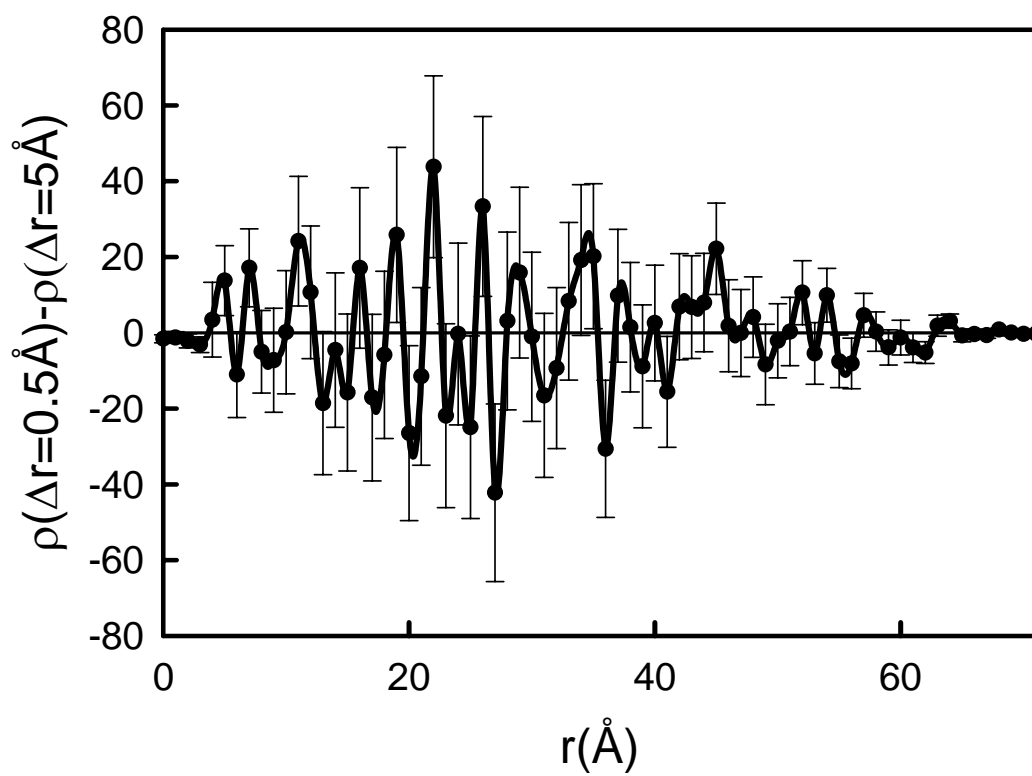
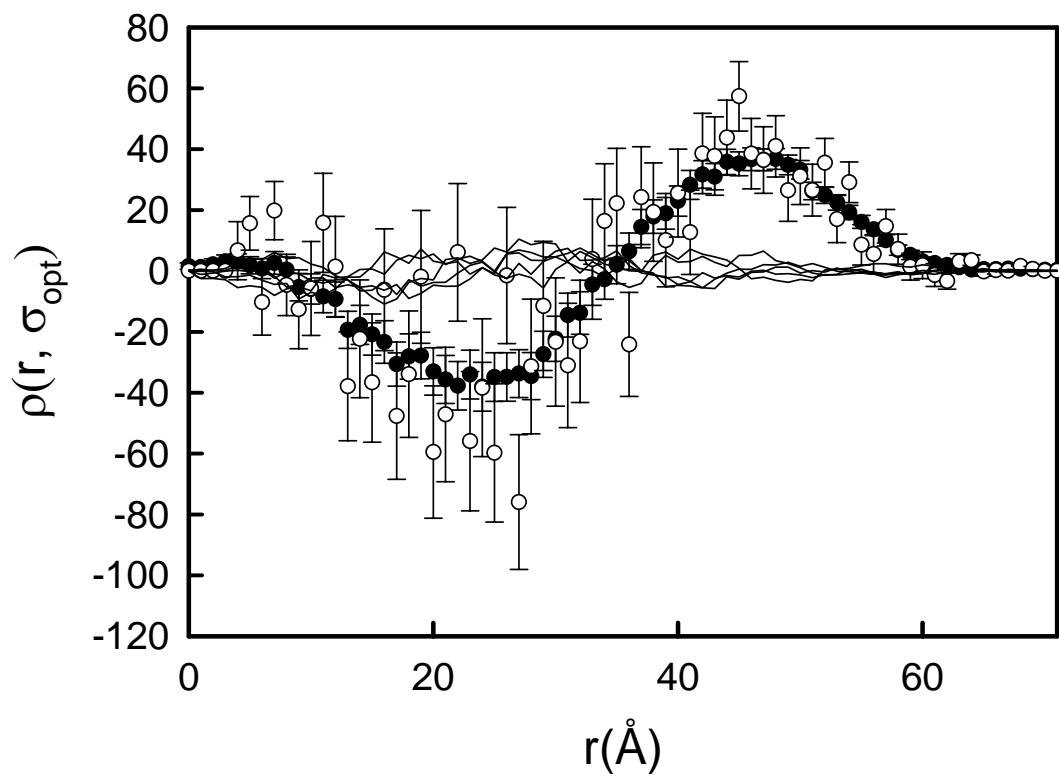
1FL2



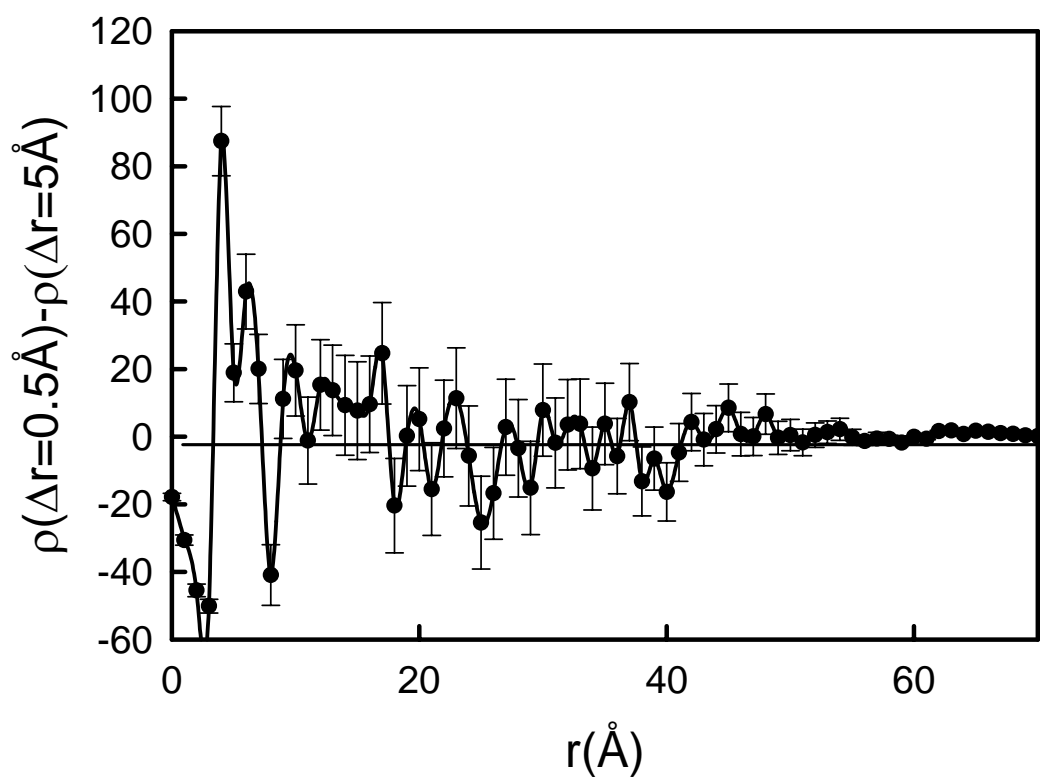
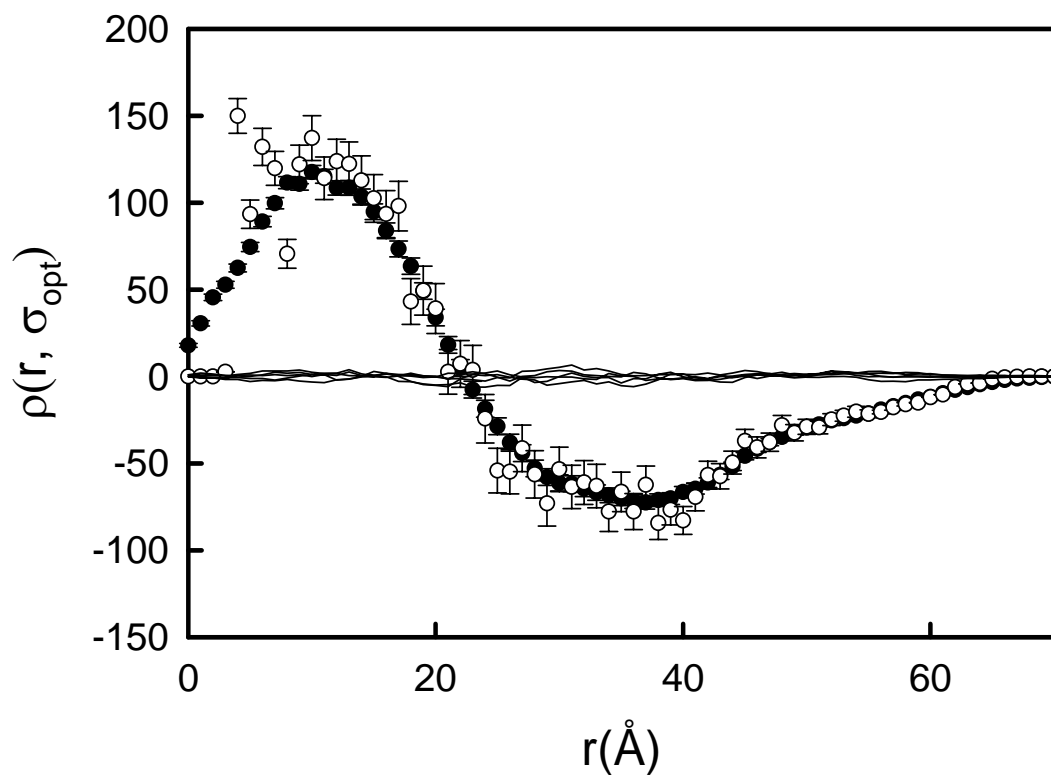
1PPR



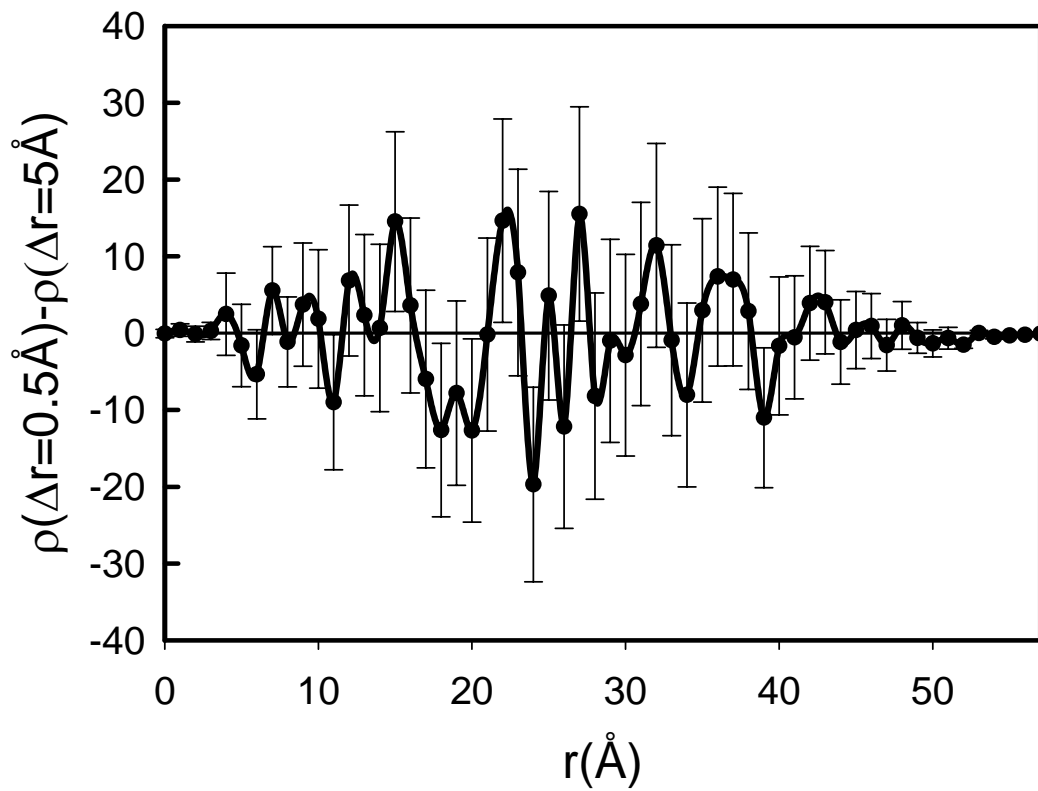
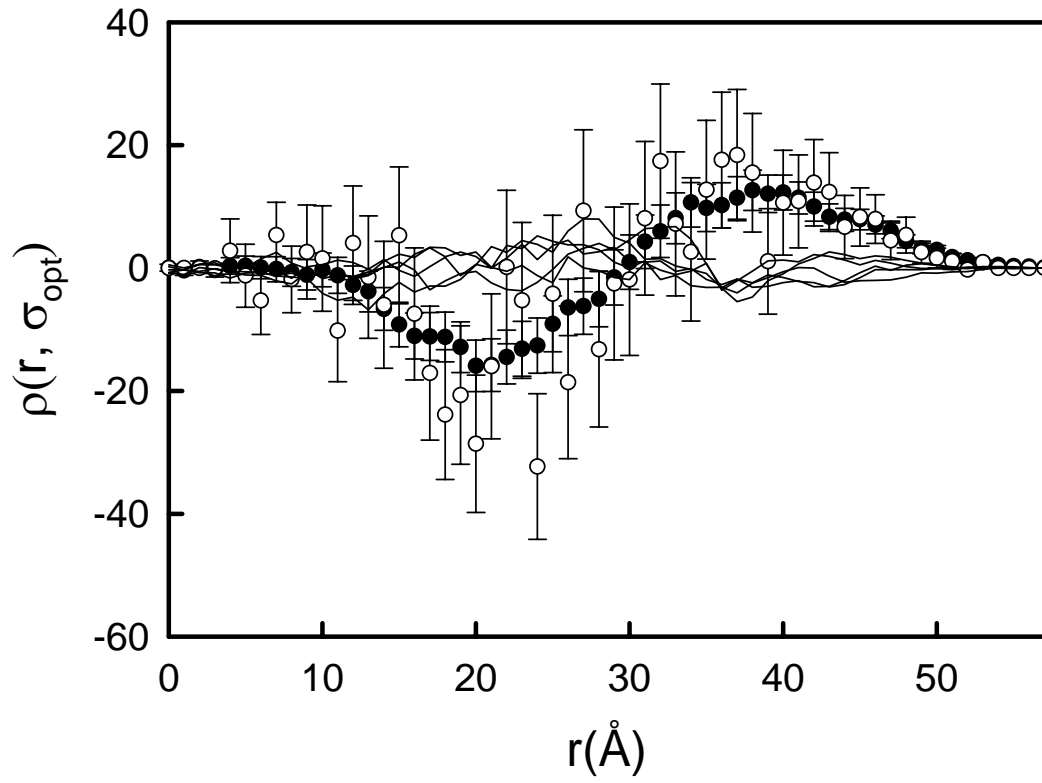
1AA8



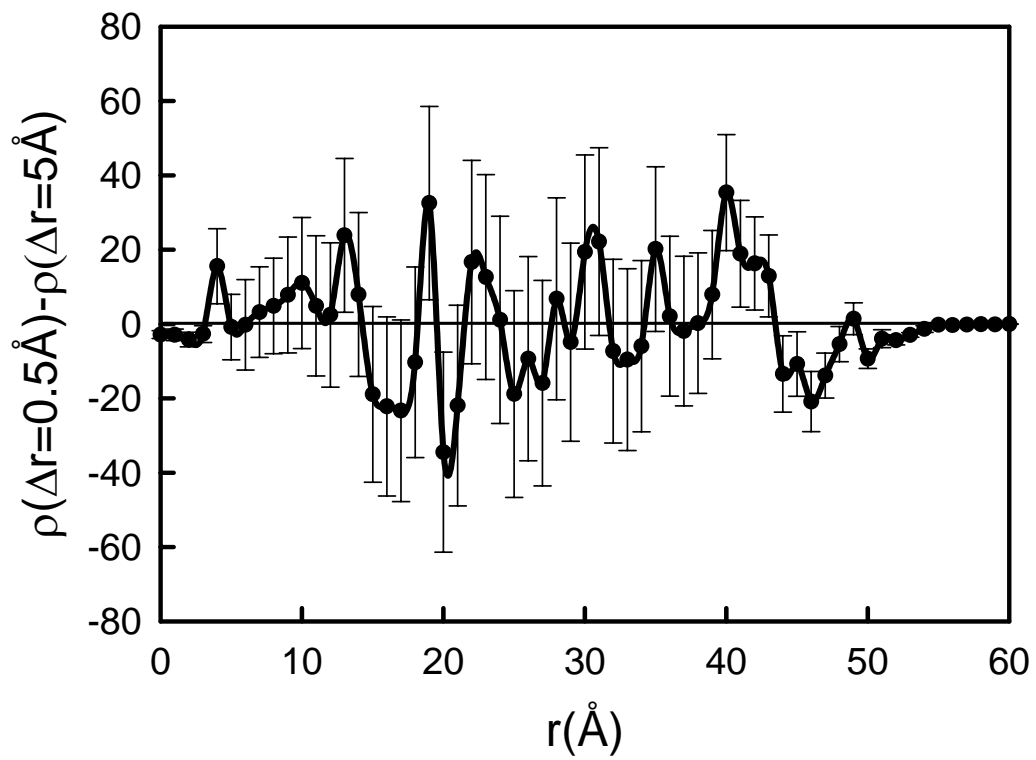
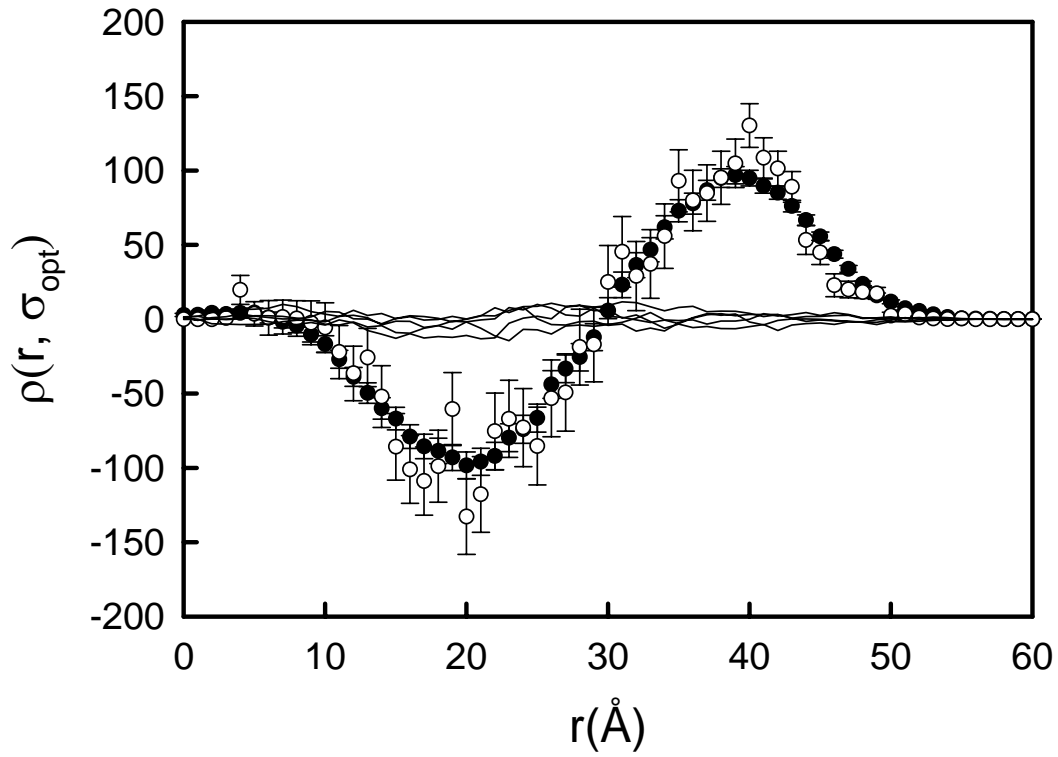
3BCL



1CEM



1F8D



Apéndice D: Realización de ajustes con MLAB.

Los ajustes empleando MLAB, para los casos estudiados en esta tesis, siguen una serie de pasos que son: la creación de la matriz de datos, introducción de las funciones de ajuste, realización del ajuste y creación de la matriz de los parámetros del ajuste. Las instrucciones son:

```
M=READ("nombre del fichero", número de filas, número de columnas)
FUNCTION F(X) Se detallan todas las funciones implícitas en el ajuste
FIT(parámetros ajustables separados por comas), F TO M
Z=POINTS(F(X), valor inicial:valor final:separación entre valores)
```

Antes de la instrucción FIT se deben dar valores aproximados a los parámetros ajustables

Funciones para el ajuste de trazas de calorimetría diferencial de barrido, según el modelo de dos estados:

```
FUNCTION K(T) = EXP(((DH)/R)*(1/T-1/TM))
FUNCTION CPU(T) = C+D*(T-330)
FUNCTION CPN(T) = A+B*(T-330)
FUNCTION CP(T) = CPN(T)+(CPU(T)-
CPN(T))*(K(T)/(1+K(T)))+(DH^2/(R*T*T))*(K(T)/(1+K(T))^2)
R=0.008314
```

Funciones para el ajuste de perfiles de desnaturalización térmica seguidos por CD, según el modelo de dos estados:


```
FUNCTION K(T) = EXP((-DH/R)*(1/T-1/TM))
FUNCTION XN(T) = 1/(1+K(T))
FUNCTION XD(T) = K(T)/(1+K(T))
FUNCTION ED(T) = C+D*(T-330)
FUNCTION EN(T) = A+B*(T-330)
FUNCTION E(T) = EN(T)*XN(T)+ED(T)*XD(T)
R= 0.008314
```

Funciones para el ajuste global de la dependencia de las constantes de velocidad de plegamiento y replegamiento con la concentración de desnaturalizante (chevrons) y la amplitud de la cinética frente a concentración de desnaturalizante, según el modelo de dos estados:

```
FUNCTION F1(X) = DI/(1+EXP((M*(X-C))/(R*T)))
FUNCTION F1(X) = LN(EXP(A)*EXP((MU/(R*T))*(X-C))+EXP(A)*EXP(((MU-
M)/(R*T))*(X-C)))
R=0.008314
```

Las funciones F1 (amplitudes frente a concentración de desnaturalizante) y F2 (chevron) se pueden ajustar por separado a sus correspondientes perfiles.

Para hacer un ajuste global con peso, se crea un vector V que sea la inversa de las varianzas, para cada caso. La instrucción FIT ahora es:

```
FIT(parámetros ajustables separados por comas), F1 TO M1 WITH WEIGHT V1, F2
TO M2 WITH WEIGHT V2
```

9. Referencias bibliográficas

- Acevedo, O., M. Guzman-Casado, M. M. Garcia-Mira, B. Ibarra-Molero, and J. M. Sanchez-Ruiz. 2002. pH corrections in chemical denaturant solutions. *Anal. Biochem.* 306:158-161.
- Alexander, P., S. Fahnestock, T. Lee, J. Orban, and P. Bryan. 1992. Thermodynamic analysis of the folding of the streptococcal protein G IgG-binding domains B1 and B2: why small proteins tend to have high denaturation temperatures. *Biochemistry.* 31:3597-3603.
- Arakawa, T., and S. N. Timasheff. 1984. Protein stabilization and destabilization by guanidinium salts. *Biochemistry.* 23:5924-5929.
- Arakawa, T., and S. N. Timasheff. 1985. The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys. J.* 47:411-414.
- Aszódi, A., Gradwell, M.J., and Taylor, W.R. 1995. Global fold determination from small number of distance restraints. *J. Mol. Biol.* 251: 308-326.
- Baker, D., and Sali, A. 2001. Protein structure prediction and structural genomics. *Science* 294: 93-96.
- Baldwin, R. L. 1986. How Hofmeister ions affect protein stability. *Biophys. J.* 71:2056-2063.
- Blinder, S. M. 1966. Mathematical methods in elementary thermodynamics. *J. Chem. Ed.* 43:85-92.
- Bolen, D. W., and I. V. Baskarov. 2001. The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *J. Mol. Biol.* 310:955-963.
- Bolen, D. W., and M. Yang. 2000. Effects of guanidine hydrochloride on the proton inventory of proteins: implications for the interpretations of protein stability. *Biochemistry.* 39:15208-15216.

Chothia C., Gough J., Vogel, C., and Teichmann, S.A. 2003. Evolution of the protein repertoire. *Science* 300: 1701-1703.

Chothia, C. 1976. The nature of the accessible and buried surfaces in proteins. *J. Mol. Biol.* 105:1-12.

Clarkson, M.W., and Lee, A.L. 2004. Long-range dynamic effects of point mutations propagate through side chains in the serine protease inhibitor eglin c. *Biochemistry*, 43: 12448-12458..

Courtenay, E. S., M. W. Capp, and M. T. Record Jr. 2001. Thermodynamics of interactions of urea and guanidinium salts with protein surface: relationship between solute effects on protein stability and changes in water-accessible surface area. *Protein Sci.* 10:2484-2497.

Dominy, B. N., D. Perl, F. X. Schmid, and C. L. Brooks 3rd. 2002. The effects of ionic strength on protein stability: the cold-shock protein family. *J. Mol. Biol.* 319:541-554.

Fariselli, P., Olmea, O., Valencia, A., and Casadio, R. 2001. Progress in predicting inter-residue contacts with neural networks and correlated mutations. *Proteins Suppl* 1 5, 157-162.

Fodor, A.A., and Aldrich, R.W. 2004. Influence of conservation on calculations of amino acid covariance in multiple sequence alignments. *Proteins* 56: 211-221.

Garcia-Mira, M. M., and J. M. Sanchez-Ruiz. 2001. pH corrections and protein ionization in water/guanidinium chloride. *Biohys. J.* 81:3489-3502.

Georgescu, R.E., Garcia-Mira, M.M., Tasayco, M.L., and Sanchez-Ruiz, J.M. 2001. Heat capacity analysis of oxidized *Escherichia coli* thioredoxin fragments (1-73, 74-108) and their noncovalent complex. Evidence for the burial of apolar surface in protein unfolded states. *Eur. J. Biochem.* 268: 1477-1485.

Gobel, U., Sander, C., Schneider, R., and Valencia, A. 1994. Correlated mutations and residue contacts in proteins. *Proteins* 18: 309-317.

Godoy-Ruiz R., Perez-Jimenez R., Garcia-Mira MM., Plaza del Pino IM and Sanchez-Ruiz JM. 2005. *Biophys Chem.* 115 (2-3): 263-6.

Godoy-Ruiz, R., Perez-Jimenez, R., Ibarra-Molero, B., and Sanchez-Ruiz, J.M. 2004. Relation between protein stability, evolution and structure, as probed by carboxylic acid mutations. *J. Mol. Biol.* 336: 313-318.

Greene, R. F., and C. N. Pace. 1974. Urea and guanidinium chloride denaturation of ribonuclease, alpha-chymotrypsin, and beta-lactoglobulin. *J. Biol. Chem.* 249:5388-5393.

Grimsley, G. R., K. L. Shaw, L. R. Fee, R. W. Alston, B. M. Huyghues-Despointes, R. L. Thurlkill, J. M. Scholtz, and C. N. Pace. 1999. Increasing protein stability by altering long-range coulombic interactions. *Protein Sci.* 8:1843-1849.

Guzman-Casado, M., Parody-Morreale, A., Robic, S., Marqusee, S., and Sanchez-Ruiz, J.M. 2003. Energetic evidence for the formation of a pH-dependent hydrophobic cluster in the denatured state of *Thermus thermophilus* ribonuclease H. *J. Mol. Biol.* 329: 731-743.

Hagihara, Y., S. Aimoto, A. L. Fink, and Y. Goto. 1993. Guanidine hydrochloride-induced folding of proteins. *J. Mol. Biol.* 231:180-184.

Hinds, D.A., and Levitt, M. 1994. Exploring conformational space with a simple lattice model for protein structure. *J. Mol. Biol.* 243: 668-682.

Holmgren, A., and P. Reichard. 1967. Thioredoxin 2: cleavage with cyanogen bromide. *Eur. J. Biochem.* 2:187-196.

Holmgren, A., Soderberg, B. O., Eklund, H., Branden, C. I., 1975. Three-dimensional structure of *Escherichia coli* thioredoxin-S2 to 2.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72 pp. 2305.

Horovitz, A., and Fersht, A.R. 1990. Strategy for analyzing the co-operativity of intramolecular interactions in proteins. *J. Mol. Biol.* 214: 613-617.

Ibarra-Molero, B., and J. M. Sanchez-Ruiz. 1996. A model-independent, nonlinear extrapolation procedure for the characterization of protein folding energetics from solvent-denaturation data. *Biochemistry.* 35:14689-14702.

Ibarra-Molero, B., and J. M. Sanchez-Ruiz. 1997. Are there equilibrium intermediate states in the urea-induced unfolding of hen egg-white lysozyme?. *Biochemistry.* 36:9616-9624.

Ibarra-Molero, B., and J. M. Sanchez-Ruiz. 2002. A genetic algorithm to design stabilizing surface charge distributions in proteins. *J. Phys. Chem. B.* 106:6609-6613.

Ibarra-Molero, B., G. I. Makhatadze, and J. M. Sanchez-Ruiz. 1999b. Cold denaturation of ubiquitin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1429:384-390.

Ibarra-Molero, B., I. M. Plaza del Pino, B. Souhail, H. O. Hammou, and J. M. Sanchez-Ruiz. 2000. The sarcosine effect on protein stability: a case of nonadditivity?. *Protein Sci.* 9:820-826.

Ibarra-Molero, B., Perez-Jimenez, R., Godoy-Ruiz, R., and J. M. Sanchez-Ruiz. 2003. Linkage between temperature and chemical denaturant effects on protein stability: the interpretation of calorimetrically-determined m values. In *Biocalorimetry II: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences* (Doyle, M., and Ladbury, J., eds.), John Wiley & sons, New York.

Ibarra-Molero, B., V. V. Loladze, G. I. Makhatadze, and J. M. Sanchez-Ruiz. 1999a. Thermal versus guanidine-induced unfolding of ubiquitin. Analysis in terms of the contributions from charge-charge interactions to protein stability. *Biochemistry*. 38:8138-8149.

Irun, M. P., M. M. Garcia-Mira, J. M. Sanchez-Ruiz and J. Sancho. 2001. Native hydrogen bonds in a molten globule: the apoflavodoxin thermal intermediate. *J. Mol. Biol.* 306:877-888.

Kao, Y. H., C. A. Fitch, S. Bhattacharya, C. J. Sarkisian, J. T. Lecomte, and B. E. Garcia-Moreno. 2000. Salt effects on ionization equilibria of histidines in myoglobin. *Biophys. J.* 79:1637-1654.

Kelley, R. F., W. Shalongo, M. V. Jagannadham, and E. Stellwagen. (1987). Equilibrium and kinetic measurements of the conformational transition of reduced thioredoxin. *Biochemistry*. 26:1406-1411.

Klein-Seetharaman, J., Oikawa, M., Grimshaw, S.B., Wirmer, J., Duchardt, E., Ueda, T., Imoto, T., Smith, L.J., Dobson, C.M., and Schwalbe, H. 2002. Long-range interactions within a non-native protein. *Science* 295: 1719-1722.

Ladbury, J.E., Wynn, R., Hellinga, H.W., and Sturtevant, J. 1993. Stability of oxidized *Escherichia coli* thioredoxin and its dependence on protonation of the aspartic acid residue in the position 26. *Biochemistry* 32: 7526-7530.

Larson, S.M., Di Nardo, A.A., and Davidson, A.R. 2000. Analysis of covariation in an SH3 domain sequence alignment: applications in tertiary contact prediction and the design of compensating hydrophobic core substitutions. *J. Mol. Biol.* 303: 433-446.

Laurents, D. V., B. M. Huyghues-Despointes, M. Bruix, R. L. Thurlkill, D. Schell, S. Newsom, G. R. Grimsley, K. L. Shaw, S. Trevino, M. Rico, J. M. Briggs, J. M.

Antosiewicz, J. M. Scholtz, and C. N. Pace. 2003. Charge-charge interactions are key determinants of the pK values of ionizable groups in ribonuclease Sa (pI=3.5) and a basic variant (pI=10.2). *J. Mol. Biol.* 325:1077-1092.

Lee, L. P., and B. Tidor. 2001. Optimization of binding electrostatics: charge complementarity in the barnase-barstar complex. *Protein Sci.* 10:362-377.

Lockless, S.W., and Ranganathan, R. 1999. Evolutionary conserved pathways of energetic connectivity in protein families. *Science* 286: 295-299.

Loladze, V. V., B. Ibarra-Molero, J. M. Sanchez-Ruiz, and G. I. Makhatadze. 1999. Engineering a thermostable protein via optimization of charge-charge interactions on the protein surface. *Biochemistry.* 38:16419-16423.

Luisi, D. L., C. D. Snow, J. J. Lin, Z. S. Hendsch, B. Tidor, and D. P. Raleigh. 2003. Surface salt bridges, double-mutant cycles, and protein stability: an experimental and computational analysis of the interaction of the Asp 23 side chain with the N-terminus of the N-terminal domain of the ribosomal protein L9. *Biochemistry.* 42:7050-7060.

Lundström, J., Krause, G., and Holmgren, A. 1992. A Pro to His mutation in active site of thioredoxin increases its disulfide-isomerase activity 10-fold. New refolding systems for reduced or randomly oxidized ribonuclease. *J. Biol. Chem.* 267: 9047-9052.

Makhatadze, G. I., and P. L. Privalov. 1990. Heat capacity of proteins. I. Partial molar heat capacity of individual aminoacid residues in aqueous solution: hydration effect. *J. Mol. Biol.* 213:375-384.

Makhatadze, G. I., and P. L. Privalov. 1992. Protein interactions with urea and guanidinium chloride. A calorimetric study. *J. Mol. Biol.* 226:491-505.

Makhatadze, G. I., M. M. Lopez, J. M. Richardson 3rd, and S. T. Thomas. 1998. Anion binding to the ubiquitin molecule. *Protein Sci.* 7:689-697.

- Makhatadze, G. I., V. V. Loladze, D. M. Ermolenko, X. Chen, and S. T. Thomas. 2003. Contributions of surface salt bridges to protein stability: guidelines for protein engineering. *J. Mol. Biol.* 327:1135-1148.
- Marshall, S. A., C. S. Morgan, and S. L. Mayo. 2002. Electrostatics significantly affect the stability of designed homeodomain variants. *J. Mol. Biol.* 316:189-199.
- Martin, A., I. Kather, and F. X. Schmid. 2002. Origins of the high stability of an *in vitro*-selected cold-shock protein. *J. Mol. Biol.* 318:1341-1349.
- Matouschek, A. Kellis J.T, Serrano L and Fersch A. 1989. Mapping the transition state and pathway of protein folding by protein engineering. *Nature.* 340: 122-126.
- Mayr, L. M., and F. X. Schmid. 1993. Stabilization of a protein by guanidinium chloride. *Biochemistry.* 32:7994-7998.
- Miyazawa S., and Jernigan R.L. 1999. Self-consistent estimation of inter-residue protein contact energies based on an equilibrium mixture approximation of residues. *Proteins* 34: 49-68.
- Monera, O.D., C.M. Kay, and R. S. Hodges. 1994. Protein denaturation with guanidinium chloride or urea provides a different estimate of stability depending on the contributions of electrostatic interactions. *Protein Sci.* 3:1984-1991.
- Muñoz, V., and Sanchez-Ruiz, J.M. 2004. Exploring protein folding ensembles: a variable-barrier model for the analysis of equilibrium unfolding experiments. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*
- Myers, J. K., C. N. Pace, and J. M. Scholtz. 1995. Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci.* 4:2138-48.

Naganathan, A. Perez-Jimenez R. Sanchez-Ruiz JM and Muñoz V. Robustness of Downhill Folding: Guidelines for the Analysis of Equilibrium Folding Experiments on Small Proteins. 2005. *Biochemistry*, in the press.

Nikkola, M., Gleason, F. K., Fuchs, J. A., 1993. Eklund, H. Crystal structure analysis of a mutant Escherichia coli thioredoxin in which lysine 36 is replaced by glutamic acid. *Biochemistry* ; 32(19); 5093-5098.

Nohaile, M. J., Z. S. Hendsch, B. Tidor, and R. T. Sauer. 2001. Altering dimerization specificity by changes in surface electrostatics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98:3109-3114.

Ohkata, H., Schön, A, and Freire, E. 2003. Multidrug resistance to HIV-1 protease inhibition requires cooperative coupling between distal mutations. *Biochemistry* 42: 13659-13666.

Orengo, C., Michie, A.D., Jones, S., Jones, T.D., Swindells, M.B., and Thornton, J. 1997. CATH--a hierarchic classification of protein domain structures. *Structure* 5: 1093-1108.

Ortiz, A.R., Kolinski, A., and Skolnick, J. 1998. Nativelike topology assembly of small proteins using predicted restraints in Monte Carlo folding simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1020-1025.

Ortiz, A.R., Kolinski, A., Rotkiewicz, P., Ilkowski, B., Skolnick, J. 1999. Ab initio folding of proteins using restraints derived from evolutionary information. *Proteins Suppl.* 3: 177-185.

Otzen, D.E, Kristensen, O., Proctor, M. and Oliveberg, M. *Biochemistry* 1999, 38: 6499-6511.

Pace, C. N. 2000. Single surface stabilizer. *Nat. Struc. Biol.* 7:345-346.

Pace, C. N., B. A. Shirley, and J. A. Thomson. 1989. Measuring the conformational stability of a protein. *In* Protein structure, a practical approach. T. E. Creighton, editor. IRL Press at Oxford University Press, Oxford. 311-330.

Pace, C. N., B. M. Huyghues-Despointes, J. M. Briggs, G. R. Grimsley, and J. M. Scholtz. 2002. Charge-charge interactions are the primary determinants of the pK values of the ionizable groups in ribonuclease T1. *Biophys. Chem.* 101-102:211-219.

Pace, C. N., D. V. Laurents, and J. A. Thomson. 1990. pH dependence of the urea and guanidinium chloride denaturation of ribonuclease A and ribonuclease T1. *Biochemistry.* 29:2564-2572.

Pace, C. N., R. W. Alston, and K. L. Shaw. 2000. Charge-charge interactions influence the denatured state ensemble and contribute to protein stability. *Protein Sci.* 9:1395-1398.

Perez-Jimenez R., Godoy-Ruiz R., Ibarra-Molero B. and Sanchez-Ruiz JM. The effect of charge-introduction on E. coli thioredoxin stability. 2005 *Biophys Chem.* 115 (2-3):105- 7.

Perez-Jimenez, R., Godoy-Ruiz, R., Ibarra-Molero, B., and Sanchez-Ruiz, J.M. 2004. The efficiency of different salts to screen charge interactions in proteins: a Hofmeister effect?. *Biophys. J.* 86: 2414-2429.

Perl, D., and F. X. Schmid. 2001. Electrostatic stabilization of a thermophilic cold shock protein. *J. Mol. Biol.* 313:343-357.

Perl, D., U. Mueller, U. Heinemann, and F. X. Schmid. 2000. Two exposed amino acid residues confer thermostability on a cold shock protein. *Nat. Struc. Biol.* 7:380-383.

Perutz, M. F., A. M. Gronenborn, G. M. Clore, J. H. Fogg, and D. T. Shih. 1985. The pKa values of two histidine residues in human haemoglobin, the Bohr effect, and the dipole moments of alpha-helices. *J. Mol. Biol.* 183:491-498.

Plaza del Pino, I. M., and J. M. Sanchez-Ruiz. 1995. An osmolyte effect on the heat capacity change for protein folding. *Biochemistry.* 34:8621-8630.

Robic, S., Guzman-Casado, M., Sanchez-Ruiz, J.M., and Marqusee, S. 2003. Role of residual structure in the unfolded state of a thermophilic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 11345-11349.

Rudresh, Jain, R., Dani, V., Mitra, A., Srivastava, S., Sarma, S. P., Varadarajan, R., Ramakumar, S., 2002. Structural Consequences of Replacement of an Alpha-Helical Pro Residue in E.Coli Thioredoxin Protein Eng. 15 pp. 627.

Sanchez-Ruiz, J. M., and G. I. Makhatadze. 2001. To charge or not to charge?. *Trends Biotechnol.* 19:132-135.

Santoro, M. M., and D. W. Bolen. 1988. Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. I. Unfolding of phenyl-methanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry.* 27:8063-8068.

Santoro, M. M., and D. W. Bolen. 1992. A test of the linear extrapolation of unfolding free energy changes over an extended denaturant concentration range. *Biochemistry.* 31:4901-4907.

Schellman, J. A. 1987. The thermodynamic stability of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 16:115-137.

Schellman, J.A. 1987. The thermodynamic stability of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 16: 115-137.

Shrake, A., and J. A. Rupley. 1973. Environment and exposure to solvent of protein atoms. Lysozyme and insulin. *J. Mol. Biol.* 79:351-372.

Shyndialov, I.N., Kolchanov, N.A., and Sander, C. 1994. Can three dimensional contacts in protein structures be predicted by analysis of correlated mutations? *Protein Eng.* 7: 349-358.

Slaby, I., and Holmgren, A. 1979. Structure and enzymatic functions of thioredoxin refolded by complementation of two tryptic peptide fragments. *Biochemistry* 18: 5584-5591.

Spector, S., M. Wang, S. A. Carp, J. Robblee, Z. S. Hendsch, R. Fairman, B. Tidor, and D. P. Raleigh. 2000. Rational modification of protein stability by the mutation of charged surface residues. *Biochemistry.* 39:872-879.

Spudich, G., Lorenz, S., and Marqusee, S. 2002. Propagation of a single destabilizing mutation throughout the *Escherichia coli* ribonuclease HI native state. *Protein Sci.* 11: 522-528.

Süel, G.M., Lockless, S.W., Wall, M.A., and Ranganathan, R. 2003. Evolutionary conserved networks of residues mediate allosteric communication in proteins. *Nature Struct. Biol.* 10: 59-69.

Sundd, M., N. Iverson, B. Ibarra-Molero, J. M. Sanchez-Ruiz, and A. D. Robertson. 2002. Electrostatic interactions in ubiquitin: stabilization of carboxylates by lysine amino groups. *Biochemistry.* 41:7586-7596.

Tanford, C. N., and J. G. Kirkwood. 1957. Theory of protein titration curves. I. General equations for impenetrable spheres. *J. Am. Chem. Soc.* 79:5333-5339.

Uter, N.T., and Perona, J.J. 2004. Long-range intramolecular signaling in a tRNA synthetase complex revealed by pre-steady-state kinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 14396-14401.

Yu, Y., O. D. Monera, R. S. Hodges, and P. L. Privalov. 1996. Ion pairs significantly stabilize coiled-coils in the absence of electrolyte. *J. Mol. Biol.* 255:367-372.

Zhou, H. X., and F. Dong. 2003. Electrostatic contributions to the stability of a thermophilic cold shock protein. *Biophys. J.* 84:2216-2222.

