

F. Pro 24/99  
T 1/140

UNIVERSIDAD DE GRANADA

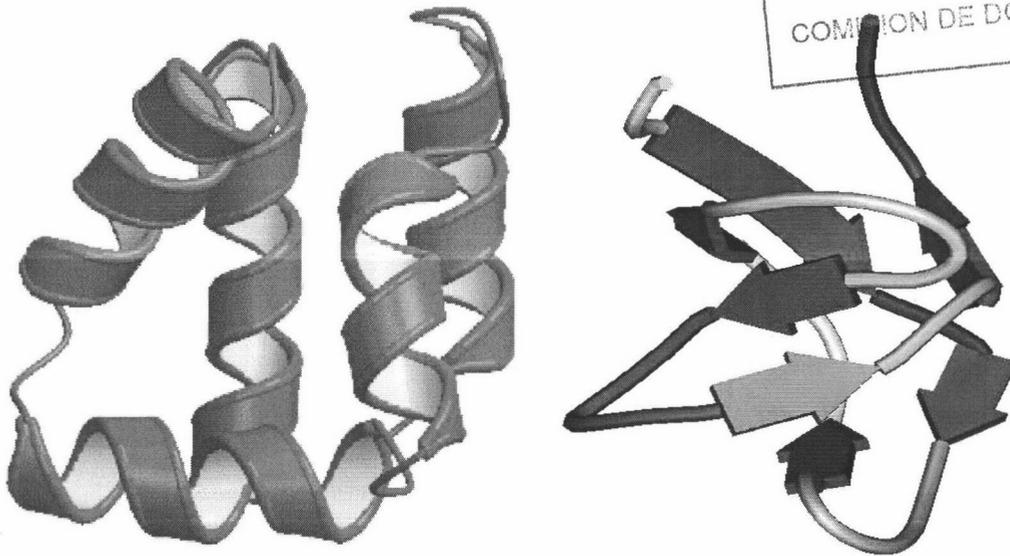
Facultad de Ciencias



UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
Fecha ..... 8/05/2002 .....  
ENTRADA NUM. .... 1711 .....

Departamento de Química Física

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
28 ABR. 2002  
COMISION DE DOCTORADO



**ESTABILIDAD, PLEGAMIENTO Y ESTRUCTURA DE LA  
PROTEÍNA CIRCULAR AS-48 Y DE MUTANTES DEL DOMINIO SH3**

**EVA SÁNCHEZ COBOS**

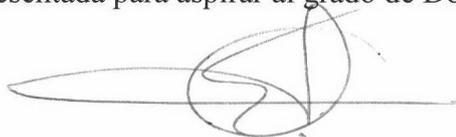
**Tesis Doctoral  
GRANADA  
2002**

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA  
GRANADA  
N.º Documento 613385446  
N.º Copia 615334843

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA

Memoria presentada para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Químicas



Fdo: Eva Sánchez Cobos

Licenciada en Ciencias Químicas por la Universidad de Granada

Granada, a 22 de Abril de 2002

DIRECTORES DE LA TESIS



Fdo: Dr. José Cristobal Martínez Herrerías  
Profesor Titular Interino  
Departamento de Química Física  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Granada



Fdo: Dr. Vladimir Filimonov  
Profesor de investigación  
Instituto para la Investigación de Proteínas  
Academia de Ciencias Rusa  
(Pushino-Moscú)



Fdo: Dr. Pedro Luis Mateo Alarcón  
Catedrático de Química Física  
Departamento de Química Física  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Granada

## ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. MATERIALES .....	7
2.1 <u>PRODUCTOS</u> .....	9
2.2 <u>INSTRUMENTACIÓN</u> .....	10
3. MÉTODOS .....	13
3.1 <u>PRODUCCIÓN DE MUTANTES DEL DOMINIO SH3 DE</u> <u><math>\alpha</math>-ESPECTRINA MEDIANTE MUTAGÉNESIS DIRIGIDA</u> .....	15
3.1.1 INTRODUCCIÓN .....	15
3.1.2 CONCEPTOS Y DEFINICIONES .....	17
3.1.3 AMPLIFICACIÓN DEL ADN: LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RCP) .....	18
3.1.3.1 <u>Estrategia experimental</u> .....	22
3.1.3.2 <u>Preparación y realización de la reacción</u> .....	24
3.1.4 DISEÑO E INTRODUCCIÓN DE MUTACIONES EN FRAGMENTOS DE ADN .....	26
3.1.5 DIGESTIÓN DEL PRODUCTO DE LA RCP CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN .....	33
3.1.6 LIGACIÓN DEL ADN DIGERIDO AL VECTOR DE EXPRESIÓN .....	35
3.1.7 INTRODUCCIÓN DEL PLÁSMIDO EN EL ORGANISMO DE EXPRESIÓN .....	36
3.1.8 ENSAYOS DE EXPRESIÓN .....	39
3.1.9 PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO .....	40
3.1.10 SECUENCIACIÓN .....	42
3.2 <u>PURIFICACIÓN DE MUTANTES DEL DOMINIO SH3 DE</u> <u><math>\alpha</math>-ESPECTRINA</u> .....	43
3.2.1 PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO Y OTRAS DISOLUCIONES .....	43
3.2.2 PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS CELULARES .....	44
3.2.3 EXTRACCIÓN DEL CRUDO DE PROTEINAS .....	45

3.2.4 PURIFICACIÓN DE LOS MUTANTES DEL DOMINIO SH3 MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CONVENCIONAL DE EXCLUSIÓN MOLECULAR .....	46
3.2.5 RENATURALIZACIÓN DE LOS MUTANTES PURIFICADOS .....	48
3.2.6 CONSERVACIÓN DE LOS MUTANTES .....	50
<b>3.3 <u>TÉCNICAS DE ELECTROFORESIS</u></b> .....	<b>51</b>
3.3.1 FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA .....	51
3.3.2 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE LAURIL SULFATO SÓDICO (SDS-PAGE) .....	52
3.3.2.1 <u>Reactivos</u> .....	53
3.3.2.2 <u>Preparación del gel y de las muestras</u> .....	54
3.3.2.3 <u>Aplicación y desarrollo de las muestras en el gel</u> .....	55
3.3.2.4 <u>Tinción de las bandas de proteína y destinción del gel</u> .....	56
3.3.3 ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN GEL DE AGAROSA .....	57
3.3.3.1 <u>Disoluciones</u> .....	58
3.3.3.2 <u>Preparación del gel y de las muestras</u> .....	59
3.3.3.3 <u>Aplicación y desarrollo de las muestras en el gel</u> .....	60
3.3.3.4 <u>Tinción y cuantificación de los fragmentos de ADN</u> .....	60
<b>3.4 <u>PREPARACIÓN DE MUESTRAS</u></b> .....	<b>61</b>
3.4.1 PREPARACIÓN DE TAMPONES Y DE DISOLUCIONES DE PROTEÍNA .....	61
3.4.2 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES CONCENTRADAS DE AGENTE DESNATURALIZANTE .....	62
3.4.2.1 <u>Disoluciones de guanidina</u> .....	62
3.4.2.2 <u>Disoluciones de urea</u> .....	62
3.4.3 MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS Y ÁCIDOS NUCLEICOS EN DISOLUCIONES TAMPONADAS .....	64
3.4.4 CORTE CON BROMURO DE CIANÓGENO DE AS-48 .....	67

<b>3.5 <u>EXPERIMENTOS DE CINÉTICA RÁPIDA MEDIANTE LA</u></b>	
<b><u>TÉCNICA DE FLUJO DETENIDO</u></b> .....	<b>68</b>
<b>3.5.1 INTRODUCCIÓN A LA ESPECTROSCOPIA</b>	
<b>DE FLUORESCENCIA</b> .....	<b>68</b>
<b>3.5.2 FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA DE FLUJO DETENIDO</b> .....	<b>70</b>
<b>3.5.3 INSTRUMENTACIÓN</b> .....	<b>71</b>
<b>3.5.4 DISEÑO DE LOS EXPERIMENTOS</b> .....	<b>76</b>
<b>3.5.5 PREPARACIÓN DE LOS EXPERIMENTOS</b> .....	<b>78</b>
<b>3.5.6 REALIZACIÓN DE LOS EXPERIMENTOS</b> .....	<b>79</b>
<b>3.5.7 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES</b>	
<b>SEGÚN LA TEORÍA DEL ESTADO DE TRANSICIÓN</b> .....	<b>83</b>
<b>3.5.8 DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE LAS</b>	
<b>CONSTANTES DE VELOCIDAD</b> .....	<b>85</b>
<b>3.5.9 GRÁFICOS DE CHEVRON</b> .....	<b>86</b>
<b>3.5.10 APLICACIÓN DEL MÉTODO DE INGENIERÍA DE</b>	
<b>PROTEÍNAS PARA LA CARACTERIZACIÓN</b>	
<b>ESTRUCTURAL DEL ESTADO DE TRANSICIÓN</b> .....	<b>89</b>
<b>3.6 <u>CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO</u></b> .....	<b>95</b>
<b>3.6.1 FUNDAMENTOS DE LA CALORIMETRÍA DIFERENCIAL</b>	
<b>DE BARRIDO</b> .....	<b>95</b>
<b>3.6.2 INSTRUMENTACIÓN</b> .....	<b>95</b>
<b>3.6.3 EL EXPERIMENTO CALORIMÉTRICO</b> .....	<b>97</b>
<b>3.6.4 ANÁLISIS PRELIMINAR DE LOS TERMOGRAMAS</b> .....	<b>102</b>
<b>3.6.5 ANÁLISIS DE LOS TERMOGRAMAS SEGÚN</b>	
<b>LA TERMODINÁMICA DE EQUILIBRIO</b> .....	<b>104</b>
<b>3.7 <u>DICROÍSMO CIRCULAR</u></b> .....	<b>116</b>
<b>3.7.1 FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA</b> .....	<b>116</b>
<b>3.7.2 INSTRUMENTACIÓN</b> .....	<b>117</b>
<b>3.7.3 ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DE PÉPTIDOS</b>	
<b>Y PROTEÍNAS</b> .....	<b>119</b>
<b>3.7.3.1 <u>Región del ultravioleta lejano</u></b> .....	<b>120</b>
<b>3.7.3.2 <u>Región del ultravioleta cercano</u></b> .....	<b>122</b>
<b>3.7.4 OBTENCIÓN DE ESPECTROS</b> .....	<b>123</b>

3.7.5 ESTUDIO DEL DESPLEGAMIENTO TÉRMICO DE PROTEÍNAS .....	126
3.7.6 TITULACIÓN INDUCIDA POR DESNATURALIZANTES .....	127
3.7.7 PROCESAMIENTO DE DATOS .....	130
3.7.8 ANÁLISIS DE LAS CURVAS DE TITULACIÓN EN PRESENCIA DE DESNATURALIZANTES .....	130
3.7.9 ANÁLISIS DE LAS CURVAS DE DESPLEGAMIENTO TÉRMICO EN PRESENCIA DE DESNATURALIZANTES .....	133
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>137</b>
<b>4. BACTERIOCINA AS-48 .....</b>	<b>139</b>
4.1 <u>ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS</u> .....	139
4.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES .....	139
4.1.2 ESTRUCTURA .....	140
4.1.3 ESTABILIDAD Y MECANISMO DE ACCIÓN .....	142
4.1.4 IMPORTANCIA DE LA CIRCULARIZACIÓN DE PROTEÍNAS .....	143
4.2 <u>RESULTADOS EXPERIMENTALES</u> .....	145
4.2.1 ESTUDIO DE LA DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA MEDIANTE CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (CDB) .....	145
4.2.2 ANÁLISIS DE LOS DATOS DE CDB OBTENIDOS A pH 2.5 .....	146
4.2.3 CÁLCULO DE ÁREAS ACCESIBLES AL SOLVENTE .....	152
4.2.4 ESTUDIO DEL DESPLEGAMIENTO EN PRESENCIA DE UREA MEDIANTE DICROÍSMO CIRCULAR .....	156
4.2.5 ESTUDIO DEL DESPLEGAMIENTO INDUCIDO POR GUANIDINA MEDIANTE DICROÍSMO CIRCULAR .....	163
4.2.6 ESTUDIO CINÉTICO DEL PLEGAMIENTO DE AS-48 .....	173
4.3 <u>DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS</u> .....	176
4.3.1 ANÁLISIS TERMODINÁMICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE CDB .....	176

4.3.2 ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA PRESENCIA DE AGENTES DESNATURALIZANTES SOBRE LA ESTABILIDAD DE AS-48 .....	179
4.3.3 EFECTO DE LA CIRCULARIZACIÓN EN LA ESTABILIDAD DE AS-48 .....	182
5. DOMINIO SH3 DE $\alpha$ -ESPECTRINA .....	185
5.1 <u>ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS</u> .....	185
5.1.1 INTRODUCCIÓN .....	185
5.1.2 ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL .....	188
5.1.3 ESTABILIDAD Y PLEGAMIENTO DE DOMINIOS SH3 .....	191
5.1.4 DISEÑO DE MUTANTES DEL NÚCLEO HIDROFÓBICO DEL DOMINIO SH3 .....	196
5.2 <u>RESULTADOS EXPERIMENTALES</u> .....	197
5.2.1 EL MUTANTE Best5I25V .....	197
5.2.2 ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE Best5I25V MEDIANTE CDB .....	199
5.2.3 ESTUDIO DEL ESTADO DE TRANSICIÓN DE Best5I25V .....	203
5.2.4 CÁLCULO DE ÁREAS ACCESIBLES AL SOLVENTE .....	208
5.3 <u>DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS</u> .....	210
5.3.1 ESTABILIDAD DEL MUTANTE Best5I25V .....	210
5.3.2 CARACTERIZACIÓN DEL ESTADO DE TRANSICIÓN .....	211
6. RESUMEN Y CONCLUSIONES .....	217
7. APÉNDICES .....	223
8. BIBLIOGRAFÍA .....	235

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 3.1.1.....	16
FIGURA 3.1.2.....	20
FIGURA 3.1.3.....	22
FIGURA 3.1.4.....	27
FIGURA 3.1.5.....	30
FIGURA 3.1.6.....	39
FIGURA 3.1.7.....	41
FIGURA 3.2.1.....	47
FIGURA 3.2.2.....	49
FIGURA 3.4.1.....	66
FIGURA 3.5.1.....	73
FIGURA 3.5.2.....	74
FIGURA 3.5.3.....	81
FIGURA 3.5.4.....	84
FIGURA 3.5.5.....	87
FIGURA 3.5.6.....	88
FIGURA 3.5.7.....	91
FIGURA 3.5.8.....	93
FIGURA 3.6.1.....	98
FIGURA 3.6.2.....	101
FIGURA 3.6.3.....	105
FIGURA 3.6.4.....	109
FIGURA 3.6.5.....	113
FIGURA 3.7.1.....	117
FIGURA 3.7.2.....	118
FIGURA 3.7.3.....	119
FIGURA 3.7.4.....	121
FIGURA 3.7.5.....	134
FIGURA 4.1.1.....	140
FIGURA 4.1.2.....	141
FIGURA 4.2.1.....	146
FIGURA 4.2.2.....	147

FIGURA 4.2.3.....	148
FIGURA 4.2.4.....	151
FIGURA 4.2.5.....	157
FIGURA 4.2.6.....	158
FIGURA 4.2.7.....	161
FIGURA 4.2.8.....	164
FIGURA 4.2.9.....	166
FIGURA 4.2.10.....	169
FIGURA 4.2.11.....	170
FIGURA 4.2.12.....	172
FIGURA 4.2.13.....	174
FIGURA 4.3.1.....	181
FIGURA 5.1.1.....	190
FIGURA 5.1.2.....	190
FIGURA 5.2.1.....	198
FIGURA 5.2.2.....	200
FIGURA 5.2.3.....	202
FIGURA 5.2.4.....	203
FIGURA 5.2.5.....	205
FIGURA 5.2.6.....	207

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 3.1.1.....	29
TABLA 3.3.1.....	56
TABLA 3.4.1.....	65
TABLA 3.5.1.....	82
TABLA 4.2.1.....	150
TABLA 4.2.2.....	154
TABLA 4.2.3.....	159
TABLA 4.2.4.....	162
TABLA 4.2.5.....	167
TABLA 4.2.6.....	168
TABLA 5.2.1.....	201
TABLA 5.2.2.....	206
TABLA 5.2.3.....	208

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

**Abs:** absorbancia

**a<sub>den</sub>:** actividad del desnaturalizante

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**APS:** persulfato amónico

**ARN:** ácido ribonucleico

**ATP:** adenosín- 5'-trifosfato

**c:** concentración de proteína

**CDB:** calorimetría diferencial de barrido

**c<sub>den</sub>:** concentración molar de desnaturalizante

**C<sub>m,den</sub>:** concentración del punto medio de una curva de titulación

**C<sub>p,D</sub>:** capacidad calorífica molar parcial del estado desnaturalizado (D)

**C<sub>p,N</sub>:** capacidad calorífica molar parcial del estado nativo (N)

**C<sub>p,p</sub>:** capacidad calorífica parcial de la proteína

**C<sub>p,s</sub>:** capacidad calorífica parcial del disolvente

**C<sub>p</sub>:** capacidad calorífica molar parcial

**C<sub>p</sub><sup>\*</sup> (T):** señal obtenida experimentalmente mediante CDB

**D:** estado desnaturalizado de la proteína

**dATP:** 2'-desoxi-adenosin-5'-trifosfato

**DC:** dicroísmo circular

**dCTP:** 2'-desoxi-citosin-5'-trifosfato

**den:** agente desnaturalizante (urea o guanidina)

**dGTP:** 2'-desoxi-guanosin-5'-trifosfato

**D<sub>gu</sub>:** actividad efectiva de la guanidina

**dNTP's:** desoxinucleótidos trifosfato

**DTT:** ditioneitol

**dTTP:** 2'-desoxi-timidin-5'-trifosfato

**E:** intensidad del campo eléctrico (voltios /metro)

**EDTA:** ácido etilendiamino tetraacético

**gu:** guanidina

**GuHCl:** cloruro de guanidinio

**H<sub>D</sub>:** valor de la entalpía en el estado desnaturalizado (D)

**H<sub>N</sub>**: valor de la entalpía en el estado nativo (N)

**IPTG**: isopropil β-D-thiogalactopiranosido

**I<sub>t</sub>**: intensidad de fluorescencia

**k**: constante de velocidad de un proceso cinético

**K<sup>‡</sup>**: constante del equilibrio químico que tiene lugar entre el estado inicial (D ó N) y el estado de transición ([TS<sup>‡</sup>])

**k<sub>‡-D,urea</sub>**: constante de velocidad del proceso de plegamiento a una concentración dada de urea

**k<sub>‡-D</sub>**: constante de velocidad del proceso de plegamiento

**k<sub>‡-N,urea</sub>**: constante de velocidad del proceso de desplegado a una concentración dada de urea

**k<sub>‡-N</sub>**: constante de velocidad del proceso de desplegado

**k<sub>B</sub>** constante de Boltzman

**K<sub>b</sub>**: constante de unión al desnaturizante por cada sitio de unión

**K<sub>D</sub>**: constante de equilibrio aparente para la desnaturización en el modelo de dos estados

$$k_{urea} = k_{‡-N,urea} + k_{‡-D,urea}$$

**LB**: medio de cultivo bacteriano Laura Bertani

**m<sub>‡-D</sub>**: pendiente de la rama de una cinética de plegamiento de un gráfico de Chevron

**m<sub>‡-N</sub>**: pendiente de la rama de una cinética de desplegado de un gráfico de Chevron

**m<sub>D,gu</sub>**: factor de proporcionalidad de MEL (aproximación de Parker et al., 1997)

**m<sub>D</sub>**: pendiente de la línea base del estado nativo de la dependencia entre  $\theta$  y  $c_{den}$

**m<sub>den</sub>**: factor de proporcionalidad del modelo MEL para un desnaturizante

**MEL**: Modelo de Extrapolación Lineal

**m<sub>N</sub>**: pendiente de la línea base del estado desnaturizado de la dependencia entre  $\theta$  y  $c_{den}$

**m<sub>p</sub>**: cantidad de proteína en la célula calorimétrica

**MUD**: Modelo de Unión al Desnaturizante

**N**: estado nativo de la proteína

**OC**: orden de contacto

**pb**: pares de bases

**Pm**: peso molecular

**PPi**: pirofosfato libre

**RCP:** reacción en cadena de la polimerasa

**RMN:** resonancia magnética nuclear

**SDS:** lauril sulfato sódico

**SDS-PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de lauril sulfato sódico

**T:** temperatura

**TB:** medio de cultivo terrorífico

**TBE:** tris-Borato-EDTA

**TEMED:** N, N, N', N'-tetrametiletiléndiamina

**T<sub>f</sub>:** temperatura de fusión de un oligonucleótido o cebador

**T<sub>H,den</sub>:** temperatura a la que  $\Delta H_D = 0$  en presencia de desnaturalizantes

**T<sub>H</sub>:** temperatura a la que  $\Delta H_D = 0$

**T<sub>m,den</sub>:** temperatura de la transición del proceso de desplegamiento en presencia de desnaturalizantes

**T<sub>m</sub>:** temperatura de la transición en la que  $\Delta G_D = 0$

**T<sub>m</sub><sup>\*</sup>:** temperatura de la desnaturalización por "frío"

$$t_r = T - T_r$$

**T<sub>r</sub>:** temperatura de referencia

**t<sub>R</sub>:** tiempo de respuesta del calorímetro

**T<sub>S,den</sub>:** temperatura de máxima estabilidad en presencia de desnaturalizantes

**T<sub>S</sub>:** temperatura de máxima estabilidad en la que  $\Delta S_D = 0$

**u:** urea

**u<sub>b</sub>:** cantidad de moléculas de urea unidas a la proteína durante el desplegamiento

**UV:** ultravioleta

**v:** velocidad de barrido del experimento de CDB (K/min)

**V<sub>cel</sub>:** volumen efectivo de la célula del calorímetro

**V<sub>p</sub> (T):** volumen específico parcial de la proteína en disolución

**V<sub>s</sub> (T):** volumen específico parcial del disolvente

**x<sub>D</sub>:** fracción de proteína que se encuentra en el estado desnaturalizado (D)

**x<sub>N</sub>:** fracción de proteína que se encuentra en el estado nativo (N)

**Φ<sub>‡-D</sub>:** grado de formación de cada interacción en el estado de transición

**[TS<sup>‡</sup>]:** estado de transición

**ΔG<sup>‡</sup>:** cambio de energía de Gibbs asociado a la constante de equilibrio K<sup>‡</sup>

$\Delta G_{\ddagger-D}$ : cambio de energía de Gibbs asociado a la constante de equilibrio  $K^{\ddagger}$  entre el estado inicial (D) y el estado de transición ( $[TS^{\ddagger}]$ ) en el proceso de plegamiento

$\Delta G_{\ddagger-N}$ : cambio de energía de Gibbs asociado a la constante de equilibrio  $K^{\ddagger}$  entre el estado inicial (N) y el estado de transición ( $[TS^{\ddagger}]$ ) en el proceso de desplegamiento

$\Delta\Delta G_{N-D}$ : energía de desestabilización inducida por una mutación

$\Delta\Delta G_{\ddagger-D}$ : cambio en la energía del estado de transición entre la especie de referencia y el mutante en el proceso de plegamiento

$\Delta\Delta G_{\ddagger-N}$ : cambio en la energía del estado de transición entre la especie de referencia y el mutante en el proceso de desplegamiento

$\Delta I_u$ : amplitud de la exponencial asociada al cambio total de fluorescencia que ocurre durante el proceso cinético

$\epsilon$ : coeficiente de extinción molar

$\Delta ASA$ : cambio de área accesible al solvente

$\Delta C_p$ : diferencia de capacidad calorífica molar parcial entre los estados desnaturalizado (D) y nativo (N)

$\Delta C_{p,b}$ : diferencia de capacidad calorífica molar parcial entre los estados desnaturalizado (D) y nativo (N) debida a la unión del desnaturalizante

$\Delta C_{p,den}$ : cambio de capacidad calorífica debido al desplegamiento en presencia de desnaturalizante

$\Delta C_{p,p}$ : diferencia de capacidad calorífica entre una disolución de macromoléculas biológicas y el disolvente

$\Delta G_b$ : cambio de energía de Gibbs de unión a la molécula de desnaturalizante

$\Delta G_D$ : cambio de energía de Gibbs del desplegamiento

$\Delta G_{den}$ : cambio de energía de Gibbs del desplegamiento en presencia de desnaturalizantes

$\Delta H_{b,den}$ : cambio de entalpía de la unión a un desnaturalizante

$\Delta H_{b,m}$ : cambio de entalpía de la unión a un desnaturalizante a la temperatura de la transición

$\Delta h_D$ : entalpía específica ( $\Delta H_D/P_m$ )

$\Delta H_D$ : cambio de entalpía de desplegamiento

$\Delta H_{den}$ : cambio de entalpía de desplegamiento en presencia de desnaturalizantes

$\Delta H_m$ : incremento de entalpía del desplegamiento a la temperatura de la transición ( $T_m$ )

$\Delta H_{m,den}$ : incremento de entalpía del desplegamiento a la temperatura de la transición ( $T_m$ ) en presencia de desnaturalizantes

$\Delta H^{vH}$ : entalpía de van 't Hoff

$\Delta J$ : cambio de un parámetro termodinámico debido a la desnaturalización

$\Delta m_s$ : cantidad de disolvente desplazado por la proteína en disolución

$\Delta n_{b,den}$ : número de sitios de unión al desnaturalizante en el desplegamiento

$\Delta S_D$ : cambio de entropía de desplegamiento

$\Delta S_{den}$ : cambio de entropía de desplegamiento en presencia de desnaturalizantes

$\Delta S_m$ : cambio de entropía del desplegamiento a la temperatura de la transición ( $T_m$ )

$\Delta Abs(\lambda)$ : diferencia de absorbancia medida en DC

$\epsilon_D$ : coeficiente de extinción molar para la luz polarizada a la derecha

$\epsilon_I$ : coeficiente de extinción molar para la luz polarizada a la izquierda

$$\Delta \epsilon = \epsilon_I(\lambda) - \epsilon_D(\lambda)$$

$\theta$ : elipticidad

$\theta_{222}$ : cambio de elipticidad seguido a 222 nm

$\theta_{222,D}$ : elipticidad del estado desnaturalizado a 222 nm

$\theta_{222,N}$ : elipticidad del estado nativo a 222 nm

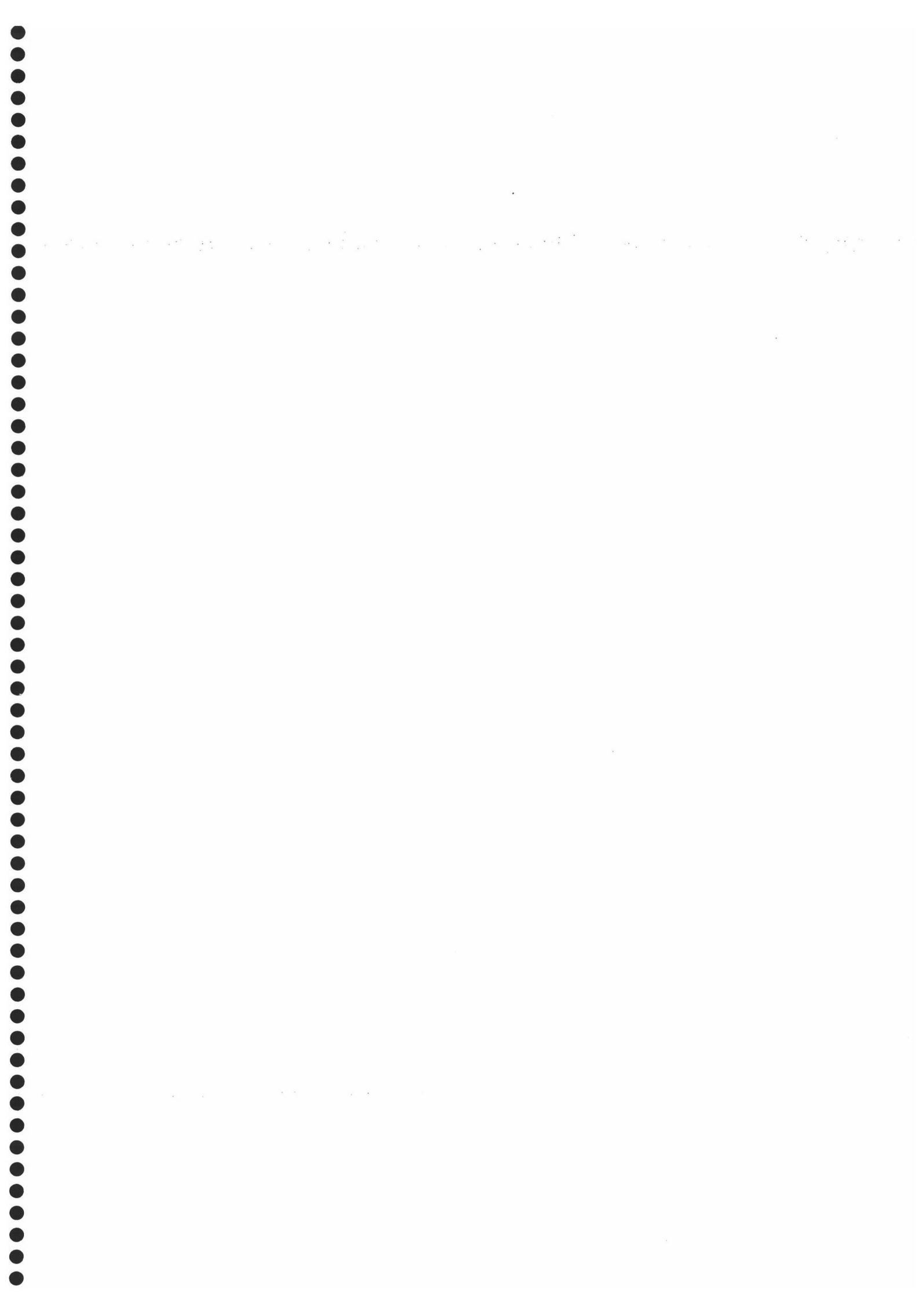
$[\theta]$ : elipticidad molar

$[\theta]_{MMR}$ : elipticidad molar media por residuo

$[\theta]_{MMR,222}$ : elipticidad molar media por residuo medida a 222 nm



# **INTRODUCCIÓN**



La elucidación del proceso del plegamiento de proteínas y la racionalización de su estabilidad en el estado nativo, funcionalmente activo, constituye hoy día uno de los desafíos intelectuales más importantes en el campo de la química biofísica. Así, aunque está admitido y aceptado que la secuencia de una proteína predetermina su conformación nativa y que el camino del plegamiento de la cadena no puede ser aleatorio, se está aun lejos de una descripción del proceso y, consecuentemente, de la interpretación de la estabilidad conformacional (entendida como la diferencia de energía de Gibbs,  $\Delta G_D$ , entre el estado inicial, desordenado, y el final, plegado, conjuntamente con las funciones relacionadas de entropía ( $\Delta S_D$ ), entalpía ( $\Delta H_D$ ) y capacidad calorífica ( $\Delta C_p$ )). Precisamente el camino más directo para la definición cuantitativa de dicha estabilidad es por medio de del estudio de la desnaturalización (desplegamiento) del estado nativo. Más aún, la naturaleza de lo que se ha venido llamando estado desplegado o desnaturalizado, el papel de los denominados estados fundidos en el plegamiento o la función de ciertas proteínas coadyuvantes a su vez al correcto plegamiento in vivo de las proteínas son, entre otros, temas de gran actualidad en este campo.

Por otra parte, el estudio del proteoma, es decir, del conjunto de proteínas que se generan a partir de la información contenida en el genoma de un ser vivo, mediante lo que se conoce como proteómica, también ha adquirido una gran importancia en los últimos tiempos. Los avances realizados en esta ciencia permiten establecer relaciones entre los genes y las proteínas, centrandó su interés en el papel que ambos juegan en el desarrollo de muchas enfermedades. De esta manera pueden seleccionarse dianas moleculares, proteínas con las que interaccionan selectivamente los fármacos para lograr una respuesta terapéutica. Las proteínas son las macromoléculas más abundantes dentro del conjunto celular, y desempeñan una gran variedad de funciones (por ejemplo de transporte, de tipo estructural, ó inmunológica) imprescindibles para el funcionamiento del organismo de los seres vivos. Por esta razón, el objetivo que se pretende alcanzar dentro del Proyecto Proteoma Humano (PPH) es construir el mapa de proteínas que llevan a cabo las reacciones químicas del cuerpo. Esto implica tener conocimiento acerca de cómo se sintetizan las proteínas a partir de la información contenida en los genes. A veces esta no es una tarea sencilla, debido a que las proteínas tienen la capacidad de sufrir modificaciones químicas a través de mecanismos que no están bajo control genético, como respuesta a estímulos del entorno, que se traducen en cambios en el plegamiento de las mismas. La identificación de proteínas se realiza actualmente de forma relativamente sencilla gracias a los avances logrados en las técnicas experimentales utilizadas

y al desarrollo de la bioinformática. Ésta proporciona las herramientas necesarias para encontrar, interpretar y relacionar la información contenida en las bibliotecas genéticas, en las que se dispone de las secuencias de los genes de gran número de organismos, con los hallazgos de la proteómica.

Muchas proteínas globulares de pequeño tamaño presentes en la naturaleza se pliegan siguiendo un modelo de dos estados. A pesar de existir una gran similitud de tamaño entre ellas, pueden encontrarse diferencias notables dentro de sus estabilidades y cinéticas de plegamiento, así como a nivel estructural y de secuencia aminoacídica. La correcta comprensión de este mecanismo de plegamiento requiere obtener información, no solo de sus estados nativo y desnaturalizado como se ha mencionado anteriormente, sino del estado de transición, que nos permita posteriormente encontrar las claves para el entendimiento de dicho proceso en proteínas de tamaños mayores. El rápido desarrollo producido en los últimos tiempos en el campo de la ingeniería de proteínas, ha hecho que la mutagénesis dirigida sea la herramienta fundamental utilizada en los estudios de plegamiento y estabilidad. Así, combinando medidas cinéticas y de equilibrio realizadas sobre conjuntos de mutantes diseñados para una proteína, pueden calcularse parámetros termodinámicos que relacionen la pérdida de energía en el estado de transición, en relación al estado nativo, para cada mutación puntual. La relación existente entre dichos parámetros y la extensión del proceso de formación de estructura sirve para indicar en qué grado de plegamiento se encuentra la región que envuelve a cada mutación concreta en el estado de transición. Estudios previos realizados sugieren la existencia de un núcleo de plegamiento a partir del cual podría tener lugar la unión de otras regiones polipeptídicas.

Por otra parte, la medida de la estabilidad conformacional de las proteínas globulares en términos de energía de Gibbs de desplegamiento es imprescindible para lograr una correcta interpretación acerca de las interacciones que estabilizan la estructura de las proteínas. Adquieren carácter relevante aquellos estudios en los que las interacciones estabilizantes se perturban a través de la realización de mutaciones sobre la secuencia aminoacídica o a partir de cambios en el entorno. La estimación de dicha estabilidad se basa en el análisis de los procesos de desplegamiento inducidos térmicamente o con agentes desnaturalizantes (urea y guanidina), seguidos de las técnicas apropiadas. La metodología experimental más adecuada para la caracterización energética del

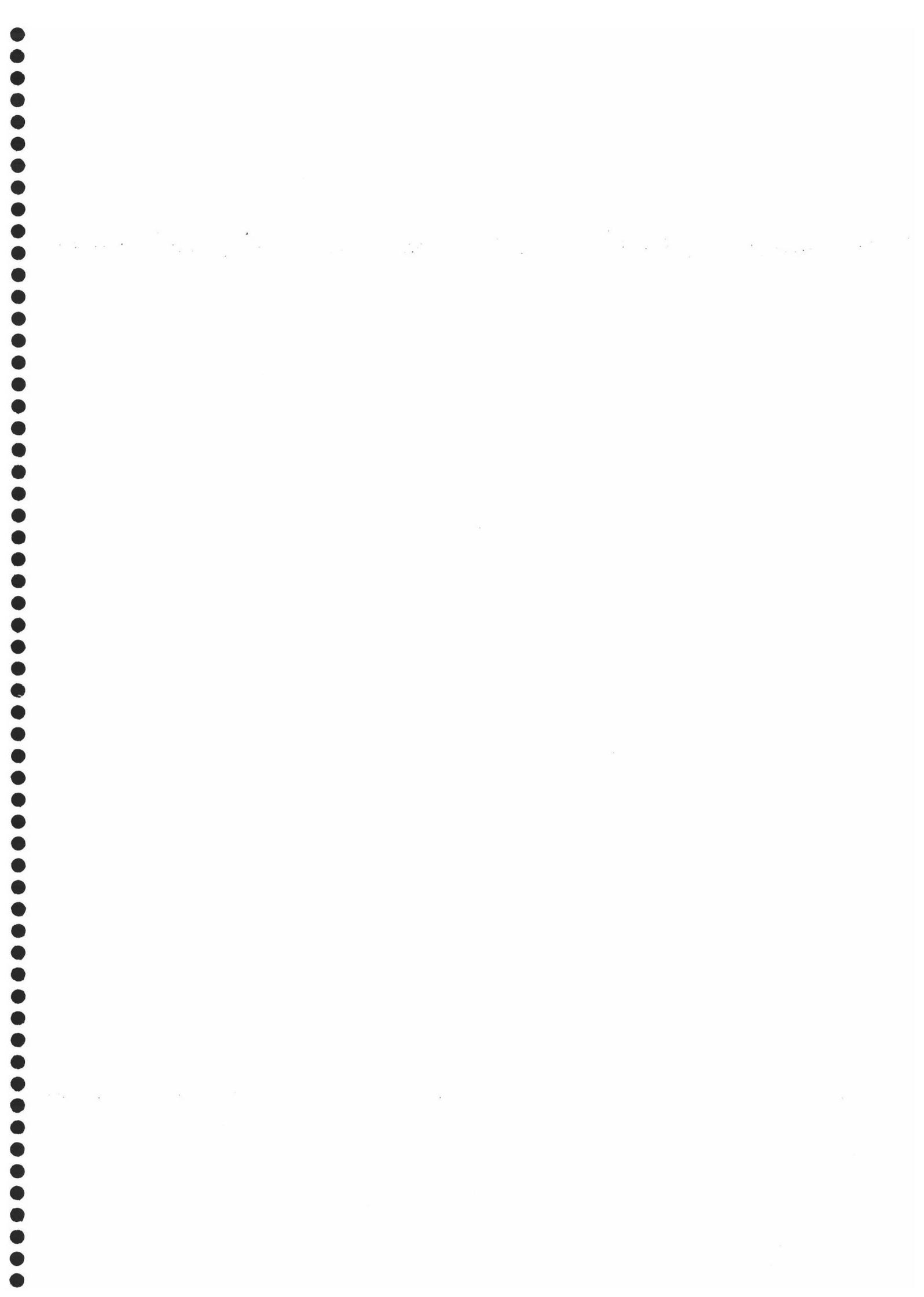
plegamiento/desplegamiento térmico de proteínas es la calorimetría diferencial de barrido (CDB), que como se describirá a lo largo de esta memoria, permite obtener la capacidad calorífica en función de la temperatura y a partir de ella las funciones termodinámicas para el proceso de la desnaturalización:  $\Delta S_D$ ,  $\Delta H_D$ ,  $\Delta G_D$  y  $\Delta C_p$ . El desarrollo de los algoritmos y métodos de análisis adecuados permite también la caracterización termodinámica de los dominios intramoleculares en proteínas multidominio y de los procesos de asociación disociación de proteínas oligoméricas que se desnaturalizan reversiblemente. El estudio por CDB se complementa muy bien con estudios paralelos por técnicas ópticas estructurales, tales como el dicroísmo circular (DC), especialmente adecuado para proteínas de alto contenido en hélices  $\alpha$ . El análisis termodinámico de los datos obtenidos mediante estas dos técnicas exige la reversibilidad del proceso del desplegamiento, como ocurre precisamente en el caso de la mayoría de las proteínas pequeñas, y en los dominios aislados de proteínas globulares. Por otra parte, el análisis desde el punto de vista cinético del plegamiento de las proteínas, requiere del uso de otras técnicas específicas como el flujo detenido, que permiten seguir las reacciones en las direcciones del plegamiento y desplegamiento, en presencia de agentes desnaturalizantes, para obtener las constantes de velocidad correspondientes y aplicar a partir de aquí los modelos adecuados que describan el comportamiento del sistema de estudio.

Por todas estas razones, la línea de investigación de nuestro grupo de investigación, centrada durante mucho tiempo en la caracterización termodinámica del plegamiento de pequeñas proteínas globulares utilizando fundamentalmente la calorimetría, ha introducido otras herramientas que nos han permitido completar la caracterización de dicho proceso, basadas en el uso de la Biología Molecular y de la Bioquímica. Dentro de este contexto, el objetivo de esta Memoria, está dirigido fundamentalmente al estudio del plegamiento y estabilidad de pequeñas proteínas o dominios estructurales, aislados y purificados de otras proteínas de mayor tamaño, y cuya desnaturalización puede describirse mediante modelos sencillos, lo que redundará en la calidad y cantidad de la información que puede obtenerse. Así, se ha investigado el dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina. Este dominio tiene 62 restos en su secuencia. Su estructura ha sido resuelta mediante cristalografía de rayos X y en disolución, por Resonancia Magnética Nuclear, presentando un modelo de estructura fundamentalmente  $\beta$  no conteniendo cofactores ni puentes disulfuro. Como se describirá en esta memoria, se han realizado numerosos estudios sobre la estabilidad y plegamiento de este dominio y de numerosos mutantes del mismo, sugiriendo que no existen especies intermedias detectables a

nivel cinético y termodinámico. Además, el análisis comparativo con otras proteínas de esta familia, de plegamiento similar y diferente secuencia ha indicado que el plegamiento está dirigido entrópicamente y determinado, como se ha mencionado anteriormente, por la topología del estado nativo. Estos resultados han hecho que se considere a este dominio como un sistema modelo para estudios de plegamiento en la comunidad científica. Aquí se ha caracterizado termodinámica y cinéticamente un mutante del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina, el Best5I25V, diseñado racionalmente introduciendo modificaciones en el corazón hidrofóbico de la estructura para mejorar su estabilidad. La caracterización del estado de transición de este mutante ha requerido del diseño, expresión y purificación de una serie de mutantes puntuales realizados sobre el mismo con los que se han obtenido experimentalmente las cinéticas de plegamiento y desplegamiento en presencia de urea y el posterior análisis aplicando el método de la ingeniería de proteínas. El segundo sistema de estudio escogido ha sido la proteína AS-48, un antibiótico peptídico de 70 aminoácidos. Su estructura, basada fundamentalmente en la presencia de hélices  $\alpha$ , ha sido resuelta mediante RMN y presenta la peculiaridad de ser una cadena cíclica cerrada. Este hecho, según los estudios termodinámicos realizados mediante calorimetría y dicroísmo circular en presencia de agentes desnaturalizantes descritos en esta Memoria, parece estar íntimamente relacionado con la alta estabilidad que presenta esta proteína.

Finalmente, hay que añadir que la práctica totalidad de la investigación que se presenta en esta Memoria, realizada en colaboración con otros grupos de investigación, ha sido publicada muy recientemente o se encuentra en preparación: *FEBS Lett.* (2001) **505**, 379-382; *Biochem. Biophys. Acta* (2002), enviado.

# MATERIALES



## 2.1 PRODUCTOS

Los siguientes productos se obtuvieron de la casa comercial MERCK: la urea utilizada en los experimentos de DC y flujo detenido, y la utilizada en las purificaciones de los mutantes. La glicina, fosfato sódico dibásico y monobásico, el carbonato sódico, y el azul de bromofenol. El glicerol, el ácido acético (96 %) y el 2-mercaptoetanol.

El cloruro de guanidina ha sido adquirido de la casa PIERCE de grado ultrapuro. Se conserva en desecador por ser muy higroscópico.

De la casa PANREAC son: el metanol y el ácido clorhídrico (35 %, químicamente puro). El sulfato amónico sólido y el nitrato de plata.

De la casa SIGMA se han adquirido: el aceite mineral para las reacciones en cadena de la polimerasa, el isopropil  $\beta$ -D-thiogalactopiranosido (IPTG) y la ampicilina (sal sódica). La disolución comercial al 30% de acrilamida/Bis-acrilamida y el Coomassie Brilliant Blue R, la disolución de bromuro de etidio, la disolución de formaldehído al 37 % y el ácido tricloroacético. El TRIZMA base, el tiosulfito sódico y el persulfato sódico (APS). Éste último se conserva en el desecador por descomponerse en presencia de agua.

El lauril sulfato sódico (SDS) empleado en la preparación de los geles de electroforesis es de la casa FLUKA.

De CARLO ERBA es el ácido bórico.

De SERVA es la sal disódica del ácido trietilen-diamino-tetracético (EDTA).

De BIORAD se han adquirido la resina de intercambio iónico, AG501-X8(D) utilizada para purificar las disoluciones de urea, y la agarosa.

De la casa MBI FERMENTAS son: el tampón comercial de tinción de las muestras de gel de agarosa a una concentración 6X y los patrones de ADN (100 bp DNA Ladder), conteniendo fragmentos comprendidos entre 80 y 1031 pares de bases utilizados en la electroforesis de agarosa y el enzima de restricción NcoI (10 U/ $\mu$ L).

El enzima de restricción HindIII (15 U/ $\mu$ L) es de la casa PHARMACIA.

De la casa ROCHE BIOCHEMICALS son: la mezcla de los nucleótidos (dNTP's), de concentración 10 mM, la Taq ADN-polimerasa (5 U/ $\mu$ L, 250 U totales) y su tampón de dilución (a concentración 10x), utilizadas en las RCP. El tampón utilizado en la digestión con los enzimas de restricción (Sure Cut Buffer B for Restriction Enzymes, 10x). La batería de reactivos utilizados en la ligación con la ligasa T4 (5 U/ $\mu$ L) (Rapid Ligation Kit). La batería

de reactivos empleados para la purificación de los plásmidos (High Pure Plasmid Isolation Kit).

De QIAGEN se ha adquirido la batería de reactivos empleados en la purificación de los productos de la RCP (PCR Purification Kit, Qlaquick).

De CAMGEN (Cambridge Molecular) es la batería de reactivos utilizados para la extracción y purificación de ADN de los geles de agarosa (Gelex DNA Extraction Kit).

Las células competentes utilizadas en las transformaciones de la cepa XL1-Blue son de la casa comercial STRATAGENE y las de la cepa BL21-DE3 de la casa comercial NOVAGEN.

Los oligonucleótidos y cebadores para la producción de mutantes se han adquirido a partir de la síntesis química comercial de las empresas GENTEX OLIGOS (Francia), en el laboratorio del Dr. Serrano (EMBL) y PHARMACIA (Barcelona) en nuestro laboratorio.

La triptona peptona, el bacto agar y extracto de levadura utilizados para la preparación de los medios de cultivos han sido adquiridos de la casa comercial DIFCO.

. Todas las disoluciones preparadas en condiciones de esterilidad se han filtrado en filtros estériles de tamaño de poro 0.2  $\mu\text{m}$  de SARSTED. De esta misma casa son los filtros de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro empleados para filtrar los extractos celulares antes de purificarlos mediante cromatografía.

El agua para preparar todas las disoluciones es destilada y desionizada mediante una resina de intercambio iónico y posteriormente desionizada y filtrada de nuevo en un equipo Milli-Q (Millipore). Las disoluciones tampón se han filtrado a través de filtros Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$ .

Para las diálisis se han utilizado membranas de ESPECTRA/POR de tamaño de poro adecuado. En nuestro caso de 3500 Daltons de peso molecular excluido, que se preparan antes de utilizarse mediante calentamientos sucesivos en agua Milli-Q hasta 80 °C. Se almacenan a 4 °C en una disolución acuosa de azida sódica al 0.02 %.

## 2.2 INSTRUMENTACIÓN

Para la obtención de los espectros ultravioleta-visible de las muestras de proteína se han utilizado indistintamente un Espectrofotómetro BECKMAN DU 70 de haz simple ó un espectrofotómetro JASCO V-530 de doble haz.

Las medidas de pH se han realizado utilizando electrodos combinados de vidrio Crison, bien el modelo 52-03 para volúmenes grandes, bien el modelo 52-09 “micro” para volúmenes pequeños conectados a un pH-metro Crison. La sensibilidad de ambos es de  $\pm 0.1$  unidades. Para la calibración de los pH-metros se han utilizado dos disoluciones estándar Crison de pH 7.02 y 4.00 a 25 °C.

La liofilización de las muestras de proteína se ha realizado en un liofilizador HETO modelo FD 1.0.

La sonicación de la urea se ha realizado en un sonicador de la casa comercial SELECTA.

Para la esterilización del material se ha utilizado un autoclave SELECTA que proporciona una temperatura máxima de 134 °C.

Para realizar las reacciones de la RCP se ha utilizado un termociclador modelo Prog02D de la casa PROGENE.

Para los cultivos de bacterias se ha utilizado un baño orbital termostatzado modelo SBD50 Bio de la casa comercial HETO (Lab Equipment), que permite alcanzar velocidades comprendidas entre 20 y 100 rpm.

El aparato de electroforesis en presencia de SDS utilizado ha sido el modelo Mighty Small II, SE-250 de la casa comercial Hoefer. En el caso de las electroforesis en presencia de agarosa se ha empleado una cubeta modelo H1-SET de la casa Scie-Plas Ltd.. En ambos casos se ha alimentado con una fuente de tensión constante de la casa Arrosu Radio.

La visualización de las bandas de los geles de electroforesis en agarosa se ha realizado en un transiluminador cedido amablemente por el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de esta Universidad.

Las centrifugaciones realizadas durante las purificaciones se han realizado en dos centrífugas: Kokusan modelo H251 con un rotor tipo M1 (2200 g) y una ultracentrífuga Beckman modelo L5-40 con un rotor R35 (12000 g).

Las centrifugaciones de pequeños volúmenes de muestra se han realizado en una centrífuga de mesa Hettich modelo EBA-12 (14000 rpm) para tubos de tipo Eppendorf.

En la purificación de los mutantes se ha utilizado una columna cromatográfica separativa de exclusión molecular “Hi-Load Sephadex-75” de PHARMACIA BIOTECH, un detector UV-visible de flujo modelo UV-1 y un colector automático modelo Frac-100 de la misma casa comercial. La columna está conectada a una bomba peristáltica, de la casa COLE-PARMER, modelo 7524-15.

Para los experimentos de calorimetría diferencial de barrido (CDB) se ha utilizado un microcalorímetro diferencial de barrido VP-DSC (MicroCal Incorporated), cuyas características se describen con detalle en la sección 3.6.

Para los experimentos de dicroísmo circular (DC) se ha utilizado un espectropolarímetro Jasco-715 de la casa comercial Japan Corporation, cuyas características se detallan en la sección 3.7.

Parte de la producción de mutantes sobre el dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina y todos los experimentos correspondientes de cinéticas rápidas mediante la técnica de flujo detenido, así como las titulaciones en presencia de guanidina realizadas con la proteína circular AS-48 mediante dicroísmo circular, se han realizado en el laboratorio del Dr. Serrano, en el EMBL (European Molecular Biology Laboratory) (Heidelberg (Alemania)), dentro del marco de colaboración que existe con nuestro grupo.

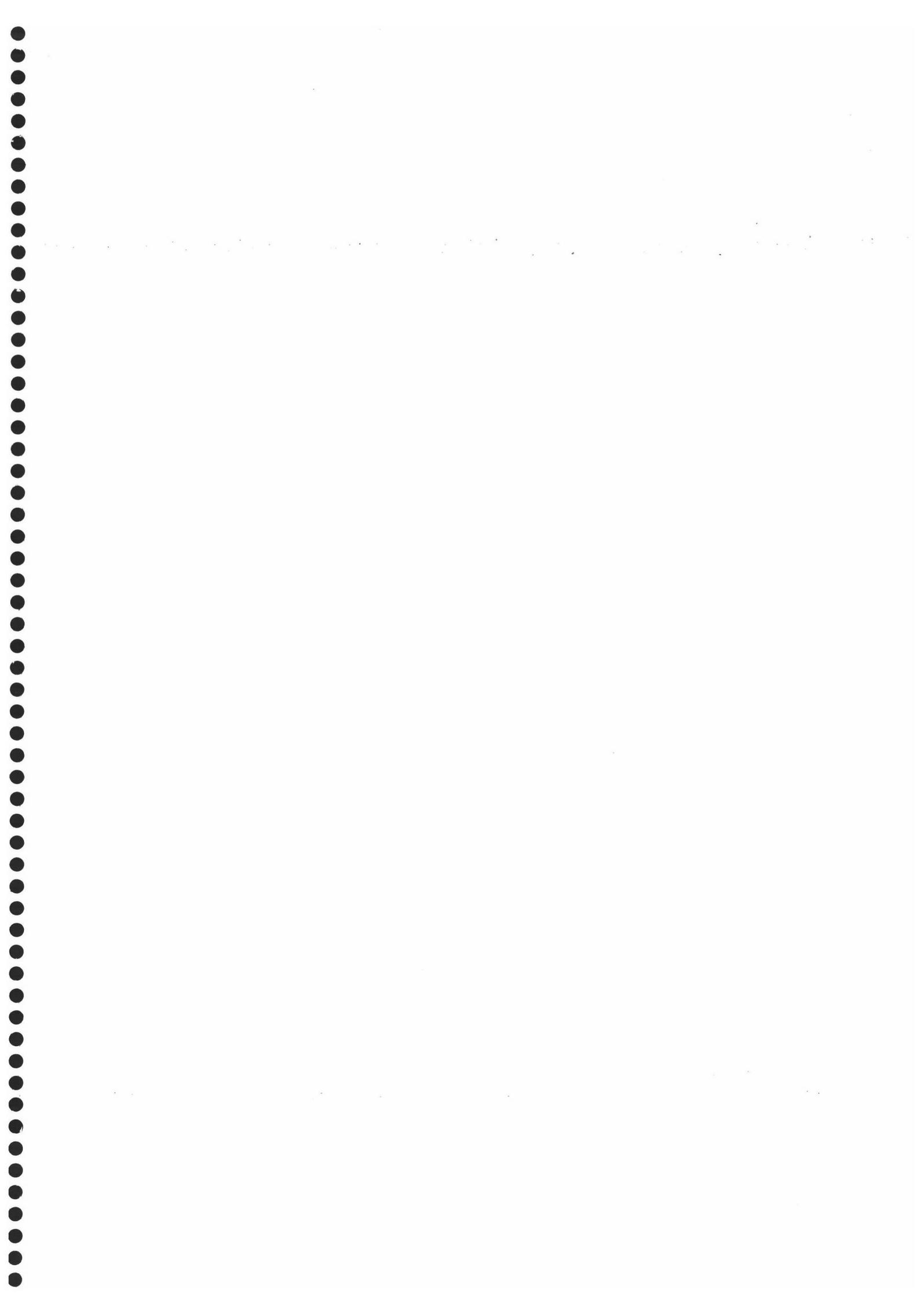
Los cálculos de las funciones de la capacidad calorífica molar parcial del estado desnaturalizado de las proteínas a partir de sus secuencias se han realizado mediante el programa CPUNFOLD, cedido amablemente por el Dr. Francisco Conejero Lara, perteneciente a nuestro grupo de investigación.

La proteína AS-48 ha sido expresada y purificada como se describe en la literatura (Gálvez et al., 1989), por el Dr. Antonio Gálvez del departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la U. de Granada.

Las representaciones de las estructuras tridimensionales se han realizado con ayuda de los programas MOLMOL (Koradi et al., 1996) y MOLSCRIPT (Kraulis, 1991). Las superficies de AS-48 han sido construidas usando el programa WebLab ViewerLite 4.0 (Molecular Simulations Inc.) y las simulaciones del estado desplegado de las proteínas se han realizado con el programa INSIGHTII (Biosim, California, USA) instalado en una estación INDIGO O<sub>2</sub> (Silicon Graphics, USA). Las áreas accesibles al solvente se han calculado mediante el programa NACCESS, del Dr. S. Hubbard (EMBL, Heidelberg).

Los análisis de datos y representaciones gráficas se han realizado con los programas ORIGIN 5.0 (MicroCal) y SIGMA PLOT, 2000 (SPSS Science) y KALEIDA GRAPH (SYNERGY SOFTWARE).

## MÉTODOS



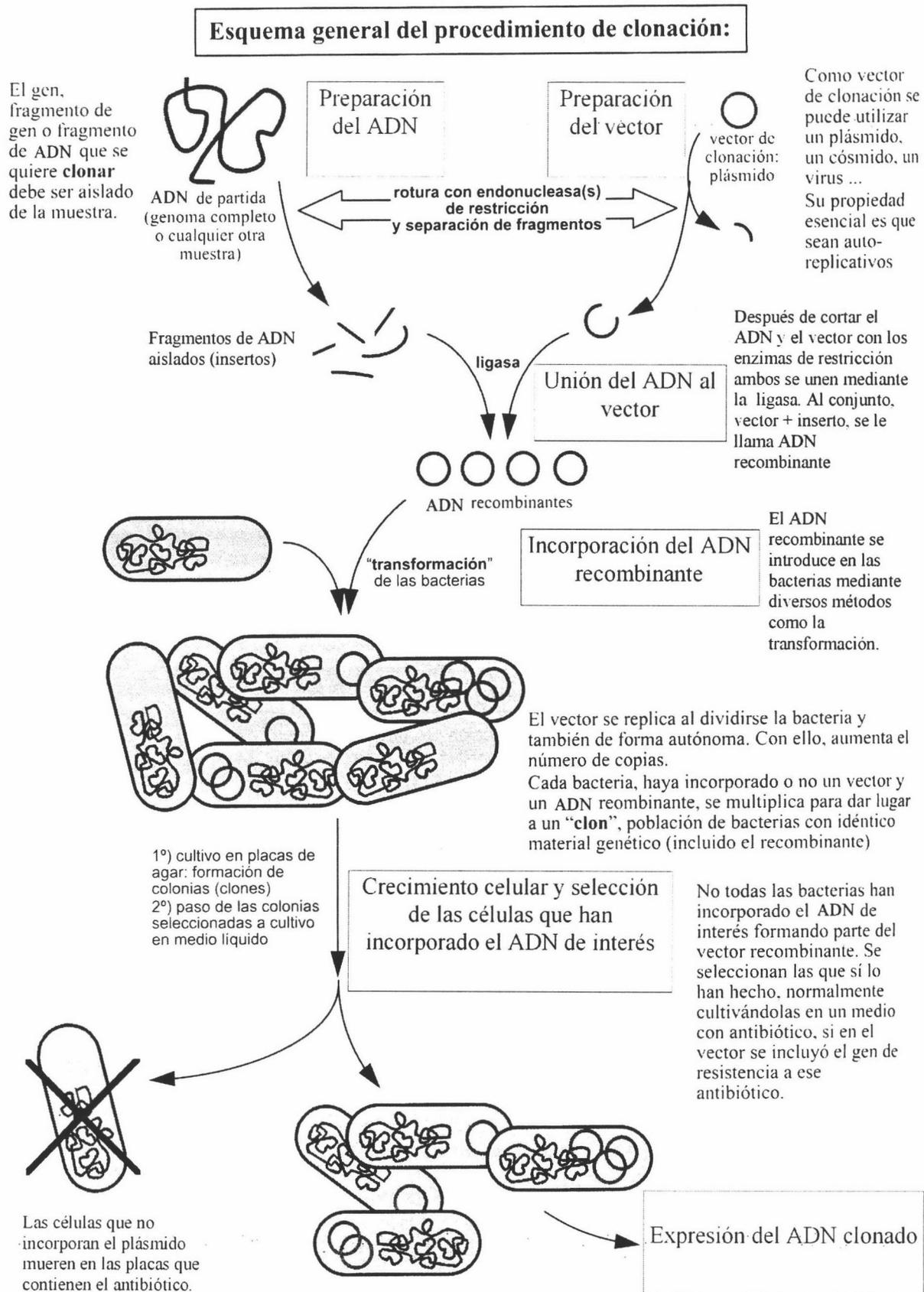
### **3.1 PRODUCCIÓN DE MUTANTES DEL DOMINIO SH3 DE $\alpha$ -ESPECTRINA MEDIANTE MUTAGÉNESIS DIRIGIDA**

#### **3.1.1 INTRODUCCIÓN**

Actualmente es posible sintetizar, manipular y disponer de cantidades ilimitadas de los genes que codifican cualquier proteína de interés. Además podemos modificar dichos genes en sitios específicos pudiendo generar en la secuencia de los mismos prácticamente cualquier alteración que se desee, a la que denominaremos mutación. La técnica que se utiliza para este fin se conoce como mutagénesis dirigida y fue desarrollada por Michael Smith de la University of British Columbia en Vancouver. El ADN que se obtiene a partir de esta técnica recibe el nombre de ADN recombinante porque incluye segmentos de moléculas precursoras de ADN distintas. El ADN recombinante que incluye las mutaciones deseadas, puede introducirse a su vez en una célula llamada célula huésped, y seguidamente llevar a cabo la expresión de su gen para sintetizar la correspondiente proteína mutada, que podrá ser purificada utilizando técnicas como las que se describen en las secciones 3.2 y 3.3.

La mutagénesis dirigida puede llevarse a cabo mediante varias estrategias, entre las que destacan la mutagénesis realizada en “casete” y la mutagénesis basada en la reacción en cadena de la polimerasa (RCP). Éste último ha sido el método escogido en nuestro caso para producir mutantes debido a las ventajas que presenta frente al primero, como se detalla en la sección 3.1.3.

Así, la estrategia general para la obtención de mutantes mediante mutagénesis dirigida por el método de la RPC (Ausubel et al, 1992; Creighton, 1993) en sistemas de expresión bacterianos considera como punto de partida la secuencia de ADN que codifica la proteína silvestre, es decir, la proteína tal cual existe en la naturaleza. La idea básica consiste en introducir los cambios deseados en esta secuencia mediante el diseño de los oligonucleótidos y cebadores adecuados y el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), que generará copias del nuevo ADN conteniendo la secuencia del gen que codifica la proteína mutada. Los pasos siguientes (Figura 3.1.1) son la digestión del ADN para obtener el correspondiente fragmento mutado (al que comúnmente se le llama inserto) y la ligación de dicho fragmento a un vector de expresión, produciendo el plásmido mutante. Éste se introduce a continuación en células huésped de la bacteria (*Escherichia coli* en nuestro caso), mediante un proceso llamado transformación. Las células transformadas se crecen en los medios de cultivo



**Figura 3.1.1:** Esquema general de la obtención de mutantes mediante el uso de la mutagénesis dirigida, en el que no se incluye el proceso de la RCP (Figura 3.1.2).

adecuados en presencia del antibiótico al que presentan resistencia, y se realizan ensayos de expresión para obtener, utilizando un agente inductor, la proteína de interés.

### 3.1.2 CONCEPTOS Y DEFINICIONES

**ADN recombinante:** Molécula de ADN que incluye segmentos de moléculas precursoras de ADN distintas.

**Cebador:** Fragmento de ADN que contiene cualquiera de los extremos terminales de una secuencia de ADN, incluyendo los sitios de reconocimiento de los enzimas de restricción.

**Célula huésped:** Célula bacteriana en la que se introduce el plásmido conteniendo el gen que codifica una proteína.

**Digestión:** Proceso llevado a cabo por enzimas de restricción mediante el cual se corta la copia obtenida mediante la RCP en sitios específicos, obteniendo así el inserto.

**Enzimas de restricción (endonucleasas de restricción):** Enzimas capaces de reconocer pequeñas secuencias dentro de la doble cadena del ADN cortándola en sitios específicos.

**Inserto:** Fragmento de ADN aislado que contiene la mutación deseada.

**Ligación:** Mecanismo llevado a cabo por el enzima T4 ADN ligasa para la obtención del plásmido a partir de un inserto que contiene la mutación y de un vector determinado.

**Oligonucleótido:** Fragmento de ADN monocatenario que contiene la modificación (mutación) deseada.

**Plásmido:** Pequeña molécula circular de ADN que contiene la información que codifica la proteína, dada por su secuencia aminoacídica, y es capaz de reproducirse independientemente en una célula huésped.

**Reacción en cadena de la polimerasa (RCP):** Técnica utilizada para amplificar el número de copias de una secuencia específica de ADN a través de ciclos repetidos de desnaturalización y amplificación gracias a la presencia de un enzima, la ADN-polimerasa.

**Recombinación:** Proceso por el cual dos moléculas de ADN dan lugar a una nueva molécula que combina segmentos de las dos moléculas precursoras, incluyendo la integración de una molécula en otra, la sustitución de un segmento por otro de una molécula de ADN distinta o el intercambio de dos segmentos homólogos entre las dos moléculas precursoras.

**Transformación:** Proceso que permite introducir un plásmido en una célula huésped bacteriana.

**Vector:** Fragmento de ADN de varios miles de pares de bases de longitud, que contiene entre otros elementos, un origen de duplicación del ADN, sitios específicos de unión al inserto y uno o más genes que confieren resistencia a uno o más antibióticos.

### 3.1.3 AMPLIFICACIÓN DEL ADN: LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RCP)

El uso de la técnica de mutagénesis dirigida a partir de la reacción en cadena de la polimerasa presenta numerosas ventajas frente al uso de la técnica de mutagénesis mediante “casete” (Ausubel et al, 1992). En ésta, se utiliza el fragmento de ADN que codifica la proteína, llamado “casete” que se corta con ayuda de enzimas de restricción específicas. El “casete” se forma por síntesis química de dos oligonucleótidos que contienen la secuencia deseada y se hibridan entre sí, formando así un “casete” que se inserta posteriormente en el vector entre los sitios deseados.

Las principales limitaciones de esta técnica radican en la dificultad para encontrar sitios de restricción adecuados cerca del gen natural; además de esto, la pureza de los oligonucleótidos y cebadores sintéticos disminuye de forma lineal con el aumento de la longitud de los mismos, con lo cual su diseño presenta en este sentido la necesidad de adquirir un compromiso entre ambos parámetros.

Sin embargo, la introducción en 1987 del uso de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) (Mullis & Faloona, 1987), permitió la posibilidad de copiar fragmentos pequeños de ADN de unos cientos de pares de bases in vitro.

Con la RPC, el ADN se amplifica según un proceso cíclico, en el que cada uno de los ciclos que lo componen consta de tres pasos básicos (Figura 3.1.2):

a) **Desnaturalización térmica de la doble cadena de ADN.** En este primer paso se desnaturaliza completamente la doble cadena del ADN molde que contiene la secuencia que se desea amplificar, calentando la mezcla de reacción a 94 °C entre 1 y 3 minutos.

Para conseguir el mayor rendimiento, es necesario tener en cuenta algunos aspectos prácticos para el proceso de desnaturalización a lo largo del conjunto de los ciclos establecidos: así, durante la repetición de este paso en cada ciclo, es suficiente mantener la desnaturalización a 94 °C durante 20 ó 30 segundos, aunque este tiempo puede variar en función del instrumento y del tamaño de los tubos usados para las mezclas de reacción. Por

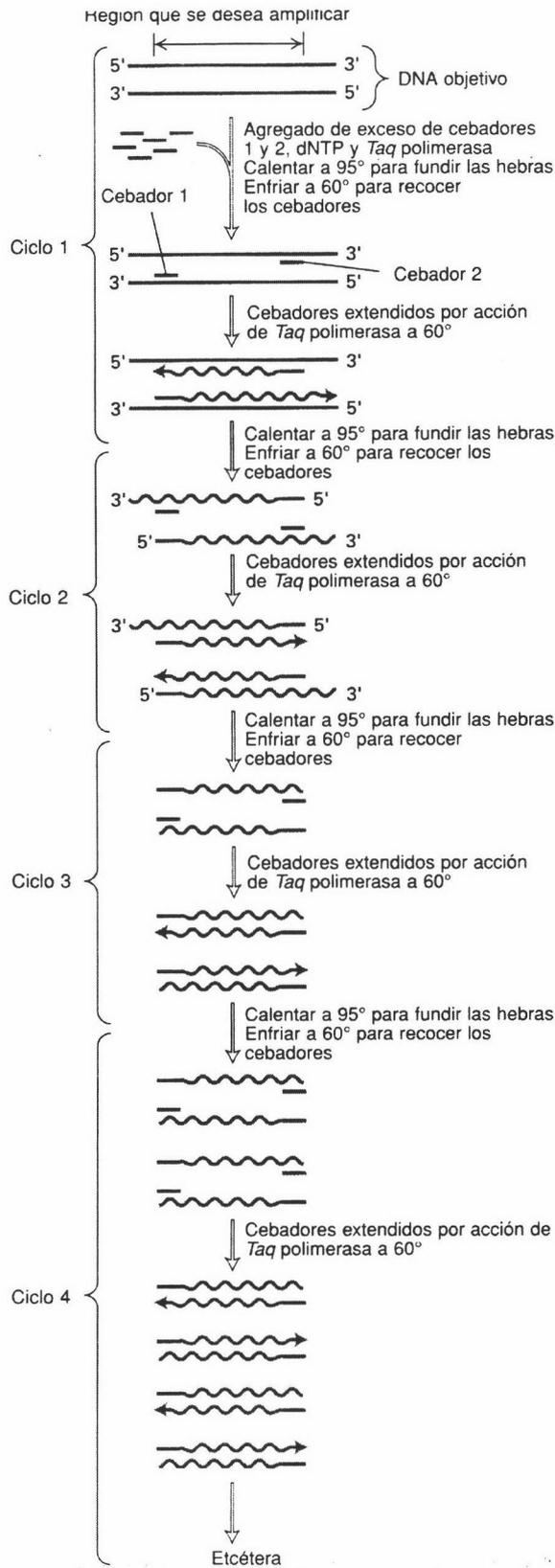
otra parte, si el ADN usado como molde solo se desnaturaliza parcialmente, debido a que la temperatura no alcanzara el valor adecuado indicado anteriormente, la cadena tiende a aparearse de forma rápida impidiendo que se lleve a cabo eficazmente la primera hibridación y la primera extensión o dando lugar a que la reacción se dé con su propia cadena, generando falsos resultados positivos. También hay que tener en cuenta que en el caso de contar con secuencias de ADN que contengan un alto porcentaje de guaninas (G) o citosinas (C), debe aumentarse el tiempo y la temperatura de desnaturalización, ya que la estabilidad de la doble hélice se incrementa por la presencia del triple enlace de hidrógeno entre ambas bases en lugar del doble existente entre adenina (A) y timina (T). De todas maneras, en general no es conveniente emplear tiempos de desnaturalización mayores de los requeridos, debido a que las altas temperaturas favorecen la pérdida de actividad de la ADN-polimerasa.

**b) Hibridación específica de los cebadores a sus respectivas cadenas complementarias de ADN.** Una vez desnaturalizada la doble cadena de ADN, debe tener lugar la hibridación específica de los oligonucleótidos a los que hemos denominado cebadores a sus respectivas cadenas complementarias.

La elección de la temperatura de hibridación, como se discute en la sección 3.1.4 es un factor crítico, ya que la especificidad de la reacción depende de ella. Tiene que ser optimizada empíricamente. Así, temperaturas demasiado altas favorecen que no se produzca hibridación alguna, y temperaturas excesivamente bajas incrementan la posibilidad de que tengan lugar hibridaciones no específicas. Además, si los cebadores contienen bases complementarias entre sus secuencias, pueden darse efectos de dimerización de los mismos al hibridarse entre ellos.

**c) Extensión de los cebadores mediante la intervención de la ADN-polimerasa.** Una vez completado el paso anterior, es necesario copiar las secuencias molde en los dos cebadores mediante la actuación de la ADN-polimerasa. En nuestro caso, el enzima empleado es una forma termoestable conocida como Taq ADN-polimerasa obtenida a partir de una bacteria termófila (*Thermus aquaticus*). La Taq ADN-polimerasa no se destruye a la temperatura de desnaturalización, evitando de este modo tener que emplear en cada ciclo de la reacción nuevas cantidades de dicho enzima.

La temperatura óptima de actuación del enzima que coincide con la temperatura a la que se produce la extensión de los cebadores es 72 °C. A esta temperatura, el enzima es capaz de añadir aproximadamente 62 bases por segundo.



**Figura 3.1.2:** Reacción en cadena de la polimerasa. En cada uno de los ciclos de amplificación, la doble cadena se separa, los oligonucleótidos o cebadores en su caso se unen a los extremos de la región seleccionada y la *Taq* ADN-polimerasa realiza la copia y extensión del segmento.

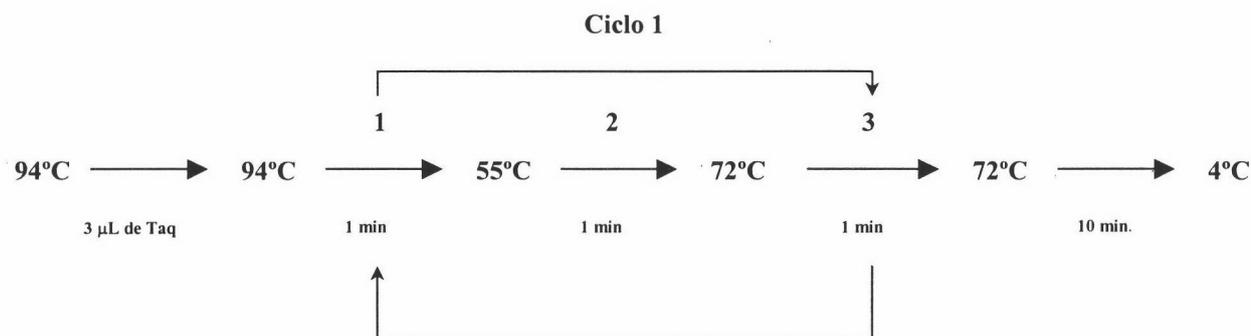
El tiempo de duración de esta etapa varía en función del tamaño del fragmento de ADN que se desea amplificar. De forma aproximada, puede estimarse que en el caso de fragmentos del orden de 1 kb, 45 segundos es tiempo suficiente para la extensión de los cebadores.

En cualquier caso, si se desea obtener el máximo rendimiento en este paso a lo largo del total de ciclos empleados para la reacción, puede seguirse el siguiente esquema de tiempos de extensión: durante los 10 primeros ciclos debe utilizarse un tiempo de extensión constante, mientras que durante los 20 ciclos restantes el incremento del tiempo debe estar comprendido entre 2 y 5 segundos entre un ciclo ejecutado y el siguiente.

Esta forma de proceder deja al enzima mayor tiempo de actuación ya que conforme la RCP tiene lugar, la cantidad de ADN para amplificar aumenta y la actividad del enzima para llevar a cabo la extensión disminuye. Dicha disminución de la actividad se produce a causa de una inevitable desnaturalización de la Taq ADN-polimerasa por la prolongada exposición de la misma a las altas temperaturas empleadas a lo largo de la reacción de la RCP.

Una vez realizados estos tres saltos de temperatura, se completa el primer ciclo de la reacción, con el que a partir de cada fragmento original de ADN se han obtenido dos nuevos fragmentos amplificados. El segundo ciclo comienza de nuevo con la desnaturalización de las cadenas de ADN y continua de manera análoga al ciclo anterior con la hibridación y extensión, originando dos fragmentos nuevos amplificados por cada fragmento resultante del primer ciclo (Figura 3.1.2). De esta forma, el número total de copias amplificadas del ADN original se calcula con la siguiente relación:  $2^{n-1}$ , donde n es el número total de ciclos empleados en la reacción. En general, entre 25 y 35 ciclos. Así se produce la amplificación de un número de moléculas de ADN suficientes para obtener productos detectables posteriormente mediante electroforesis en gel de agarosa (sección 3.3.3). Generalmente al aumentar el número total de ciclos, aumenta de forma proporcional la posibilidad de formación de productos no específicos.

Una vez se ha completado el último ciclo programado, se procede a un proceso de extensión final en el que se mantienen las mezclas de reacción entre cinco y quince minutos a una temperatura de 72 °C, con objeto de asegurar una completa extensión de todas las cadenas de ADN.



**Figura 3.1.3:** Esquema de los ciclos programados para las RCP realizadas en la memoria.

Con el fin de evitar la degradación del ADN, las mezclas de reacción deben introducirse en hielo si se desea proseguir con su manipulación inmediata o, mejor aún, congelarse a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso.

En el caso de los mutantes llevados a cabo en el dominio SH3, las RCP se realizaron siguiendo el esquema de la Figura 3.1.3.

### 3.1.3.1 Estrategia experimental

Para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa, es necesario que el medio contenga los cebadores, oligonucleótidos, los desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's), los iones  $\text{Mg}^{++}$ , la Taq ADN-polimerasa, una disolución tampón y el ADN molde.

Por una parte, los cebadores y oligonucleótidos que contengan la mutación deseada, deben alcanzar generalmente unas concentraciones óptimas en la mezcla de reacción en el intervalo establecido entre  $0.1 \mu\text{M}$  y  $0.6 \mu\text{M}$ . El uso de concentraciones superiores puede dar lugar a la acumulación de productos no específicos de reacción, mientras que concentraciones menores serán insuficientes para completar la reacción, dando como resultado cantidades menores de las esperadas del producto de RCP.

Para comenzar a trabajar con los oligonucleótidos y cebadores, es necesario seguir el siguiente protocolo de tratamiento de los mismos debido a que inicialmente se encuentran liofilizados. En primer lugar, se disuelven en  $400 \mu\text{L}$  de agua destilada estéril, agitando automáticamente de forma continua durante 15 minutos. Esta disolución se clarifica si quedasen partículas en suspensión en una centrífuga de mesa a máxima velocidad. A continuación se determina la concentración del oligonucleótido o el cebador con el método

aproximado que se describe en la sección 3.4.3. Conocida la concentración, se preparan en tubos estériles diluciones de concentración  $10 \mu\text{M}$ , utilizando para ello la cantidad adecuada de la disolución concentrada y agua estéril hasta completar un volumen total de  $100 \mu\text{L}$  en cada caso. Estas disoluciones diluidas, junto con las alícuotas concentradas, se conservan congeladas a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Los desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's) juegan un papel esencial en la reacción al constituir las piezas que sirven para construir las copias de la cadena de ADN original. Generalmente se usa una disolución que contiene la mezcla de los cuatro dNTP's en agua (dATP (2'-desoxi-adenosin-5'-trifosfato), dCTP (2'-desoxi-citosin-5'-trifosfato), dGTP (2'-desoxi-guanosin-5'-trifosfato) y dTTP (2'-desoxi-timidin-5'-trifosfato). Las concentraciones que se utilizan en la mezcla de reacción suelen estar en el intervalo comprendido entre 50 y  $500 \mu\text{M}$ ; la concentración utilizada normalmente para cada nucleótido es  $200 \mu\text{M}$ . Estas disoluciones se almacenan a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Los iones  $\text{Mg}^{++}$  tienen la función de formar complejos con los dNTP's y el molde de ADN para dar lugar a la formación del sustrato que la ADN-polimerasa reconoce. La concentración de los iones  $\text{Mg}^{++}$  depende de la concentración de otros componentes de la reacción como los dNTP's, pirofosfatos libres (PPi) y EDTA. Estos compuestos se unen a dichos iones debido a que poseen carga negativa. Su concentración óptima en la reacción se determina de forma empírica y varía entre 1 mM y 5 mM. Generalmente se usan concentraciones de este ión correspondientes a 1.5 mM, cuando la concentración de la mezcla de dNTP's usada es de  $200 \mu\text{M}$ . Un exceso de  $\text{Mg}^{++}$  en la mezcla puede disminuir la especificidad de la amplificación del ADN en la reacción. De la misma manera, la carencia excesiva de dichos iones en la reacción, puede resultar en una menor producción del producto esperado.

La elección del enzima ADN-polimerasa a utilizar en la reacción de RCP se realiza en función de la aplicación y la longitud del producto deseado. En nuestro caso, se ha escogido la Taq ADN-polimerasa, cuyo uso general se recomienda para la amplificación de fragmentos de hasta 3000 bases de longitud. En la mayoría de los casos, la cantidad óptima de Taq ADN-polimerasa está entre 0.5 y 2.5 unidades por cada  $50 \mu\text{L}$  de mezcla de reacción. Un incremento excesivo de la concentración del enzima puede provocar la disminución de

especificidad en la formación del producto. Hay que notar que la disolución de Taq ADN-polimerasa utilizada contiene una proporción de glicerol en su composición, con lo que no es necesario descongelarla antes de su uso, siendo además de notable importancia, para evitar la pérdida de actividad, no mantenerla a temperaturas superiores a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  más del tiempo necesario para la adición de la cantidad adecuada en la mezcla de reacción.

Para llevar a cabo la reacción correctamente, es importante la presencia en el medio de una disolución tampón que acompaña a la Taq ADN polimerasa y cuyo pH debe estar entre 8.3 y 9.0. En algunos casos, aumentar el pH del tampón permite estabilizar el molde de ADN empleado y mejorar el resultado de la reacción.

El ADN molde debe estar presente en la reacción en una cantidad adecuada para la formación del producto de RCP. Las cantidades recomendadas para una RCP son las siguientes: 500 ng máximo en el caso de ADN genómico humano; entre 1 y 10 ng de ADN proveniente de bacteria y entre 0.1 y 500 ng si se utiliza el plásmido directamente. La cantidad óptima de ADN depende de la aplicación posterior y del error permitido para el ADN amplificado en la RCP.

### **3.1.3.2 Preparación y realización de la reacción**

Para la preparación de la RCP, en primer lugar es preciso descongelar cada una de las disoluciones acuosas de los reactivos que se emplean para la reacción: dNTP's, tampón de la Taq ADN-polimerasa que contiene  $\text{MgCl}_2$ , disolución de oligonucleótidos, cebadores y ADN molde. La Taq ADN-polimerasa no es necesario descongelarla previamente por las razones expuestas anteriormente.

Los tubos empleados para las reacciones varían en capacidad en función del termociclador utilizado para llevar a cabo la reacción de RCP. En nuestro caso, los tubos utilizados tienen una capacidad de  $200\text{ }\mu\text{L}$  y previamente fueron esterilizados.

A la hora de realizar las reacciones es importante el orden en el que se añaden los reactivos con objeto de no dar lugar a que comiencen a darse reacciones no deseadas entre los mismos. Los tubos se mantienen en hielo en todo momento. Esto es especialmente importante en el caso de los dNTP's y el ADN molde, que pueden degradarse con el

incremento de la temperatura. Así pues, el orden de adición que se ha seguido en nuestro caso es el siguiente:

- a) 5  $\mu\text{L}$  del tampón comercial de la Taq ADN-polimerasa ( $\text{MgCl}_2$  15 mM).
- b) 1  $\mu\text{L}$  de la mezcla de dNTP's de concentración 10 mM.
- c) 5  $\mu\text{L}$  de cada uno de los oligonucleótidos empleados de concentración 10  $\mu\text{M}$ .
- d) 34  $\mu\text{L}$  de agua Milli-Q estéril.
- e) ADN molde (realizar este paso en presencia de llama): se utilizan 0.1-0.2  $\mu\text{L}$  si se utiliza el ADN plasmídico puro directamente o puede utilizarse una colonia obtenida de la transformación de células competentes a partir del plásmido o del uso del glicerol correspondiente conservado a  $-80^\circ\text{C}$  (ver sección 3.1.7).
- h) 1 gota de aceite mineral para sellar la reacción y evitar que la mezcla acuosa se evapore al alcanzar altas temperaturas.

Según el protocolo anterior, en las reacciones de RCP que se han llevado a cabo en esta memoria los volúmenes totales de reacción empleados han sido de 50  $\mu\text{L}$ .

Una vez preparadas las reacciones en hielo, se introducen en el termociclador. Este instrumento se compone de uno o varios bloques térmicos independientes entre sí, compuestos por unos "pocillos" en los que se sitúan los tubos con las mezclas preparadas. El diseño de este aparato permite programar la secuencia de pasos y ciclos de la RCP que han sido descritos. Seguidamente se da comienzo a los ciclos de reacción y a continuación a la adición de 0.3  $\mu\text{L}$  de Taq ADN-polimerasa. Para tal fin, basta con interrumpir la ejecución del programa cuando se alcanzan por primera vez los  $94^\circ\text{C}$ . La secuencia de ejecución seguida en el comienzo de la reacción, para los dos casos de mutaciones considerados hasta el momento, varía como se describe en la sección siguiente.

Una vez finalizada la reacción, es necesario comprobar si ha tenido lugar la formación de los productos deseados. Para ello se prepara una electroforesis en gel de agarosa al 2 % (sección 3.3.3). Si el resultado es positivo, se observarán las bandas correspondientes a dichos productos. Además, de esta forma puede comprobarse a la vez si el producto de la RCP está puro, cuando se observa la presencia de una sola banda en el gel en la posición correcta o si, por el contrario, existen otras bandas que indican la presencia de productos secundarios de reacción. Puede determinarse también de forma aproximada la cantidad de los productos obtenidos en función de la intensidad relativa de las bandas presentes.

A continuación, y en el caso de obtener resultados positivos en la reacción de amplificación, se procede a la purificación de los productos de RCP. Si sólo se ha obtenido el producto de reacción esperado, se purifica el mismo mediante el protocolo y reactivos comerciales adquiridos de la casa comercial Qiagen. La segunda posibilidad resulta de la coexistencia de varios productos de reacción; en este caso se obtiene la banda deseada cortándola directamente del gel de agarosa y purificándola a continuación utilizando el protocolo y reactivos comerciales adecuados. Durante este proceso de purificación puede perderse parte del producto, por lo que es conveniente aplicar en el gel la mayor cantidad de muestra posible con el fin de aumentar el rendimiento final. En cualquiera de los casos anteriores, se obtiene un volumen final de producto puro equivalente a 50  $\mu$ L.

### **3.1.4 DISEÑO E INTRODUCCIÓN DE MUTACIONES EN FRAGMENTOS DE ADN**

Una vez escogidas las mutaciones que se van a realizar sobre el ADN molde, es necesario tener en cuenta la posición de las mismas dentro de la secuencia de bases. Así, las distintas mutaciones que se pueden realizar en el gen pueden encontrarse en posiciones cercanas o lejanas a los extremos de su estructura primaria. Según esto, se puede distinguir entre estas dos situaciones, que difieren entre sí en la estrategia de amplificación del ADN mediante la reacción de RCP como se describe a continuación, utilizando como ejemplo el gen del mutante Best5I25V del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina. Este gen se ha tomado como especie de referencia en los estudios realizados en esta memoria y sobre el que se han realizado una serie de mutaciones a lo largo de su secuencia (Figura 3.1.4).

En cualquiera de estos casos el primer paso consiste en diseñar los oligonucleótidos necesarios. En general, el diseño requiere el conocimiento previo de una serie de características de los mismos que se describen a continuación, tales como la longitud de los oligonucleótidos que debe estar comprendida entre 20 y 30 bases, aunque pueden diseñarse conteniendo hasta 80-100 nucleótidos. El contenido en bases también es importante, debiendo mantenerse siempre que sea posible el número total de citosinas (C) y guaninas (G) en un orden comprendido entre el 40 % y 60 %, dejando el resto del porcentaje para adeninas (A) y timinas (T). Además, deben acotarse en sus extremos con guaninas y citosinas, siempre que sea posible, ya que estas bases, al aparearse establecen más puentes de hidrógeno que los formados en el caso de las bases A y T, mejorando así el apareamiento de estas cadenas a la hebra correspondiente de ADN, lo que repercute en el rendimiento de la RCP.

Best5i25v													
1	ATG	GAT	GAA	ACT	GGA	AAA	GAG	CTT	GTG	CTA	GTA	CTC	TAT
	M	D	E	T	G	K	E	L	V	L	V	L	Y
								A	A				
	GAT	TAT	CAA	GAG	AAG	AGT	CCT	CGG	GAG	CTG	ACT	GTG	AAG
	D	Y	Q	E	K	S	P	R	E	L	T	V	K
													A
	AAA	GGA	GAT	ATT	CTA	ACC	CTA	CTC	AAC	AGC	ACC	AAC	AAG
	K	G	D	I	L	T	L	L	N	S	T	N	K
			A		A		A			A			
	GAC	TGG	TGG	AAG	ATT	GAA	GTT	AAC	GAT	CGT	CAG	GGC	TTT
	D	W	W	K	I	E	V	N	D	R	Q	G	F
				A					A				A
	GTA	CCA	GCT	GCC	TAT	CTG	AAA	AAA	CTA	GAT			
	V	P	A	A	Y	L	K	K	L	D			
	A		G										

D48G													
1	ATG	GAT	GAA	ACT	GGA	AAA	GAG	CTT	GTG	CTA	GCA	CTC	TAT
	M	D	E	T	G	K	E	L	V	L	A	L	Y
								A					
	GAT	TAC	CAA	GAG	AAG	AGT	CCT	CGG	GAG	GTG	ACT	ATG	AAG
	D	Y	Q	E	K	S	P	R	E	V	T	M	K
	AAA	GGA	GAT	ATT	CTA	ACC	CTG	CTC	AAC	AGC	ACC	AAC	AAG
	K	G	D	I	L	T	L	L	N	S	T	N	K
							A			A			
	GAC	TGG	TGG	AAG	GTT	GAA	GTT	AAC	GGT	CGT	CAG	GGC	TTT
	D	W	W	K	V	E	V	N	G	R	Q	G	F
	GTA	CCA	GCT	GCC	TAT	GTG	AAA	AAA	CTA	GAT			
	V	P	A	A	Y	V	K	K	L	D			

*Figura 3.1.4: Secuencias de ADN de los mutantes Best5I25V y D48G (Martínez et al. 1998a). Azul: Restos mutados. Las letras sombreadas son los aminoácidos por los cuales se sustituyen. Rojo: Bases sustituidas por otras que codifican el nuevo aminoácido (Figura 3.1.5). Las nuevas bases introducidas se muestran en la Tabla 3.1.1.*

Por otra parte hay que calcular en cada oligonucleótido que se diseñe el valor de su temperatura de fusión,  $T_f$ , temperatura a la que desnaturaliza la doble hebra formada por el ADN molde y el oligonucleótido correspondiente. Su valor depende de la relación  $(C+G)/(A+T)$  existente en su composición y se calcula con la siguiente relación:

$$T_f = [2 \cdot (N_A + N_T)] + [4 \cdot (N_G + N_C)] \text{ (}^\circ\text{C)} \quad (3.1.1)$$

siendo  $N_A$ ,  $N_T$ ,  $N_C$  y  $N_G$  el número total de adeninas, timinas, citosinas y guaninas respectivamente contenidas en la secuencia del oligonucleótido que hibridan con el correspondiente ADN molde durante la RCP.

Las  $T_f$  usuales para los oligonucleótidos deben ser al menos iguales a las temperaturas de hibridación. El intervalo usual para las temperaturas de hibridación está entre los 55 °C y 65 °C.

Es necesario diseñar dos tipos de oligonucleótidos: los llamados cebadores y los oligonucleótidos propiamente dichos que contienen la mutación. En la Tabla 3.1.1 se muestran los correspondientes a los mutantes realizados en esta memoria.

Los cebadores contienen las secuencias de ADN de ambos extremos de la secuencia del gen e incluyen los sitios de unión a los enzimas de restricción. El primero de los dos cebadores necesarios comienza con la secuencia diana del enzima de restricción, a la que debe seguir la secuencia de las bases ATG, correspondiente al aminoácido metionina, necesaria para que pueda iniciarse la traducción del ADN. En nuestro caso el enzima NcoI es el enzima de restricción que delimita el comienzo de la secuencia en la dirección 5'-3' de la misma. Su secuencia diana incluye el codón del aminoácido metionina que constituye además el punto de inicio de la secuencia del gen. La secuencia del cebador 1 se representa en la Tabla 3.1.1. El segundo cebador se construye sobre la cadena complementaria de ADN. Si se lee su secuencia, representada en la Tabla 3.1.1 en la dirección 3'-5' de sus extremos, se observa que comienza en una base dada (G) y continúa hasta el final de la secuencia aminoacídica con la triada complementaria CTA, que corresponde al aminoácido representado por la letra D (ácido aspártico). Seguidamente se incluyen dos codones de terminación (ATCATC) para impedir que en la traducción del ADN pudieran codificarse por error las secuencias de nuevos restos aminoacídicos que se añadirían a la secuencia original. A continuación se encuentran las secuencias diana correspondientes a varios enzimas de restricción entre los que se encuentra el perteneciente a HindIII (TTCGAA).

Por otra parte, los oligonucleótidos contienen el fragmento de la secuencia del gen con la mutación que se pretenda realizar. Para diseñarlos es necesario realizar en la secuencia de

TABLA 3.1.1  
SECUENCIAS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS Y CEBADORES DISEÑADOS PARA LAS ESPECIES Best5I25V Y D48G (Martínez et al. 1998a) DEL DOMINIO SH3 DE  $\alpha$ -ESPECTRINA Y SUS MUTANTES.

MUTANTE	OLIGONUCLEÓTIDO Ó CEBADOR	SECUENCIA
Best5I25V	Cebador 1/Best5I25V	5'-TTAACCATGGATGAAACTGGAAAAGAGCTTGTG-3'
	Cebador 2/Best5I25V	5'-TTAAAAGCTTAGATCTCTACTAATCTAGTTTTTTCAG-3'
L8A/ Best5I25V	L8A 1/ Best5I25V	5'-TTAACCATGGATGAAACTGGAAAAGAG <sub>gc</sub> TGTGCTAGTACTC-3'
V9A/ Best5I25V	V9A 1/ Best5I25V	5'-TTAACCATGGATGAAACTGGAAAAGAGCTTG <sub>c</sub> GCTAGTACTCTAT-3'
T24A/ Best5I25V	T24A 1/ Best5I25V	5'-CCTCGGGAGCTG <sub>g</sub> CTGTGAAGAAAGG-3'
	T24A 2/ Best5I25V	5'-CCTTCTTCACAG <sub>c</sub> CAGCTCCCGAGG-3'
D29A/ Best5I25V	D29A 1/ Best5I25V	5'-GCTGACTGTGAAGAAAGGAG <sub>c</sub> TATTCTAACCTAC-3'
	D29A 2/ Best5I25V	5'-GTAGGGTTAGAATA <sub>g</sub> CTCCTTCTTCACAGTCAGC-3'
L31A/ Best5I25V	L31A 1/ Best5I25V	5'-GAAAGGAGATATT <sub>gc</sub> AACCCTACTCAACAGC-3'
	L31A 2/ Best5I25V	5'-GCTGTTGAGTAGGGTT <sub>gc</sub> AATATCTCCTTTC-3'
L33A/ Best5I25V	L33A 1/ Best5I25V	5'-GGAGATATTCTAAC <sub>gc</sub> ACTCAACAGCACC-3'
	L33A 2/ Best5I25V	5'-GGTGCTGTTGAGT <sub>gc</sub> GGTTAGAATATCTCC-3'
S36A/ Best5I25V	S36A 1/ Best5I25V	5'-CCTACTCAAC <sub>gc</sub> CACCAACAAGGACTGG-3'
	S36A 2/ Best5I25V	5'-CCAGTCCTTGTGGT <sub>gc</sub> GTAGTAGG-3'
K43A/ Best5I25V	K43A 1/ Best5I25V	5'-GGACTGGTGG <sub>gc</sub> GATTGAAGTTAACG-3'
	K43A 2/ Best5I25V	5'-CGTAACTTCAATC <sub>gc</sub> CCACCAGTCC-3'
D48G/ Best5I25V	D48G 1/ Best5I25V	5'-GGAAGATTGAAGTTAAC <sub>g</sub> TCGTCAGGGCTTT-3'
	D48G 2/ Best5I25V	5'-AAAGCCCTGACGA <sub>c</sub> CGTAACTTCAATCTTCC-3'
F52A/ Best5I25V	F52A 1/ Best5I25V	5'-CGATCGTCAGGGC <sub>gc</sub> TGTACCAGCTGCC-3'
	F52A 2/ Best5I25V	5'-GGCAGCTGGTACA <sub>gc</sub> GCCCTGACGATCG-3'
V53A/ Best5I25V	V53A 1/ Best5I25V	5'-CGTCAGGGCTTTG <sub>c</sub> ACCAGCTGCCTAT-3'
	V53A 2/ Best5I25V	5'-ATAGGCAGCTGGT <sub>g</sub> CAAAGCCCTGACG-3'
A55G/ Best5I25V	A55G 2/ Best5I25V	5'- TTAAAAGCTTAGATCTCTACTAATCTAGTTTTTTCAGATAGGCA <sub>c</sub> CTGGTACAAAGCCC -3'
D48G	Cebador 1/D48G	5'-GCGCGCCCATGGATGAAACTGGAAAAGAGCTTGTGCTA-3'
	Cebador 2/D48G	5'-GCGCGCAAGCTTGGATCCCTACTAATCTAGTTTTTTCACATAGGCAGCTGG-3'
L8A/ D48G	L8A 1/ D48G	5'-GCGCGCCCATGGATGAAACTGGAAAAGAG <sub>gc</sub> TGTGCTAGC-3'
L33A/ D48G	L33A 1/ D48G	5'-GGAGATATTCTAAC <sub>gc</sub> GCTCAACAGCACC-3'
	L33A 2/ D48G	5'-GGTGCTGTTGAGC <sub>gc</sub> GGTTAGAATATCTCC-3'
S36A/ D48G	S36A 1/D48G	5'-CCTGCTCAAC <sub>gc</sub> CACCAACAAGGACTGG-3'
	S36A 2/ D48G	5'-CCAGTCCTTGTGGT <sub>gc</sub> GTTGAGCAGG-3'

		Segunda posición					
		T	C	A	G		
Primera posición	T	TTT } Phe	TCT } Ser	TAT } Tyr	TGT } Cys	T	
		TTC } Phe	TCC } Ser	TAC } Tyr	TGC } Cys	C	
		TTA } Leu	TCA } Ser	TAA stop	TGA stop	A	
		TTG } Leu	TCG } Ser	TAG stop	TGG Trp	G	
	C	CTT } Leu	CCT } Pro	CAT } His	CGT } Arg	T	
		CTC } Leu	CCC } Pro	CAC } His	CGC } Arg	C	
		CTA } Leu	CCA } Pro	CAA } Gln	CGA } Arg	A	
		CUG } Leu	CCG } Pro	CAG } Gln	CGG } Arg	G	
	A	ATT } Ile	ACT } Thr	AAT } Asn	AGT } Ser	T	
		ATC } Ile	ACC } Thr	AAC } Asn	AGC } Ser	C	
		ATA } Ile	ACA } Thr	AAA } Lys	AGA } Arg	A	
		ATG Met/inicio	ACG } Thr	AAG } Lys	AGG } Arg	G	
	G	GTT } Val	GCT } Ala	GAT } Asp	GGT } Gly	T	
		GTC } Val	GCC } Ala	GAC } Asp	GGC } Gly	C	
		GTA } Val	GCA } Ala	GAA } Glu	GGA } Gly	A	
		GTG } Val	GCG } Ala	GAG } Glu	GGG } Gly	G	
						Tercera posición	

**Figura 3.1.5:** Representación del código genético en bacterias *Escherichia coli*. Los grupos de tres nucleótidos (codones) (escritos en la dirección 5'→3') de una molécula de ADN se traducen en aminoácidos de acuerdo con las reglas indicadas aquí. Los colores rojo, azul, verde y negro representan los aminoácidos ácidos, básicos, polares sin carga y neutros respectivamente.

ADN de la proteína las sustituciones de las bases apropiadas que codifiquen los nuevos aminoácidos en las posiciones seleccionadas. Como se observa en la Figura 3.1.5, algunos aminoácidos pueden estar codificados por distintas combinaciones de tres bases. Esto permite escoger a conveniencia los cambios en las mismas al hacer una mutación, procurando alterar mínimamente la secuencia de bases original, con el fin de garantizar un mayor porcentaje de éxito en el proceso de clonación.

Todo el proceso de diseño y síntesis de oligonucleótidos y cebadores se ha realizado con la ayuda del programa DNA Strider 1.2, entre cuyas opciones destacan herramientas que permiten introducir y leer las secuencias de ADN, realizar las modificaciones en las mismas y seleccionar los fragmentos correspondientes a los oligonucleótidos y cebadores. En todos los casos, estos fragmentos de ADN se han obtenido por síntesis química y se han adquirido de las empresas Gentex oligos (Francia) y Pharmacia (Barcelona).

En el caso del mutante Best5I25V, cuya secuencia de muestra en la Figura 3.1.4, distinguiremos entre dos tipos de mutaciones dependiendo de su posición dentro de la secuencia:

En primer lugar se considerarán las mutaciones en posiciones cercanas a los extremos de la secuencia del gen del mutante Best5I25V del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina. Así se han diseñado los mutantes L8A, V9A y A55G. Tomemos como ejemplo el L8A, en el que se sustituye la leucina en posición 8 por alanina en la secuencia del gen. Según se observa en la Figura 3.1.4 y en la Tabla 3.1.1, la secuencia de este mutante respecto a Best5I25V, varía en las bases señaladas. En este caso se necesita construir un oligonucleótido en la dirección 5'-3' que contendrá la secuencia diana para el enzima de restricción NcoI (sección 3.1.5), así como la secuencia de la base o bases cambiadas para la mutación. Dicho oligonucleótido hará en este caso las veces del cebador 1 cuando se lleve a cabo la RCP. Por otra parte, es necesario disponer del cebador 2.

El caso contrario corresponde al mutante A55G, donde el oligonucleótido que contiene la mutación corresponde a la parte final de la secuencia en la cadena complementaria del ADN, en el sentido 3'-5' y contiene los mismos elementos que el cebador 2 haciendo las veces de éste durante la amplificación del ADN durante la RCP.

En los dos ejemplos anteriores la amplificación del ADN mutado se lleva a cabo mediante una única reacción de RCP, siguiendo el procedimiento descrito en la sección anterior, que extenderá la cadena de un extremo a otro de la secuencia directamente. Una vez

identificado y purificado este fragmento, el resto del proceso de clonación de los mutantes continúa como se describe en las secciones siguientes.

En segundo lugar, se encuentra el grupo de mutaciones en posiciones lejanas a los extremos de la secuencia del gen del mutante Best5I25V del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina, constituido por el resto de las mutaciones realizadas. Como ejemplo, supongamos el caso de la mutación de la treonina en posición 24 por alanina, T24A, cuyo proceso de clonación requiere amplificar el ADN con tres reacciones de RCP (Ausubel et al, 1992). Para ello, se diseñan dos oligonucleótidos de cadenas complementarias, en las direcciones 5'-3' y 3'-5' que contienen la mutación deseada en la posición del aminoácido 24 (T24A 1 y T24A 2) (Tabla 3.1.1). Además, se necesitarán los cebadores 1 y 2, que se han utilizado de forma común para la clonación de cada uno de los mutantes que han requerido del uso de tres RCP, ya que no incluyen ninguna mutación.

Las dos primeras RCP que se realizan las llamaremos RCP 1 y RCP 2. En la RCP 1 se utiliza el cebador 1 y el oligonucleótido complementario T24A 2, de forma que se amplifica el fragmento de ADN que comprende desde el comienzo de la secuencia del gen hasta el límite que marca el extremo 5' del oligonucleótido complementario. En la RCP 2 se emplea y el oligonucleótido T24A 1 y el cebador 2 complementario; en tal caso, la amplificación del ADN tiene lugar desde el extremo 3' de la secuencia del gen hasta el extremo 5' del oligonucleótido T24A 1.

Una vez realizadas las RCP 1 y 2, preparadas según el esquema general descrito en la sección 3.1.3, se comprueba mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2 % (sección 3.3.3) que se han obtenido exclusivamente los productos deseados, al observar una sola banda en la calle correspondiente de dicho gel. Entonces se purifica cada uno de ellos mediante el protocolo adecuado que se describirá al final de la sección 3.1.3. Los dos productos puros se utilizan en la RCP 3, en la que se amplifica la secuencia del gen completa. En caso de observar varias bandas en el gel correspondientes a la formación de varios productos de reacción, el ADN de la banda deseada se obtiene tomando directamente de ésta la cantidad mínima con una micropipeta automática para preparar la RCP 3. En general, la preparación de la RCP 3 se ha realizado siguiendo este protocolo:

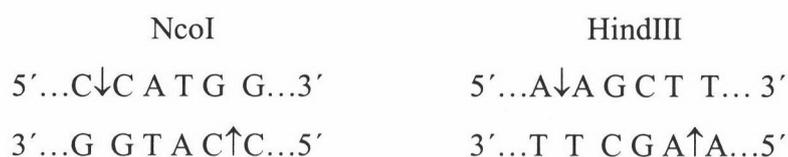
- a) 5  $\mu$ L del tampón comercial de la Taq ADN-polimerasa.
- b) 1  $\mu$ L de la mezcla de dNTP's 10 mM.
- c) 34  $\mu$ L de agua milli-Q estéril.

- d) El ADN molde se obtiene tomando 0.4  $\mu\text{L}$  de la banda del de un gel de agarosa del producto puro de reacción de las RCP 1 y 2 respectivamente o utilizando 0.1-0.2  $\mu\text{L}$  del producto purificado de las RCP's 1 y 2 si las bandas respectivas esperadas en el gel de agarosa al 2 % son únicas.
- e) 1 gota de aceite mineral.

La RCP se inicia según el esquema descrito en la sección 3.1.3 añadiendo la Taq ADN-polimerasa. Tres ciclos después se añaden 5  $\mu\text{L}$  de los cebadores 1 y 2, preparados a concentración 10  $\mu\text{M}$ . Completada esta RCP, el resto del proceso de clonación se lleva a cabo como se describe en secciones posteriores.

### 3.1.5 DIGESTIÓN DEL PRODUCTO DE LA RCP CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

El producto final de RCP obtenido y purificado en el paso anterior, para cada uno de los mutantes preparados, se digiere a continuación. Este proceso se llevará a cabo gracias a la actuación de dos enzimas (endonucleasas) de restricción: NcoI y HindIII. Estas enzimas producen la rotura en un punto específico de un fragmento de ADN que constituye el sitio de reconocimiento o de restricción del enzima, denominado palindromo y que se caracteriza por estar constituido por una secuencia concreta de bases, cuya cadena complementaria opuesta es idéntica. Esto se refleja en el siguiente esquema, en el que las flechas situadas dentro del palindromo de cada enzima representa el punto concreto de rotura de las cadenas complementarias:



El protocolo usado para la digestión de cada uno de los mutantes descritos en esta memoria consiste en preparar las reacciones en un volumen total de 25  $\mu\text{L}$  en cada caso:

- a) 2.5  $\mu\text{L}$  de tampón de corte a concentración 10x.
- b) 1  $\mu\text{L}$  de disolución de NcoI (10 U/ $\mu\text{L}$ ).
- c) 1  $\mu\text{L}$  de disolución de HindIII (15 U/ $\mu\text{L}$ ).

d) 20.5  $\mu$ L del producto de RCP puro.

Para que se produzca la digestión en óptimas condiciones es necesario incubar la reacción a una temperatura de 37°C durante 1 hora y media.

El tampón utilizado en el protocolo anterior proporciona al medio las condiciones de pH y fuerza iónica apropiadas para que se lleve a cabo la digestión en óptimas condiciones. Su composición es la siguiente: Tris HCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 100 mM, 2-Mercaptoetanol 1 mM, pH 8.0 (a 37 °C).

En cuanto a los enzimas utilizados, la proporción en mezcla de cada uno de ellos viene determinada en función de sus respectivas unidades (10 y 15 unidades/ $\mu$ L para NcoI y HindIII respectivamente), entendiendo por unidad como la cantidad de enzima requerida para digerir completamente 1  $\mu$ g de ADN en 60 minutos, en las condiciones óptimas de reacción. Esto está relacionado con el volumen de ADN utilizado y el tiempo escogido para que la reacción pueda completarse. La cantidad de los enzimas que queda sin reaccionar en el medio una vez completada la reacción se desactiva mediante incubación durante 15 minutos a 65 °C.

De la misma forma, la temperatura de incubación seleccionada, 37 °C, es la adecuada para asegurar el mayor rendimiento de la reacción. Debido a la tendencia a la desnaturalización que presentan los enzimas frente a la temperatura, un aumento en la misma origina la pérdida de actividad específica. Por esta misma razón es de vital importancia durante la preparación de la digestión evitar la exposición prolongada de los enzimas a la temperatura ambiental, manteniéndolos en hielo. Además, gracias a que los enzimas adquiridos comercialmente incluyen en su composición una proporción de glicerol que permite conservarlos a -20°C pueden ser utilizados sin previa descongelación.

Un exceso en la cantidad de enzima utilizada, así como el uso de condiciones inapropiadas de pH o fuerza iónica por parte del tampón, o la presencia de solventes orgánicos utilizados en la purificación del producto de RCP y que no hayan sido eliminados completamente, pueden favorecer que se pierda parte de la especificidad de los enzimas, especialmente en el caso de HindIII, favoreciendo su actuación inespecífica en otros sitios distintos a los propios de reconocimiento.

De nuevo es necesario purificar el inserto de ADN obtenido, con objeto de eliminar los fragmentos resultantes del corte producido, así como los enzimas de restricción, y el resto de los reactivos empleados en esta reacción. Para ello se procede de forma análoga a la empleada en la purificación del producto de RCP (final de la sección 3.1.3).

### 3.1.6 LIGACIÓN DEL ADN DIGERIDO AL VECTOR DE EXPRESIÓN

La ligación permite unir el ADN digerido (inserto) a un vector de expresión para formar a un nuevo plásmido mutante. En la práctica, pueden darse otros tipos diferentes de asociación entre fragmentos de restricción con extremos compatibles (de una misma molécula o moléculas diferentes) catalizados por el enzima correspondiente (ligasa) que dan lugar a la aparición de productos secundarios no deseados (vector-vector, inserto-inserto, etc) y disminuyen el rendimiento de la clonación. Para evitar esto, antes de realizar la digestión se prepara el vector que se va a emplear, mediante un proceso de digestión previa (con los mismos enzimas de restricción utilizados en la digestión del ADN genómico), purificación y desfosforilación de los extremos del mismo con fosfatasa alcalina para evitar su recircularización. En nuestro caso, el vector de expresión utilizado, pBAT4 (Peränen et al., 1996), se ha obtenido de esta manera.

Los vectores de expresión contienen en su secuencia genética, además de sitios específicos de reconocimiento de los enzimas de restricción, secuencias que les permiten replicarse en las células huésped después de la transformación de las mismas (sección 3.1.7), un sitio de iniciación de la transcripción en el que se une la ADN polimerasa, conocido como promotor, y algún gen que confiere resistencia a antibióticos determinados.

La ligación del inserto con el vector escogido tiene lugar gracias a la acción del enzima T4 ADN ligasa. Este enzima cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos adyacentes 3'-OH y 5'-OH de la doble cadena de ADN del vector de expresión desfosforilado con los extremos 5'-P y 3'-P correspondientes del inserto que se pretende unir a él, requiriendo en este proceso la presencia de ATP como cofactor.

Para que tenga lugar la reacción es necesario que el medio contenga el inserto que se pretende ligar, el vector preparado como se ha indicado anteriormente, el enzima, ATP y un tampón (tampón de ligación) preparado en las condiciones de fuerza iónica y pH apropiadas para la actuación correcta del enzima. Éste incluye ATP en su composición y aquellos componentes necesarios que palien su tendencia a la descomposición, por ser altamente inestable. Aun así, por esta razón es necesario añadir ATP a la reacción para aumentar la eficiencia. Todos los reactivos se almacenan a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

El protocolo seguido para las ligaciones realizadas en esta memoria es el siguiente:

- a) 1  $\mu\text{L}$  del vector de expresión pBAT4 puro.
- b) 5  $\mu\text{L}$  del inserto digerido y purificado.

- c) 2  $\mu$ L del tampón de ligación de una disolución de concentración 10x.
- d) 9  $\mu$ L de agua Milli-Q estéril.
- e) 1  $\mu$ L de T4 ADN ligasa (5 U/ $\mu$ L).
- f) 1  $\mu$ L de ATP de concentración 10  $\mu$ M.

La mezcla puede dejarse a 16 °C durante toda la noche para que la reacción se complete. Si se desea dejar durante más tiempo es necesario añadir de nuevo ATP a la mezcla de reacción.

Al igual que en el caso de la digestión es preciso tener en cuenta las proporciones de los reactivos, de forma que cuando el inserto sea de menor longitud que el vector de expresión es recomendable utilizar al menos una relación de concentraciones 1:2 de vector frente a inserto en la mezcla. También es importante la concentración del ADN y de la ligasa en la mezcla, por lo que se necesita el tampón específico para su dilución (Tris 660 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, DTT 50 mM, ATP 10 mM, pH 7.5 a 20 °C). Completada la reacción, el enzima puede inactivarse mediante incubación durante 10 minutos a 65 °C.

Actualmente pueden adquirirse protocolos y reactivos comerciales para la ligación que permiten completar esta reacción en 5 minutos a temperatura ambiente. Estas baterías de reactivos comerciales se han empleado también en el trabajo experimental aquí descrito, siendo su rendimiento similar al de la reacción anterior.

### 3.1.7 INTRODUCCIÓN DEL PLÁSMIDO EN EL ORGANISMO DE EXPRESIÓN

El plásmido conteniendo el gen mutante, obtenido en el paso anterior, nos servirá de vehículo para la introducción y expresión de dicho gen recombinante en las células de la bacteria *Escherichia coli*. En este proceso, conocido como transformación, el ADN que penetra en la bacteria mediante el plásmido es capaz de replicarse de forma autónoma dentro de la célula. Ésta se vuelve resistente a un antibiótico determinado gracias a un gen específico contenido en el plásmido, de forma que las células de *E. coli* que adquieren dicho plásmido pueden seleccionarse y hacerlas crecer en un medio que contenga dicho antibiótico.

El hecho de escoger como huésped la bacteria procariota *E. Coli* se basa en la simplicidad de los protocolos y metodología requeridos y en la rápida velocidad de crecimiento de este organismo (su tiempo de división está entre 20 minutos y una hora). Además, una colonia de bacterias crecidas durante la noche en un medio nutritivo (aproximadamente 12 horas) puede contener entre 10<sup>7</sup> y 10<sup>8</sup> células.

Para llevar a cabo la transformación es necesario que las células bacterianas sean competentes. Las células competentes pueden obtenerse, entre otros métodos, a partir de cultivos de células bacterianas en un medio rico en iones  $\text{Ca}^{++}$ . Éste favorece que las membranas y paredes celulares se hagan porosas, favoreciendo durante la transformación la introducción de plásmidos en su interior. Cuando estas bacterias en presencia de los plásmidos se someten a un breve choque de calor, se estimulan para su captación. Generalmente, sólo un pequeño porcentaje de estas células tiene la capacidad de captar y retener alguna de las moléculas del plásmido recombinante. Una vez introducido, el plásmido se replica en la célula receptora de *E. coli* y pasa a su progenie durante la división celular. Las bacterias que contienen el plásmido se pueden seleccionar porque crecen en una placa de Petri en presencia del antibiótico contra el cual confiere resistencia el gen correspondiente contenido en el vector. (En nuestro caso, el vector pBAT4 contiene el gen de resistencia al antibiótico ampicilina). Después de su crecimiento en placa, las células se cultivan en el medio adecuado (medio LB (Laura-Bertani) o TB (medio “terrorífico”) (ver sección 3.2) y el plásmido de ADN recombinante puede purificarse mediante un protocolo sencillo que se describirá más adelante en esta sección.

El protocolo de transformación que se ha utilizado es el siguiente:

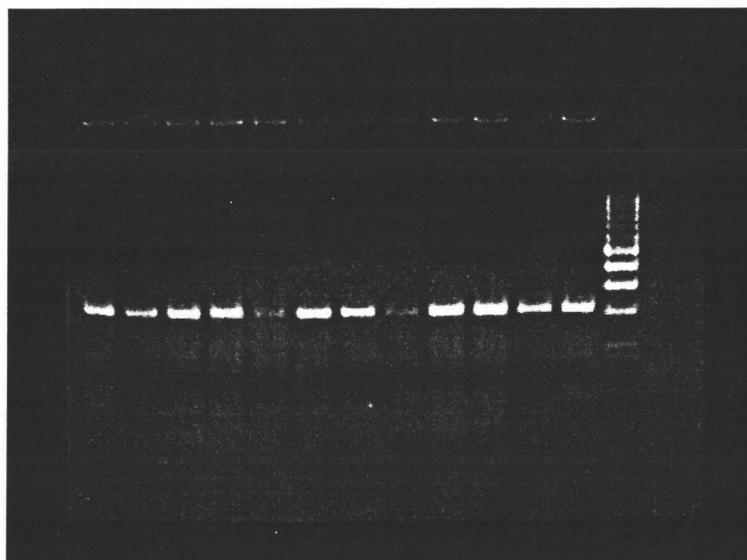
- a) Descongelar una alícuota de 5  $\mu\text{L}$  de células competentes, introduciéndolas para ello en hielo durante 10 minutos.
- b) Añadir 1  $\mu\text{L}$  de la reacción de ligación y dejar en hielo entre 20 y 30 minutos.
- c) Incubar a 42 °C durante 45 segundos exactamente.
- d) Introducir rápidamente en hielo durante 5 minutos.
- e) Añadir 700  $\mu\text{L}$  de medio LB (sin ampicilina) (ver sección 3.2).
- f) Incubar a 37 °C durante al menos 45 minutos.
- g) Utilizar 200  $\mu\text{L}$  para sembrar una placa de Petri que contiene la cantidad adecuada del antibiótico ampicilina. El volumen restante no utilizado se centrifuga en una centrífuga de mesa a máxima velocidad a 4 °C durante 2 minutos. El sobrenadante se desecha en parte, dejando un volumen aproximado de 200  $\mu\text{L}$  en el que se resuspende el precipitado de células obtenido de esta centrifugación, que se siembra a continuación en una segunda placa de Petri.
- h) Se introducen ambas placas en una estufa a 37 °C y se dejan durante toda la noche para que crezcan las colonias de células.

En el protocolo anterior, utilizado para la transformación de las células competentes comerciales utilizadas (XL1-Blue y BL21-DE3), hay que destacar la importancia que supone mantener en todo momento las condiciones de esterilidad, mediante el uso de llama generada por un mechero Bunsen y de material esterilizado previamente. En cuanto a las células comerciales empleadas, aumentos bruscos de la temperatura implican la pérdida de la capacidad competente de las mismas; por ello es aconsejable almacenarlas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en alícuotas de volumen adecuado para cada transformación ( $5\ \mu\text{L}$ ) y evitar descongelaciones consecutivas de una misma alícuota, amén de mantenerlas en hielo durante su manipulación.

La estrategia a seguir para introducir el plásmido y expresar la proteína en las células de la cepa BL21-DE3 implica en el caso de nuestros mutantes una transformación previa en células de la cepa XL1-Blue que poseen una elevada capacidad de transformación. Estas células van a permitir amplificar el plásmido, dada la elevada capacidad que tienen para ello. Una vez se tiene el plásmido amplificado en estas células, se transforman con él las BL21-DE3 con la finalidad de expresar la proteína pues éstas tienen una gran capacidad de expresión de proteína. Esto se debe a que las células de la cepa BL21-DE3 no suelen poseer *per se* una capacidad transformante suficiente para captar el plásmido procedente de una reacción de ligación. A continuación se describe con más detalle el proceso seguido.

Las células competentes de la cepa XL1-Blue utilizadas en la primera transformación tienen una capacidad muy elevada de competencia, con una eficiencia superior a  $10^8$  células transformadas/ $\mu\text{g}$  de plásmido. Una vez realizada esta transformación, con el protocolo descrito, hay que aislar y almacenar el plásmido de las colonias obtenidas que lo contengan como se describe en la sección siguiente. La selección de algunas colonias de una o de ambas placas permite comprobar si las células después de la transformación contienen el plásmido con el inserto. Para ello se lleva a cabo una RCP de control con cada una de ellas. Se utilizarán en cada caso los cebadores 1 y 2 diseñados en la sección 3.1.4 y la colonia escogida como molde siguiendo el protocolo descrito en dicha sección. El control será positivo si mediante electroforesis en gel de agarosa aparece la banda correspondiente al inserto completo (en el caso de los mutantes de SH3 corresponde a unas 210 pb) como se muestra en la Figura 3.1.6. De las colonias positivas se aísla y purifica el plásmido como se describe en la siguiente sección.

Seguidamente, este plásmido purificado se introduce en las células comerciales de la cepa BL21-DE3, cuya capacidad de expresión permite obtener la proteína recombinante. La eficiencia de estas células corresponde a  $10^6$  células transformadas/ $\mu\text{g}$  de plásmido.



**Figura 3.1.6:** Gel de agarosa al 2 % (sección 3.3.3) de los fragmentos de ADN de la RCP control de los mutantes de la proteína Best5I25V del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina. En cada pocillo se cargaron 12  $\mu$ L de muestra. Todos los fragmentos corresponden a unas 210 pares de bases, como se deduce por comparación con el último pocillo (extremo derecha) que contiene los patrones con fragmentos entre 80 y 1000 pares de bases (de abajo hacia arriba): 80 pb, 100 pb, 200 pb (éste se aproxima a la posición de los fragmentos de las muestras de 210 pb), 300 pb, 400 pb, 500 pb, 600 pb, 700 pb, 800 pb, 900 pb, 1000 pb (estas cinco últimas no llegan a distinguirse claramente).

El protocolo de transformación aquí utilizado para las células competentes de la cepa BL21-DE3 es idéntico al descrito para el caso de las células competentes de la cepa XL1-Blue.

### 3.1.8 ENSAYOS DE EXPRESIÓN

Terminada la transformación, es necesario realizar una selección de las colonias obtenidas en las placas y llevar a cabo los ensayos de expresión. Los ensayos de expresión permiten conocer si el plásmido introducido en la célula bacteriana es capaz de codificar de forma correcta la expresión de la proteína.

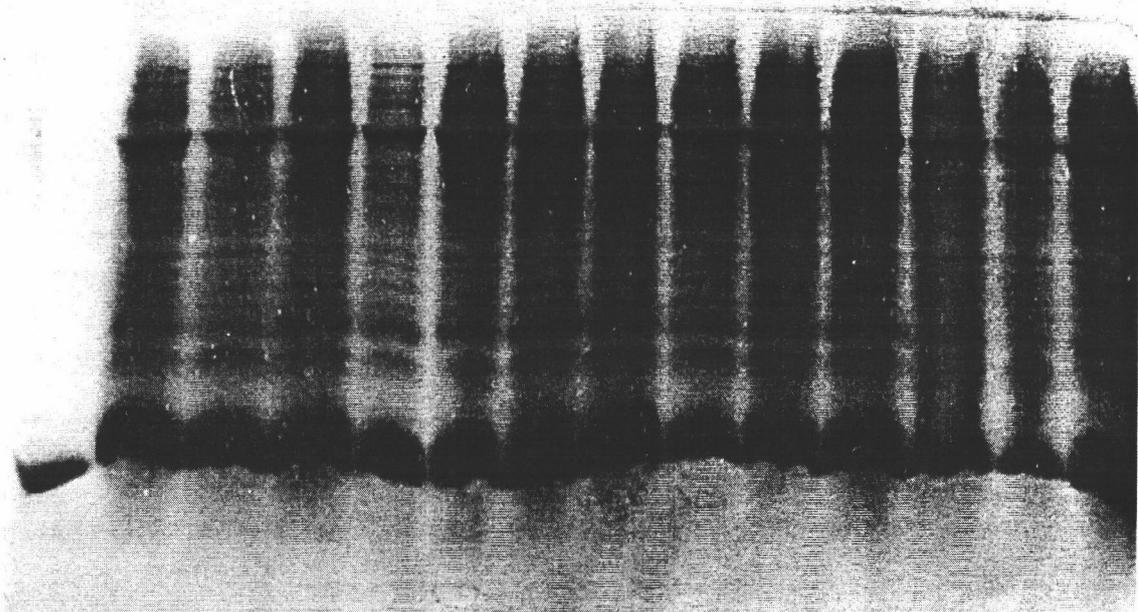
La estrategia experimental es sencilla y se basa en primer lugar en seleccionar las colonias de las placas de Petri donde han crecido la noche anterior (es importante realizar estos ensayos con las colonias de forma inmediata para asegurarnos de que las células bacterianas no pierden el plásmido con el paso del tiempo). A continuación, para cada colonia se preparan minicultivos de 3 mL de medio LB en presencia de ampicilina (para más información sobre preparación de medios, antibiótico y cultivos, ver la sección 3.2). Los

distintos ensayos de expresión para una misma colonia difieren en el tiempo transcurrido desde que se añaden las células al medio de cultivo y la adición del IPTG como agente inductor de la expresión de la proteína, con el objeto de conseguir un máximo rendimiento en la misma. De esta forma, lo usual para muchas proteínas es incubar las muestras sin inducir a 37 °C y añadir el agente inductor cuando las células están en la fase exponencial de su crecimiento. Esto se comprueba porque al medir espectrofotométricamente la absorbancia de una alícuota del cultivo puesto en la región visible del espectro (a una longitud de onda de 600 nm) frente a un blanco de referencia que contiene solo el medio LB, debe de obtenerse un valor comprendido entre 0.4 y 0.6. Seguidamente los cultivos se inducen añadiendo 3 µL de la disolución de IPTG de concentración 40 mg/mL y se controla la expresión tomando muestras de 200 µL de volumen a las 4 h, 8 h y después de dejar crecer durante toda la noche (unas 12-16 horas) tomando como tiempo de referencia el momento de la inducción. Sin embargo, en el caso de muchos mutantes del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina, entre los cuales está el Best5I25V y el resto de los descritos en esta memoria, se ha comprobado que las células son capaces de sintetizar esta proteína en grandes cantidades si se inducen las células de *E. coli* en el momento de comenzar la incubación de los cultivos. Por eso, en nuestros ensayos utilizamos 2 minicultivos para una misma colonia, que solo difieren entre sí en los tiempos de inducción: en uno se induce al comenzar la incubación y se recogen muestras a las 4 horas, 8 horas y después de dejar incubando toda la noche y en el otro se induce siguiendo el criterio del valor de absorbancia descrito anteriormente y recogiendo las muestras en los mismos intervalos de tiempo.

Las muestras recogidas se preparan inmediatamente como se describe al final de la sección 3.3.2.2 para visualizarlas en un gel de poliacrilamida al 15%, como se observa en la Figura 3.1.7. De todas las colonias que expresan se escogen aquellas que lo hacen en mayor medida, indicada por la intensidad de las bandas correspondientes a la proteína presentes en el gel de poliacrilamida.

### **3.1.9 PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO**

El paso siguiente implica la purificación del plásmido partiendo de las colonias que han crecido en las placas; así, de las dos placas sembradas en el protocolo anterior se selecciona una colonia. Para cultivar las células y aislar el plásmido se utiliza un asa, estéril a



**Figura 3.1.7:** Fragmento de un gel de poliacrilamida al 15% en presencia de SDS correspondiente a los ensayos de expresión de los mutantes de la proteína Best5I25V del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina. La banda correspondiente a la primera calle es un patrón del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina, pura (cedida por D. Salvador Casares Atienza). El resto de las calles del gel, de izquierda a derecha y de dos en dos, corresponden a un par de colonias de los mutantes en las posiciones 9, 24, 31, 33, 36 y 43 (a éste corresponde la última calle). En este caso las dos colonias de cada mutante expresan la proteína aproximadamente en las mismas proporciones.

la llama, para traspasar la colonia elegida a un tubo también estéril de 50 mL de capacidad que contenga unos 10 mL de medio LB (ver sección 3.2), a los que previamente se ha añadido el antibiótico ampicilina para garantizar que las únicas células que crezcan sean aquellas que presentan resistencia a este antibiótico. Estos cultivos celulares se dejan crecer mediante incubación a 37 °C en un baño con agitación continua hasta que la disolución se enturbie. Esto puede llevar unas 8 horas aproximadamente. A continuación se centrifugan las células a máxima velocidad en una centrífuga de mesa durante 20 minutos y se recoge el precipitado que contiene las células. El proceso que sigue para aislar el plásmido comprende el uso de un conjunto de reactivos comerciales que se adquieren para tal uso y se basa en una resuspensión y lisado de las células bacterianas en medio alcalino y recoger el ADN del plásmido en pasos posteriores de forma selectiva en una columna que contiene una membrana de gel de sílice en condiciones de alta concentración salina, separándolo de proteínas celulares, metabolitos y ARN que no son retenidos en la matriz de la columna. La elución del ADN del plásmido se

lleva a cabo en una etapa final utilizando agua desionizada estéril, obteniéndose un volumen total de 50  $\mu$ L de plásmido puro, que se conserva congelado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Otra manera de conservar el plásmido que será utilizado posteriormente es mediante el uso de un glicerol. Éste se prepara a partir de cultivos de células de aquellas colonias escogidas que contienen el plásmido, procediendo como se describe en el párrafo anterior. Una vez los cultivos han crecido, se toma 1 mL al que se añade en condiciones de esterilidad un volumen equivalente de una disolución de glicerol estéril preparada al 75 % (v:v) en agua desionizada. La mezcla se congela inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacena a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **3.1.10 SECUENCIACIÓN**

Los plásmidos purificados deben secuenciarse para comprobar la correcta secuencia del gen, y por ende, la de nuestra proteína. En nuestro caso se han utilizado los servicios de secuenciación pertenecientes al EMBL (Heidelberg, Alemania) y al Instituto de Investigación López Neyra perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Granada).

### 3.2 PURIFICACIÓN DE MUTANTES DEL DOMINIO SH3 DE $\alpha$ -ESPECTRINA

#### 3.2.1 PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO Y OTRAS DISOLUCIONES

Las disoluciones necesarias para la producción de la proteína en el organismo huésped (*E. coli* en nuestro caso) incluyen los medios de cultivo bacteriano y los de las placas de Petri, así como las disoluciones de antibiótico (ampicilina) y agente inductor de la expresión (IPTG).

Para los cultivos de *E. coli* se ha utilizado el **medio TB (medio terrorífico)** cuya preparación requiere dos disoluciones:

Disolución nutritiva: Cada litro de esta disolución se prepara pesando las siguientes cantidades de los reactivos:

13.3 g de triptona peptona.

26.7 g de extracto de levadura.

4.4 mL de glicerol puro.

La mezcla anterior se disuelve en 1 litro de agua milli-Q y se reparte en matraces Erlenmeyer para cultivos en volúmenes de 450 mL, que seguidamente se someten a autoclave.

Disolución salina: Se disuelven en 250 mL las siguientes cantidades de los reactivos:

5.78 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

31.35 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .

La disolución se filtra en un filtro de tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  y se esteriliza.

Una vez esterilizadas ambas disoluciones, se mezclan 450 mL de disolución nutritiva con 50 mL de disolución salina.

Las placas de Petri se preparan con una disolución de **medio LB (Laura Bertani)** que incluye una proporción de agar. Un litro de este medio se compone de:

10 g de triptona peptona.

5 g de extracto de levadura.

5 g de cloruro sódico.

15 g de bacto agar.

Se pesan las cantidades anteriores excepto el agar y se disuelven en el volumen adecuado de agua milli-Q. A continuación se fracciona en botellas de 250 mL, se les añade el

agar y se esterilizan en autoclave. A temperatura ambiente el medio solidifica debido a la presencia del agar. Por tanto, para añadirlo a las placas de Petri se toma una de las botellas que contienen dicho medio y se calienta al baño maría o en microondas hasta que la disolución funde completamente. Se deja entonces enfriar hasta una temperatura de 50 °C, antes de que comience a solidificar de nuevo, añadiéndose directamente a la botella en presencia de llama 1 µL de antibiótico (50 mg/mL) por cada mL de disolución, agitando a continuación para homogeneizarla. Se colocan entonces las placas alrededor del mechero y se vierte sobre cada una de ellas con cuidado el medio hasta cubrir su base. Se tapan inmediatamente y se dejan durante una hora aproximadamente hasta que se enfríen y el agar solidifique y se guardan a continuación selladas a 4 °C hasta su uso.

El antibiótico ampicilina se prepara a una concentración de 50 mg/mL pesando la cantidad correspondiente y disolviéndolo a continuación en agua Milli-Q. A continuación se esteriliza pasándolo por un filtro de tamaño de poro 0.2 µm a la vez que se reparte en alícuotas de 1 mL que se almacenan congeladas a – 20 °C.

El agente inductor de la producción de los mutantes utilizado, el isopropil β-D-thiogalactopiranosido (IPTG) se prepara de forma análoga a la ampicilina, a una concentración de 40 mg/mL.

Las disoluciones que se utilizan para la purificación de proteína se preparan como se describe en la sección 3.4 y son las siguientes:

Para resuspender las células se usa una disolución de tampón fosfato sódico 50 mM y cloruro sódico 100 mM, pH 7.0.

Para la resuspensión del crudo de proteínas y la purificación de los mutantes mediante cromatografía se utiliza un tampón que contiene urea 6 M, fosfato sódico 50 mM y cloruro sódico 100 mM, pH 7.

Para la diálisis de los mutantes purificados se utiliza una disolución tampón de glicina 25 mM, pH 3.0.

### **3.2.2 PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS CELULARES**

El método de purificación para cada uno de los mutantes del dominio SH3 de α-espectrina se basa en el publicado por Viguera et al. (1994) para la purificación de dicho dominio, sobre el que se han introducido algunas variaciones debido a las diferencias en expresión, estabilidad y solubilidad que presentan esos mutantes con el dominio silvestre.

La producción de la proteína comienza en las bacterias *E. Coli* de la cepa BL21-DE3, a partir de un cultivo en placa de Petri de estas células transformadas, es decir, conteniendo el plásmido con el gen correspondiente como se describe en la sección 3.1. Para los cultivos celulares se usa TB como medio de cultivo, por ser un medio muy rico en nutrientes y favorecer un aumento significativo de los niveles de producción respecto a los que se consiguen utilizando medio LB. En un matraz Erlenmeyer de 2 L se introducen 500 mL de dicho medio, a los que se adicionan por orden: 500  $\mu$ L de ampicilina de una disolución de 50 mg/mL (1  $\mu$ L por cada mL de medio de cultivo), un par de colonias de células de la placa de Petri y 500  $\mu$ L de una disolución estéril de Isopropil- $\beta$ -D-thiogalactopiranosido (IPTG) de concentración 40 mg/mL, que actúa como agente inductor de la expresión del mutante en cuestión. Todo el proceso se realiza en ambiente estéril y los matraces se tapan con un tapón de algodón. Estos matraces se incuban a 37 °C en un baño de agua orbital con fuerte agitación durante toda la noche (al menos 10 ó 12 horas).

### 3.2.3 EXTRACCIÓN DEL CRUDO DE PROTEÍNAS

Una vez finalizado el crecimiento se recogen las células cultivadas, tomándose muestras de 200 mL para electroforesis. Para ello, se centrifugan a 2200 g durante 25 minutos y a 4 °C. El sobrenadante se desecha y el precipitado de células se resuspende en tampón fosfato sódico 50 mM, cloruro sódico 100 mM, pH 7.0, hasta un volumen total en torno a los 40 mL. También se toma una muestra de esta suspensión para análisis por electroforesis. El precipitado resuspendido puede congelarse en nitrógeno líquido y conservarse a - 80 °C si no se desea continuar con la purificación.

En general, en cada una de las etapas de la purificación ha de procurarse que la temperatura de las disoluciones esté en torno a 4 °C para evitar procesos de degradación o desnaturalización de las proteínas, por lo que toda la manipulación se llevará a cabo en cámara fría o en un baño de hielo.

Para romper las células resuspendidas se utiliza una prensa francesa a una presión de 1200 psi. Inmediatamente se centrifuga este lisado celular a 12000 g durante 20 minutos a 4 °C en una ultracentrífuga Beckman L5-40 con un rotor R35. Del sobrenadante y del precipitado de esta centrifugación se toma una muestra para electroforesis. El sobrenadante normalmente contiene la mayor parte del dominio SH3, que se precipita añadiendo sulfato amónico sólido hasta alcanzar el 75 % de saturación (el equivalente a añadir 516 g de sulfato

amónico sólido por litro de disolución). La adición se realiza lentamente y con agitación continua hasta que la sal se haya disuelto por completo. Al final de este proceso la disolución debe haber adquirido un aspecto lechoso. Se deja entonces reposar durante un mínimo de 1 hora, o incluso durante toda la noche sin que tengan lugar procesos secundarios de degradación.

El precipitado con sulfato amónico se centrifuga a 12000 g durante 20 minutos a 4 °C. Del sobrenadante obtenido se toma una muestra para electroforesis y el precipitado se resuspende con ayuda de una varilla de vidrio y con mucho cuidado en tampón que contiene urea 6 M, fosfato sódico 50 mM y cloruro sódico 100 mM, pH 7.0, hasta obtener un volumen total aproximado de unos 10 mL. De esta manera se obtiene el “crudo de proteínas” del que se toma una muestra para electroforesis.

En algunas ocasiones, cuando la cantidad de proteína producida en las células es muy elevada, puede ocurrir que gran parte de ésta quede en el precipitado resultante de centrifugar el lisado celular. En tal caso, el proceso de purificación se simplifica, resuspendiendo dicho precipitado en la disolución tampón de equilibrado de la columna de exclusión molecular (urea 6 M, fosfato sódico 50 mM, cloruro sódico 100 mM, pH 7.0). A continuación se clarifica por centrifugación a 12000 g durante 20 minutos, a 4 °C y se procede como en el caso general detallado en la siguiente sección.

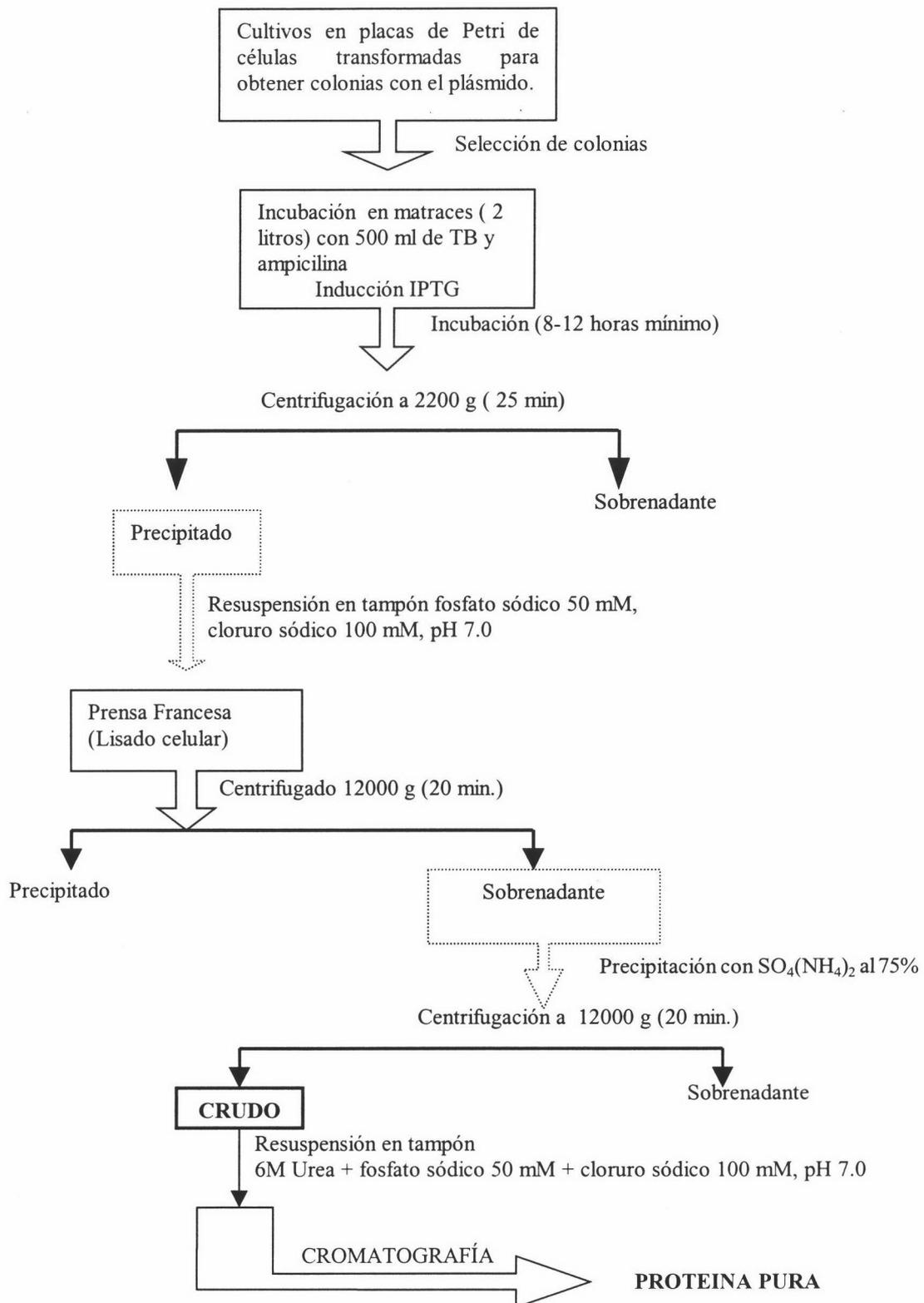
Con todas las muestras recogidas hasta este momento se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.

Un esquema de los pasos descritos previos a la purificación se recoge en la Figura 3.2.1.

### **3.2.4 PURIFICACIÓN DE LOS MUTANTES DEL DOMINIO SH3 MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CONVENCIONAL DE EXCLUSIÓN MOLECULAR**

Una vez identificadas por electroforesis las alícuotas que contienen la proteína que se desea purificar, hay que separar ésta del resto de las proteínas de diferente tamaño presentes en el crudo del mismo mediante cromatografía de exclusión molecular.

Esta cromatografía de partición permite separar moléculas de distintos tamaños, basándose en que éstas se reparten entre el disolvente y una fase estacionaria de porosidad definida. La separación se consigue utilizando como fase estacionaria un gel poroso que está empaquetado en una columna y que está rodeado de disolvente, la fase móvil. En el caso de



*Figura 3.2.1: Esquema general de la purificación de los mutantes del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina.*

introducir una mezcla que contenga moléculas de distinto tamaño en la columna, las moléculas más pequeñas se introducirán con más facilidad en los poros de la fase estacionaria, reteniéndose más tiempo dentro de la columna al realizar un recorrido más largo que las moléculas de mayor tamaño, que serán excluidas más rápidamente por la misma razón, siendo así las primeras en salir de la columna.

En nuestro caso se utilizó una columna cromatográfica separativa de exclusión molecular “Hi-Load Sephadex-75” (Pharmacia Biotech) conectada a una bomba peristáltica a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Dicha columna ha de ser previamente equilibrada a esta velocidad en el mismo tampón que contiene el crudo de proteínas (urea 6 M, fosfato sódico 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7.0). El crudo se clarifica previamente en la ultracentrífuga Beckman a 12000 g durante 20 minutos a 4 °C. Se toma a continuación el sobrenadante y rápidamente se filtra a través de un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  y se inyecta en la columna. La cromatografía se sigue midiendo la absorbancia a 280 nm utilizando un detector UV-visible de flujo UV-1 (Pharmacia) y se recogen fracciones de 4 mL mediante un colector automático. En la Figura 3.2.2 se muestra un cromatograma típico en el que se distingue el pico que corresponde al mutante purificado. En ocasiones, tras la elución de la proteína, aparece un nuevo pico bien separado en el cromatograma correspondiente a fragmentos de ADN.

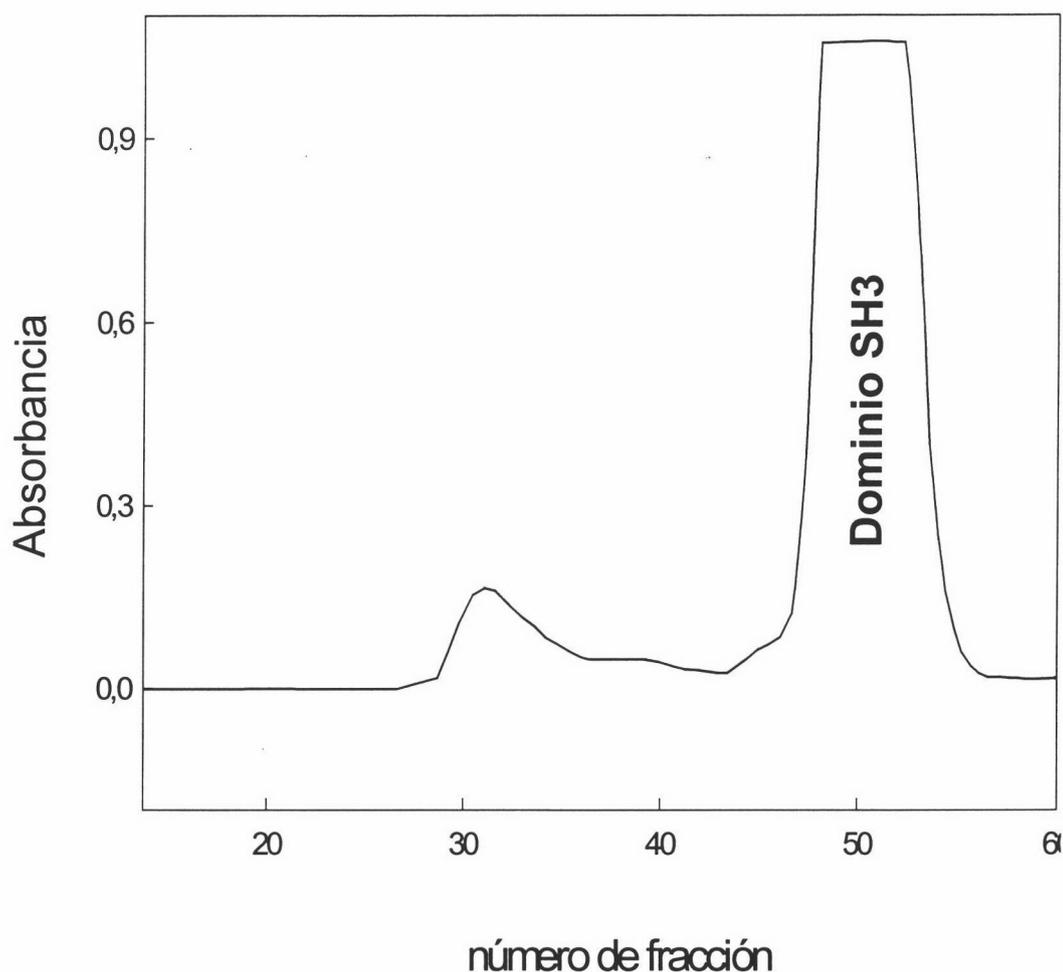
Las fracciones que contienen la proteína se analizan mediante electroforesis para comprobar su grado de pureza. Normalmente el dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina y sus mutantes se eluyen entre las fracciones 45 y 55. En estas fracciones el grado de pureza está próximo al 100 % y es suficiente para los experimentos cinéticos y calorimétricos.

Después de la elución de cada mutante es necesario lavar la resina de exclusión con un volumen aproximado de 8 mL de una disolución de guanidina 6 M en fosfato sódico 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7.0.

### **3.2.5 RENATURALIZACIÓN DE LOS MUTANTES PURIFICADOS**

Las fracciones puras se unen y se dializan frente a tampón glicina 25 mM, pH 3.0 con objeto de renaturalizar la proteína y eliminar la urea y el ADN que haya podido eluirse con ella. Para que la diálisis sea eficaz se realizan 3 cambios de tampón de 5 L de volumen cada vez, a intervalos de 8 horas aproximadamente.

A continuación se mide la concentración espectrofotométricamente como se indica en la sección 3.4.3. En ocasiones puede ocurrir que fragmentos de ADN provenientes del lisado



*Figura 3.2.2: Cromatograma típico de la purificación de la especie Best5i25v y de cualquiera de sus mutantes en el que aprecia un pico muy intenso y bien separado que corresponde a dichas proteínas purificadas.*

celular de tamaño similar al de la proteína purificada eluyan junto a ésta. La presencia de dichos fragmentos se pone de manifiesto con un espectro UV-visible en el que, junto al máximo de absorción de la proteína aparece un máximo característico de la absorbancia del ADN a 260 nm. La contaminación de ADN se elimina por diálisis exhaustiva de las muestras a pH ácido.

De cada uno de los mutantes dializados se toma una muestra que se utiliza para realizar el análisis mediante espectrometría de masas que permitirá identificar el peso molecular en cada uno de los casos. Estos análisis se han realizado por el grupo de *Proteínas y Péptidos* del EMBL (Heidelberg, Alemania).

### 3.2.6 CONSERVACIÓN DE LOS MUTANTES

Existen dos formas de almacenar las proteínas:

En primer lugar, la muestra dializada como se indica en la sección anterior puede separarse en fracciones de 2 mL que se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservan a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Alternativamente, la muestra puede liofilizarse, para lo cual es necesario dializarla previamente frente a agua desionizada como se indica en la sección anterior, para eliminar las sales del medio. A continuación se congela la muestra en nitrógeno líquido en tubos de polipropileno y se deja en un liofilizador hasta comprobar que el proceso se ha completado (un día aproximadamente). El liofilizado se puede conservar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3 TÉCNICAS DE ELECTROFORESIS

#### 3.3.1 FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA

El proceso de electroforesis se define como el movimiento de moléculas cargadas en solución debido a la influencia de un campo eléctrico. Esta técnica tiene aplicación principalmente en el análisis y purificación de proteínas y ácidos nucleicos, aunque también se utiliza con moléculas tales como azúcares, aminoácidos, nucleótidos o iones simples. La velocidad de movimiento depende de dos factores. Por una parte, la fuerza que ejerce el campo eléctrico sobre la molécula en la dirección del movimiento que viene dada por el producto  $q \cdot E$  siendo  $q$  la carga de dicha molécula (en culombios) y  $E$  la intensidad del campo eléctrico (en voltios/metro). En oposición al movimiento se encuentra la fuerza de rozamiento que ejerce el medio sobre la molécula y se expresa como  $f \cdot v$ , donde  $f$  es el coeficiente de rozamiento y  $v$  es la velocidad de la partícula que depende de la forma y tamaño de la misma. Las moléculas de mayor tamaño encontrarán una mayor resistencia al movimiento con lo que el coeficiente de rozamiento presentará un valor mayor que para el caso de moléculas pequeñas y compactas. Cuando se aplica el campo eléctrico sobre la partícula llega un momento en el que las dos fuerzas existentes en el medio se compensan, alcanzando un movimiento estacionario dado por la expresión:

$$f \cdot v = q \cdot E \quad (3.3.1)$$

En esta situación la molécula se mueve a una velocidad,  $v$ , a la que llamaremos velocidad estacionaria. A partir de aquí, se define la movilidad electroforética,  $m$ , como la velocidad por unidad de campo eléctrico:

$$m = v/E = q/f \quad (3.3.2)$$

La capacidad de las técnicas de electroforesis para separar sustancias se debe, por tanto, al efecto de las diferencias en la carga y/o coeficiente de rozamiento en las movilidades electroforéticas de las moléculas. Para la puesta en práctica de esta técnica es necesario disponer de una matriz tridimensional estacionaria, constituida por un gel que puede estar compuesto de diferentes materiales, incluyendo celulosa, acetato, papel, almidón, poliacrilamida o agarosa. Esta matriz evita la aparición de corrientes de convección durante el movimiento de las macromoléculas, contribuyendo a que el tamaño de las mismas sea un factor determinante en la separación, conjuntamente con la carga. El voltaje aplicado al sistema hace que las diferentes especies de moléculas presentes en la muestra se muevan a

través de la matriz a diferentes velocidades. La variable experimental que se obtiene recibe el nombre de movilidad relativa,  $m'$ , definida como el cociente entre la distancia recorrida en el gel por la macromolécula y la distancia, siempre mayor, recorrida por una sustancia de bajo peso molecular que se utiliza como referencia.

Al final de la electroforesis la posición de cada molécula en el gel puede determinarse mediante tinción o autoradiografía. Por ejemplo, las proteínas se tiñen generalmente a partir de una disolución fijadora de Coomasie Brilliant Blue, pudiendo detectarse de esta forma cantidades del orden de 1  $\mu\text{g}$ , o con nitrato de plata siguiendo un método similar al utilizado en el revelado fotográfico. Este último método es unas cien veces más sensible que el anterior, llegando a detectar cantidades de proteína en gel en torno a los 10 ng. Los ácidos nucleicos se tiñen generalmente con bromuro de etidio, sustancia que presenta fluorescencia débil cuando se encuentra libre en solución y sin embargo al unirse a los ácidos nucleicos fluoresce al excitar con luz ultravioleta a una longitud de onda de 300 nm, presentando un intenso color naranja. Así pueden detectarse cantidades entre 10 y 50 ng de una cadena de ADN.

### **3.3.2 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE LAURIL SULFATO SÓDICO (SDS-PAGE)**

Hay dos tipos de sistemas de electroforesis: sistemas continuos y sistemas discontinuos. Un sistema continuo tiene únicamente un gel separador y permite usar el mismo tampón en el tanque y el gel. En un sistema discontinuo (Orstein, 1964; Davis, 1964), se utiliza un gel llamado apilador, que se extiende sobre un gel separador en el que se lleva a cabo la separación de las proteínas. Ambos geles se diferencian en el pH así como en la concentración de acrilamida y fuerza iónica, menores estas dos últimas en el gel apilador. Una vez iniciada la electroforesis, las proteínas migran dentro del gel apilador, concentrándose en una banda al llegar a la interfase entre este gel y el separador. Este fenómeno de concentración aumenta la calidad de la separación en el gel separador, frente a la resolución obtenida en un sistema continuo.

El método de Laemmli (1970) constituye el sistema discontinuo más frecuentemente empleado en este tipo de electroforesis. Aquí la migración de las proteínas no viene determinada por su carga eléctrica sino por su peso molecular. Se realiza en una matriz tridimensional constituida por un gel de poliacrilamida, resultante de la polimerización del

monómero acrilamida  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$  y el entrecruzamiento de las cadenas por el monómero N,N'-metilén-bis-acrilamida (Bis)  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ . La reacción de polimerización se inicia a partir de la generación de radicales libres en presencia de TEMED (tetrametiletilendiamina) y APS (persulfato amónico). Cuando este último se disuelve en agua produce radicales libres que inician la reacción de polimerización de la acrilamida. A su vez, el TEMED es capaz de transportar electrones, actuando así como catalizador del proceso.

El lauril sulfato sódico (SDS) es un detergente aniónico capaz de desnaturalizar proteínas formando micelas cargadas negativamente alrededor de las cadenas polipeptídicas desnaturalizadas. Bajo estas condiciones, las proteínas son capaces de unir la misma cantidad de SDS por gramo de polipéptido, independientemente de la composición y secuencia aminoacídica. El complejo micela-proteína con carga negativa adquiere una estructura de varilla rígida, de longitud proporcional al peso molecular de la proteína. Por eso, en presencia de un campo eléctrico, dichos complejos de densidad de carga similar se moverían desde el polo negativo al positivo con la misma velocidad, pero en este desplazamiento la poliacrilamida actúa como un tamiz molecular, separando dichos complejos en función de su tamaño, debido a que los más pequeños se desplazan más fácilmente a través del entramado del gel.

Mediante esta técnica pueden estimarse tamaño y cantidad relativa de una proteína en una muestra y resolverse mezclas complejas de bandas presentes en un gel. Después de la tinción del mismo, la posición de una proteína, en comparación con proteínas estándar de peso molecular conocido utilizadas como patrón en el gel, puede dar información acerca de su tamaño; por otra parte, la intensidad de la banda correspondiente a dicha proteína es un buen indicador de la cantidad de ésta presente en la mezcla. En nuestro caso, estos dos factores han sido utilizados para determinar los niveles de expresión y la pureza de las proteínas purificadas.

### 3.3.2.1 Reactivos

Los reactivos que se utilizan para la preparación de un gel de estas características se describen a continuación:

**Disolución A:** Acrilamida/Bis-acrilamida. Disolución comercial al 30 % de SIGMA. Se guarda a 4 °C. Puede congelarse si no se va a utilizar durante mucho tiempo.

**Disolución B:** Tampón del gel separador. TRIS 1.5 M ajustado a pH 8.8 con ácido clorhídrico concentrado. Se almacena a 4 °C.

**Disolución C:** Tampón del gel apilador. TRIS 0.5 M ajustado a pH 6.8 con ácido clorhídrico concentrado. Se almacena a 4 °C.

**Disolución D:** SDS al 10 %. Se almacena a temperatura ambiente.

**Disolución E:** Persulfato amónico al 10 % (p/v). Esta sustancia es muy higroscópica y empieza a descomponerse inmediatamente después de disolverse en agua. Por eso se recomienda prepararlo en el momento de ser utilizado. No obstante puede almacenarse congelado en alícuotas de 50 µL.

**Disolución F:** Tampón de dilución de la muestra. Se prepara a partir de 1 mL de disolución C, 0.8 mL de glicerol, 1.6 mL de disolución D, 0.4 mL de 2-mercaptoetanol, 0.2 mL de azul de bromofenol al 0.05 % (p/v) y agua destilada hasta un volumen final de 8 mL. Se ajusta el pH a 7.2. Se almacena a 4 °C.

**Disolución G:** Tampón de desarrollo. Se compone de TRIS 0.125 M, Glicina 1 M y SDS al 0.5 %. En estas condiciones el pH debe ser 8.3. Se utiliza diluyendo un volumen de esta disolución en 4 volúmenes de agua destilada para cada electroforesis. Se almacena a temperatura ambiente.

**Disolución de tinción de las bandas de proteína:** Se compone de un 40 % de metanol, un 10 % de ácido acético y un 0.1 % de Coomassie Brilliant Blue R.

**Disolución de destinción del gel:** Se compone de un 40 % de metanol y un 10 % de ácido acético en agua.

**Disolución de secado del gel:** Su composición es la misma de la disolución de destinción del gel, añadiéndole a ésta un 10 % de glicerol.

### **3.3.2.2 Preparación del gel y de las muestras**

Con las disoluciones anteriores se lleva a cabo la preparación del gel como se describe a continuación:

Para preparar el gel de electroforesis se ha seguido el método de electroforesis en lámina del sistema comercial de Hoefer. Es recomendable ajustar todo el conjunto (placas de vidrio, placas de alúmina y espaciadores) al mismo nivel sobre la horizontal para evitar posteriores fugas de líquido.

El gel separador se prepara mezclando los volúmenes indicados en la Tabla 3.3.1; para evitar la polimerización de este gel, iniciada por el TEMED, se añaden éste y el APS justo antes de introducir la disolución entre las placas. Tras esto se añade agua Milli-Q hasta el borde superior de éstas para la formación de un menisco plano en el frente del gel.

Completada la polimerización, se prepara el gel apilador mezclando los volúmenes de las disoluciones que se indican en la Tabla 3.3.1. Después de retirar el agua del gel se coloca el peine y se añade el gel apilador, dejando que gelifique a continuación. Los geles preparados se conservan a 4 °C.

El paso siguiente consiste en la preparación de las muestras de proteína: El volumen de muestra tomado debe contener proteína en un intervalo entre 25 y 50 µg.

En el caso de que la muestra esté muy diluida se puede precipitar añadiendo un volumen igual de ácido tricloroacético al 10 %. Se recoge el precipitado de proteínas por centrifugación y se le añaden 10 µL de disolución de TRIS 2 M para disolverlo y elevar su pH. A continuación se le añaden 50 µL de disolución F y se introduce en una estufa a 80 °C durante 10 minutos.

Si la cantidad de proteína en la muestra es suficiente, se toman 20 µL a los que se añade una cantidad equivalente de disolución F, dejándose entonces en una estufa a 80 °C durante 10 minutos.

En el análisis de muestras que procedan de ensayos de expresión y/o de cultivos celulares, el volumen tomado es de 200 µL, que se centrifugan durante 2 minutos en una centrífuga de mesa a máxima velocidad, descartándose el sobrenadante. El precipitado de células se resuspende en 20 µL de agua milli-Q y una cantidad equivalente de disolución F y se introduce en una estufa a 80 °C durante 10 minutos.

### **3.3.2.3 Aplicación y desarrollo de las muestras en el gel**

Este paso se realiza a continuación, previa colocación del gel adecuadamente en la cubeta en presencia de la disolución G. Después de quitar con extremo cuidado el peine para no romper los pozos, se procede a cargar las calles del gel con las muestras preparadas. La intensidad de corriente que se aplica inicialmente es de 10 mA por gel mientras las muestras recorren el gel apilador. Cuando el frente de azul de bromofenol alcanza la interfase del gel separador, la intensidad se aumenta hasta alcanzar el valor de 20 mA por gel. El campo eléctrico es aplicado hasta que el frente de azul de bromofenol de referencia ha cruzado casi

**TABLA 3.3.1**

**VOLÚMENES EN mL DE LAS DISOLUCIONES PREPARADAS, NECESARIOS PARA PREPARAR LOS GELES SEPARADOR Y APILADOR DE ACRILAMIDA AL 15 % EN UNA LÁMINA DE 1x83x100 mm**

<b>DISOLUCIONES</b>	<b>GEL SEPARADOR</b>	<b>GEL APILADOR</b>
<b>Disolución A</b>	3.93	0.39
<b>Disolución B</b>	1.75	0.75
<b>Disolución D</b>	0.07	0.03
<b>Agua Milli-Q</b>	1.25	1.83
<b>Temed</b>	0.004	0.005
<b>APS 10 %</b>	30	0.015

por completo la lámina del gel. Con el fin de evitar posibles calentamientos del gel, es conveniente conectar el sistema mediante un circuito de agua a un baño termostatzado a 25 °C.

#### **3.3.2.4 Tinción de las bandas de proteína y destinción del gel**

Completada la electroforesis hay que retirar las placas del aparato. Entonces se desmonta el gel, quitando primero los separadores y a continuación, levantando el cristal con ayuda de una espátula. A continuación, el gel se introduce durante 30 minutos en la disolución de tinción. El Coomassie Brilliant Blue se fija a las proteínas coloreándolas de azul, penetrando además en toda la estructura del gel, haciendo que las bandas de proteína permanezcan indistinguibles. Una vez teñido el gel, la disolución de tinción puede recuperarse y usarse posteriormente. Para poder observar las bandas de proteína es necesario lavar a continuación el gel con disolución de desteñir geles, repitiendo el proceso hasta que desaparezca el color azul de la matriz y aparezcan las bandas de proteína. Posteriormente se seca el gel introduciéndolo en la disolución de secado durante 20 minutos. Se envuelve después en papel celofán sobre una placa de cristal, dejándolo a temperatura ambiente durante varios días.

En el caso de que la cantidad de proteína presente en la muestra sea del orden de unos pocos ng, se utiliza el método de tinción con plata. Este método se basa en la reducción selectiva del ión plata a plata metálica en los sitios del gel ocupados por proteína, según los potenciales de oxidación-reducción de dichos sitios frente al de los sitios adyacentes en el gel que no contienen proteína.

El protocolo de tinción rápida con plata, es el siguiente:

1. Se introduce el gel en una disolución al 30 % en etanol y al 10 % en ácido acético para fijar las bandas de proteína. Puede dejarse el gel sumergido en esta disolución durante toda la noche, aunque basta lavar dos veces durante 45 minutos para completar el proceso.
2. Lavar durante 15 minutos con una disolución al 30 % en etanol. Repetir el proceso 3 veces.
3. Lavar con agua Milli-Q durante 20 minutos una sola vez.
4. Lavar con una disolución 2.5 mM en  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  durante 2 minutos exactos.
5. Lavar 2 veces con agua Milli-Q, 5 minutos cada vez.
6. Lavar una vez durante 20 minutos con una disolución al 0.2 % en  $\text{AgNO}_3$  y 0.03 % de formaldehído. Para los geles empleados se han utilizado 100 mL de esta disolución preparada a partir de 0.2 g de  $\text{AgNO}_3$  y 80  $\mu\text{L}$  de formaldehído al 37 %.
7. Lavar con agua Milli-Q durante 1 minuto.
8. Para revelar el gel se introduce éste en 100 mL de una disolución que contienen  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 3 %, 50  $\mu\text{L}$  de formaldehído al 37 % y 800  $\mu\text{L}$  de disolución 2.5 mM en  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ . El gel se mantiene sumergido en esta disolución hasta que las bandas se distinguen claramente.
9. Para que el gel no se oscurezca excesivamente, se interrumpe la reacción anterior añadiendo 10 mL de ácido acético por cada 100 mL de disolución de revelado en la que se encuentra sumergido el gel.
10. Se lava el gel con agua Milli-Q durante 30 minutos.
11. Lavar con una disolución al 5 % en glicerol durante 30 minutos.
12. Añadir AGEFIX en una relación 1:4 (v/v) para desteñir el exceso de plata.
13. Secar el gel en papel de celulosa de la misma forma descrita para los geles de SDS.

### 3.3.3 ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN GEL DE AGAROSA

Como ya se ha mencionado anteriormente, las técnicas de electroforesis también se emplean en la separación de ácidos nucleicos de diferente peso molecular. Las moléculas de ácidos nucleicos de pequeño tamaño (cien nucleótidos o menos) se separan generalmente en geles de poliacrilamida. Las moléculas de mayor tamaño tienen problemas para desplazarse a

través de dicha matriz y en general se fraccionan más fácilmente en geles de agarosa, de mayor porosidad.

La separación de los ácidos nucleicos mediante electroforesis en gel se basa en principios similares a los de que operan durante el fraccionamiento de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, descrita en la sección 3.3.2. A diferencia de las proteínas, las moléculas de ácido nucleico cualquiera que sea su longitud tienen una densidad de carga similar (número de cargas negativas por unidad de masa), con lo que todas ellas poseen un potencial equivalente que les permite desplazarse en presencia de un campo eléctrico. El gel de poliacrilamida o de agarosa suministra la resistencia necesaria para dicho desplazamiento, de forma que cuanto mayor sea el peso molecular de una molécula de ácido nucleico, más lentamente se desplazará a lo largo del gel. La sensibilidad de la electroforesis en gel llega a ser tal que es posible separar fragmentos en el intervalo comprendido entre 50 y 30.000 pares de bases, dependiendo del porcentaje en agarosa utilizado en el gel. La concentración de la agarosa presente en un gel determina el tamaño de poro de la matriz, de forma que un incremento en la concentración de agarosa disminuye el tamaño de poro. Las concentraciones de agarosa en gel que se utilizan normalmente oscilan entre el 0.4% y el 4% en una relación peso/volumen. Por esta razón, un gel de agarosa de baja concentración (0.3%) se emplea para separar fragmentos de ácidos nucleicos de mayor tamaño. Los geles de agarosa entre el 0.75 y el 1% de concentración se utilizan para separar fragmentos en el intervalo comprendido entre las 150 y las 15000 bases. En el caso de los fragmentos de ADN que se han identificado en esta memoria, con tamaños que oscilan entre las 60 y 220 pares de bases, el porcentaje de agarosa que se recomienda utilizar está entre el 2 % y el 4 %.

La matriz del gel de agarosa es un hidrocoloide que se forma a partir de enlaces de hidrógeno y uniones hidrofóbicas entre los polímeros que constituyen las moléculas de agarosa. Esto hace que la matriz llegue a ser frágil con lo que el gel debe ser manipulado en todo momento con sumo cuidado.

### **3.3.3.1 Disoluciones**

Los tampones que se utilizan para llevar a cabo el desarrollo de este tipo de electroforesis son los siguientes:

**TBE (Tris-Borato-EDTA) concentrado:** contiene Tris base 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM a pH 8.3 y se prepara como se describe en la sección 3.4. Esta disolución se conserva a temperatura ambiente. Para la preparación y uso de los geles se utiliza una dilución 1:10 de este tampón (TBE diluido). El uso de este tampón se debe a las ventajas que presenta, entre las que destacan su alta capacidad tamponante y su baja conductividad, lo que impide que se genere una cantidad excesiva de calor en la electroforesis y permite así utilizar un voltaje elevado durante la misma.

**Tampón de carga:** éste es el tampón que se añade a las muestras de ADN cuando se van a cargar en el gel. Se utiliza un tampón comercial a una concentración 6X de la casa MBI FERMENTAS, que se compone de azul de bromofenol al 0.09 %, cianol xileno FF al 0.09 %, glicerol al 60 % y EDTA 60 mM.

### **3.3.3.2 Preparación del gel y de las muestras**

La preparación del gel se lleva a cabo en una cubeta horizontal. En nuestro caso se ha utilizado el modelo H1-SET de la casa Scie-Plas Ltd. Las dimensiones que adopta el gel dentro de este molde son de 10 cm de ancho x 10 cm de largo x 1 cm de espesor. El gel conteniendo agarosa al 2 % se prepara añadiendo dicho reactivo al tampón TBE diluido y calentando hasta ebullición la disolución en microondas o al baño maría, cuidando de evitar la ebullición prolongada de la misma. Después se deja enfriar un poco el matraz hasta una temperatura en torno a los 50 °C y se vierte a continuación su contenido en la cubeta con cuidado de no dejar burbujas. Se deja gelificar la disolución durante una media hora, al cabo de la cual se retiran con cuidado los espaciadores y el peine y se cubre el gel completamente dentro de la cubeta con el volumen necesario de tampón TBE diluido, para que pueda producirse el paso de la corriente una vez comenzada la electroforesis.

La preparación de las muestras se realiza tomando un volumen de las mismas y añadiendo a continuación el tampón de carga 6x (1 µL por cada 6 µL de muestra). Los patrones que se han utilizado para comparar la longitud de los fragmentos de ADN de las muestras del gel incluyen 11 fragmentos de ADN comprendidos entre 80 y 1031 pares de bases (pb) (Figura 3.1.6).

### **3.3.3.3 Aplicación y desarrollo de las muestras en el gel**

Antes de realizar la electroforesis es necesario aplicar las muestras en el gel, proceso durante el que hay que evitar que entre aire en los pocillos del mismo. En uno de los pozos se cargan 4  $\mu\text{L}$  (equivalentes a 4  $\mu\text{g}$  de muestra) de los patrones y en el resto se cargan hasta 15  $\mu\text{L}$  de las muestras. A continuación se conecta el sistema a la corriente. Se recomienda utilizar 5 voltios por cm de longitud del gel para que la separación de los fragmentos sea la adecuada. En nuestro caso se han empleado 50 voltios. La presencia del azul de bromofenol en el tampón de carga permite seguir el frente durante la electroforesis. Se recomienda completar la electroforesis antes de que el frente alcance el borde inferior del gel (a unos 2 cm aproximadamente del mismo).

Una vez completada la electroforesis, el gel se extrae con cuidado de la cubeta.

### **3.3.3.4 Tinción y cuantificación de los fragmentos de ADN**

A continuación, la cuantificación y localización de todos los fragmentos de ADN presentes en las muestras aplicadas en el gel de agarosa se lleva a cabo sumergiendo el gel en una disolución de bromuro de etidio, que presenta fluorescencia con un intenso color naranja cuando se une a los ácidos nucleicos, al excitarse con luz ultravioleta a una longitud de onda de 300 nm. De esta manera, se detectan cantidades de al menos 10 ng de una doble cadena de ADN. Para llevar a cabo tal operación es indispensable el uso de guantes impermeables y mascarillas debido a la alta capacidad mutagénica de este reactivo, así como de gafas protectoras que impidan la exposición de los ojos a la radiación UV. El bromuro de etidio se utiliza a partir de una disolución comercial diluida en tampón TBE diluido, a una concentración aproximada de 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El gel se sumerge en esta disolución entre 15 y 60 minutos, aunque, en cualquier caso, este tiempo debe ser minimizado para prevenir la difusión fuera del gel de los fragmentos de ADN.

### **3.4 PREPARACIÓN DE MUESTRAS**

#### **3.4.1 PREPARACIÓN DE TAMPONES Y DE DISOLUCIONES DE PROTEÍNA**

Las disoluciones tampón que se utilizan para preparar las muestras de proteína se preparan a partir de las formas ácida y básica del propio tampón, según el pH que se desee conseguir. El procedimiento experimental consiste en preparar dos disoluciones a la misma concentración de las formas ácida y básica del tampón. Cada una de estas disoluciones posee un pH superior (forma básica) e inferior (forma ácida) al pH deseado. Para ajustar el pH a dicho valor se mezclan ambas disoluciones, siguiendo la variación del pH a través de la lectura nominal proporcionada por un pH-metro. A continuación se filtra la disolución a través de un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Alternativamente, el tampón puede prepararse a partir de la forma ácida, y ajustando el pH al valor deseado añadiendo la cantidad adecuada de una disolución de NaOH recién preparada.

La proteína circular AS-48 y los mutantes obtenidos a partir del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina, objeto de estudio de esta tesis, se han utilizado a partir de liofilizados y/o congeladas en disolución. Así, en el primer caso es necesario pesar una cantidad de liofilizado de proteína en función de la concentración y volumen de disolución deseados y disolverla con cuidado y sin agitar de forma brusca en el volumen requerido del tampón de diálisis recién preparado. En el caso de disponer de alícuotas congeladas de la muestra, es necesario descongelarlas previamente a temperatura ambiente y clarificarlas por centrifugación. En ambos casos, la muestra se prepara a la concentración adecuada para el experimento y se introduce con ayuda de una micropipeta en un tubo de diálisis. El tubo se cierra por ambos extremos con unas pinzas especiales, dejando una pequeña cámara de aire en su interior. Se enjuaga con cuidado la bolsa con agua Milli-Q para eliminar posibles suciedades debidas a la manipulación y se introduce entonces en un vaso de precipitado que contenga un volumen de tampón unas 500 o 600 veces mayor que el de la muestra; se agita de forma suave durante al menos el tiempo mínimo necesario para alcanzar el equilibrio de la diálisis (unas 6 horas en el caso de las membranas utilizadas) a 4°C (en el caso de proteínas muy estables frente a la temperatura, como el caso de la proteína circular AS-48, la diálisis puede llevarse a cabo a temperatura ambiente). Transcurrido ese tiempo se realiza un cambio del tampón que baña la muestra por otra cantidad similar de tampón fresco, dejándose entre 8 y 12 horas aproximadamente en las mismas condiciones de agitación y temperatura. A continuación se

extrae la disolución dializada de proteína de la bolsa y se clarifica en una centrífuga de mesa a máxima velocidad. La concentración de proteína se determina espectrofotométricamente registrando el espectro ultravioleta-visible, como se describen la sección 3.4.3.

### **3.4.2 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES CONCENTRADAS DE AGENTE DESNATURALIZANTE**

#### **3.4.2.1 Disoluciones de guanidina**

En primer lugar, las disoluciones de guanidina se han preparado por pesada del producto sólido. A continuación se disuelve en el mismo tampón de la diálisis equilibrado con la disolución de proteína. En este proceso de disolución se produce un aumento de volumen significativo, aunque la variación de la concentración del tampón en términos de fuerza iónica no es significativa, debido a que la mayor contribución a ésta viene dada por la gran concentración de guanidina e iones Cl<sup>-</sup> presente en el medio (próxima a 8 M). Por otra parte, la determinación del pH real de la disolución puede incluir cierto tipo de incertidumbre (García-Mira, 2001). En todos los casos la determinación del pH se ha realizado tomando la lectura nominal que proporciona el pH-metro, comprobándose que este hecho no introduce ningún tipo de artefacto que induzca a errores en los resultados experimentales.

Una vez preparada la disolución como se ha indicado, se filtra usando un filtro con tamaño de poro de 0.45 µm. La concentración precisa de guanidina presente en la disolución se determina a continuación a partir de la medida a temperatura ambiente de su índice de refracción, y de la del propio tampón acuoso en el que aquella se ha disuelto (Pace et al., 1989). La diferencia entre ambas medidas proporciona el valor de  $\Delta n$ , a partir del cual se obtiene la concentración de guanidina, expresada en mol/L, con la expresión (Nokazi, 1972):

$$c_{\text{GuHCl}} = 57.147 \cdot (\Delta n) + 38.68 \cdot (\Delta n)^2 - 91.60 \cdot (\Delta n)^3 \quad (3.4.1)$$

#### **3.4.2.2 Disoluciones de urea**

Las disoluciones concentradas de urea, a diferencia de las disoluciones de guanidina que pueden conservarse a temperatura ambiente durante varios meses, se descomponen lentamente dando lugar a la aparición en el medio de iones amonio y cianato (Hagel et al., 1971). A su vez, estos últimos pueden reaccionar con los grupos amino de las proteínas,

dando lugar a procesos de carbamilación que pueden interferir en estudios posteriores (Stark, 1965). Por esta razón se aconseja utilizar siempre disoluciones frescas de urea, preparadas en el mismo día o en su defecto, el día anterior. Es posible también congelar la disolución y utilizarla al cabo del tiempo.

La urea se pesa en la cantidad necesaria, que se disuelve a continuación en un volumen de agua Milli-Q menor que el volumen final deseado, debido al aumento de volumen que tiene lugar durante la solubilización. Este proceso puede acelerarse sonicando la muestra, ya que las concentraciones que se requieren están en torno al límite de saturación (la solubilidad de la urea a 25 °C es de 10.49 M), evitando aquí calentar la muestra para no favorecer su descomposición. El siguiente paso consiste en purificar la disolución de urea, de los iones fruto de su descomposición, pasándola dos o tres veces a través de una resina de intercambio iónico, AG501-X8(D) (Biorad). A continuación, se puede proceder de dos formas diferentes:

Se pesa la cantidad deseada de la forma ácida del tampón fosfato y se disuelve a continuación en la disolución acuosa de urea. El pH de la disolución resultante se ajusta hasta el valor nominal añadiendo HCl ó NaOH y se filtra después con un filtro de 0.45 µm de tamaño de poro.

Una segunda opción consiste en seguir los pasos descritos en el procedimiento general de preparación de tampones (sección 3.4.1), destacando que hay que separar el volumen total de disolución de urea preparada en dos fracciones iguales y, a continuación, disolver en cada una de ellas las cantidades correspondientes de las formas ácida y básica del tampón.

Al igual que en el caso de las disoluciones de guanidina, el valor de pH final tomado es el correspondiente a la lectura del pH-metro.

La concentración molar exacta de las disoluciones de urea se determina a partir de la medida de los índices de refracción (Pace et al., 1989). La diferencia entre el índice de refracción de la disolución de urea preparada y el de la disolución tampón, proporciona el valor de  $\Delta n$ , mediante el que se obtiene la concentración de urea a través de la ecuación (Warren et al., 1966):

$$c_{\text{urea}} = 117.66 \cdot (\Delta n) + 29.753 \cdot (\Delta n)^2 + 185.56 \cdot (\Delta n)^3 \quad (3.4.2)$$

Todas las medidas han sido realizadas a temperatura ambiente.

### 3.4.3 MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS Y ÁCIDOS NUCLEICOS EN DISOLUCIONES TAMPONADAS

Uno de los aspectos más importantes a la hora de llevar a cabo el desarrollo del trabajo experimental que se expone en esta memoria es la determinación precisa de la concentración de las proteínas consideradas. Generalmente esto se realiza midiendo la absorbancia, Abs, de la disolución de proteína a 280 nm y aplicando la ley de Lambert-Beer,  $Abs = \epsilon \cdot l \cdot c$ , donde  $l$  (paso de luz de la cubeta de medida) se mide en cm y  $c$  (concentración de proteína) en unidades molares, con lo que  $\epsilon$ , el coeficiente de extinción molar, viene en  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

El error estándar asociado está entre el 1 y el 3% si el coeficiente de extinción está determinado correctamente. Su determinación se ha descrito en la literatura de formas distintas en el caso de proteínas (Martínez, 1995), aunque el método más exacto es el de Gill y von Hippel (1989), basado en la composición aminoacídica de la proteína en cuestión y en los espectros obtenidos para ésta y compuestos modelo medidos en presencia de agentes desnaturalizantes.

El método consiste en calcular en primer lugar el coeficiente de extinción de la proteína desnaturalizada en guanidina 6 M a partir del número de restos triptófano, tirosina y cisteína que se encuentran en cada molécula, en función de los coeficientes de extinción calculados para compuestos modelo como se muestra en la Tabla 3.4.1. Estos restos mencionados son los únicos que contribuyen de manera significativa a la densidad óptica medida para la proteína en el intervalo comprendido entre 276 y 282 nm (Edelhoch, 1967). Con esta información, el coeficiente de extinción molar de la proteína en guanidina 6 M viene dado por:

$$\epsilon_{M,GuHCl} = N_{Tyr} \cdot \epsilon_{M,Tyr} + N_{Trp} \cdot \epsilon_{M,Trp} + N_{Cys} \cdot \epsilon_{M,Cys} \quad (3.4.3)$$

donde  $\epsilon_{M,Tyr}$ ,  $\epsilon_{M,Trp}$ ,  $\epsilon_{M,Cys}$  son los coeficientes de extinción molar de los restos Tyr, Trp y Cys dados en la Tabla 3.4.1 y  $N_{Tyr}$ ,  $N_{Trp}$  y  $N_{Cys}$  el número de cada uno de estos restos respectivamente por molécula de proteína.

En la práctica esto se realiza preparando dos disoluciones de igual concentración de muestra, una en el tampón deseado y la otra en guanidina 6 M preparada en ese mismo tampón ( $c_{Nat} = c_{GuHCl}$ ). Del espectro de ambas disoluciones se toma la medida de absorbancia a la longitud de onda a la que la proteína presente su máximo de absorción (que será en el intervalo 276-282 nm, siendo nuestros ejemplos a 280 nm).

TABLA 3.4.1

COEFICIENTES DE EXTINCIÓN MOLAR DE COMPUESTOS MODELO EN 6.0 M DE GUANIDINA (Edelhoch, 1967) EXPRESADOS EN UNIDADES  $\text{cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ .

COMPUESTO MODELO	$\epsilon$ (276 nm)	$\epsilon$ (278 nm)	$\epsilon$ (279 nm)	$\epsilon$ (280 nm)	$\epsilon$ (282 nm)
N-acetil-L-triptofanamida	5400	5600	5660	5690	5600
Gly-L-Tyr- Gly	1450	1400	1345	1280	1200
Cistina	145	127	120	120	100

El valor del coeficiente de extinción molar para la proteína en condiciones nativas vendrá dado por:

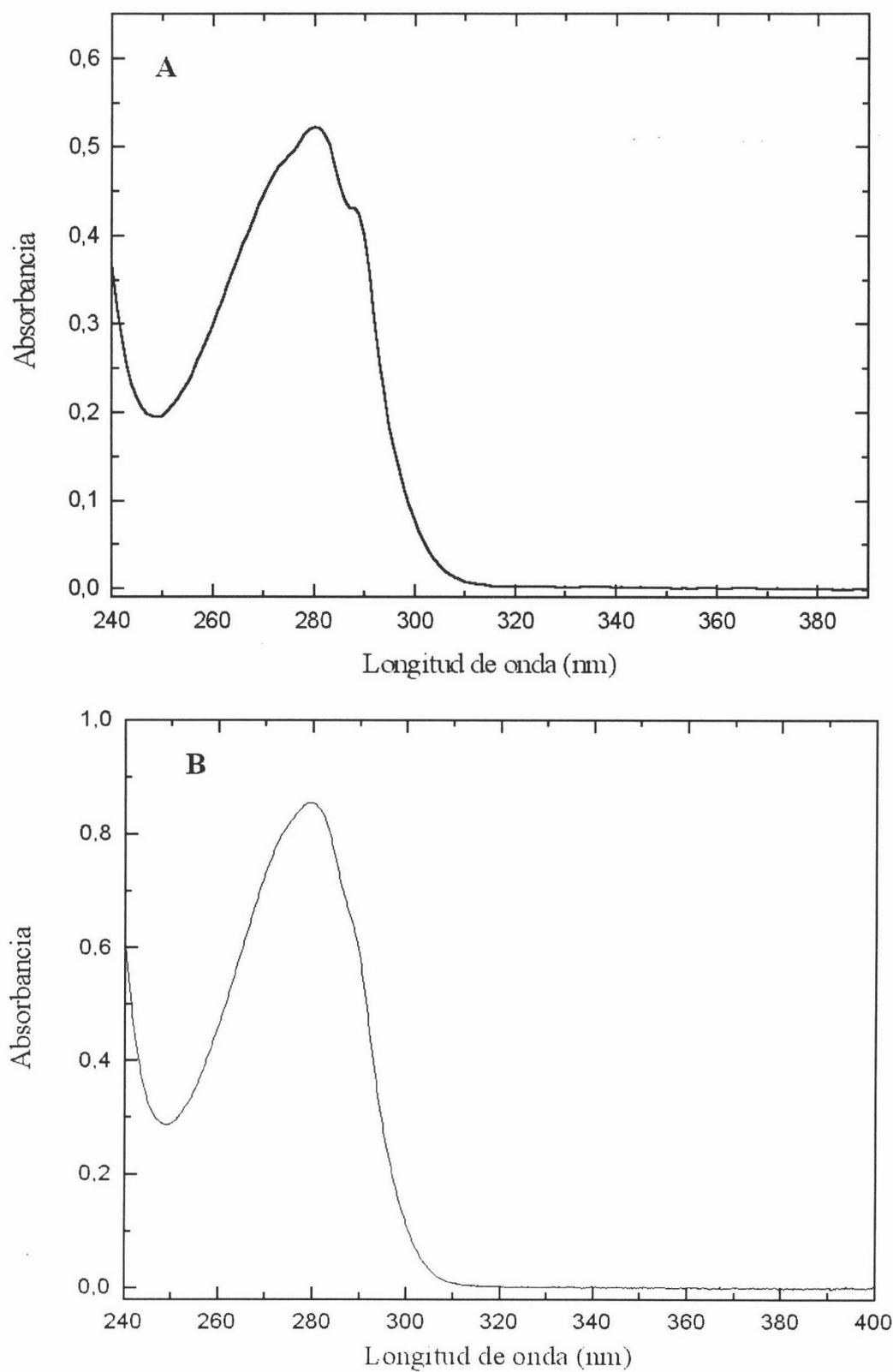
$$\epsilon_{M,Nat} = \frac{\text{Abs}_{Nat} \cdot \epsilon_{M,GuHCl}}{\text{Abs}_{GuHCl}} \quad (3.4.4)$$

De esta manera se ha obtenido el coeficiente de extinción molar para el caso de la proteína AS-48 en tampón 10 mM fosfato, pH 2.5, obteniéndose el valor de  $12350 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  a 280 nm. En el caso de los mutantes del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina, se ha comprobado que es posible utilizar el coeficiente de extinción molar determinado para la proteína silvestre (Viguera et al., 1994b),  $16147 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  a 280 nm en todos los mutantes, debido a que el coeficiente de extinción molar determinado para el mutante Best5I25V muestra un valor muy próximo al anterior y se encuentra dentro del límite de error. En la Figura 3.4.1 se muestran los espectros ultravioleta-visible típicos de las proteínas AS-48 y Best5I25V.

Por otra parte, también ha sido necesario determinar la concentración de ácidos nucleicos espectrofotométricamente a 260 nm (sección 3.1), valor en el que el espectro para la molécula de ADN presenta su máximo de absorción. En este caso, el coeficiente de extinción molar de un fragmento de una molécula de ADN se puede calcular mediante la siguiente relación aproximada:

$$\epsilon_{260} = (N_A \cdot 15.44 + N_T \cdot 9.7 + N_C \cdot 9.2 + N_G \cdot 11.4) \quad (3.4.5)$$

donde  $N_A$ ,  $N_T$ ,  $N_C$  y  $N_G$  corresponden respectivamente al número total de adeninas, timinas, citosinas y guaninas presentes en la secuencia del fragmento de ADN considerado. Una vez calculado el coeficiente de extinción molar la concentración de un ácido nucleico se obtiene midiendo la absorbancia a 260 nm y empleando la ecuación de Lambert-Beer.



**Figura 3.4.1:** Espectros ultravioleta visible de la proteína AS-48 en tampón fosfato 10 mM, pH 2.5 (A) y del mutante Best5i25v del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina en tampón glicina 50 mM, pH 3.5 (B).

#### 3.4.4 CORTE CON BROMURO DE CIANÓGENO DE AS-48

La proteína circular se cortó entre las posiciones 1 y 70 por tratamiento con bromuro de cianógeno (BrCN), a partir del siguiente protocolo (Coligan et al., 1997):

En primer lugar se resuspenden 5 mg de AS-48 puro y liofilizado en 0.25 ml agua. A continuación se adicionan 5 ml de ácido fórmico (85%) y 150 mg de BrCN. La reacción se incuba 24 h a temperatura ambiente y en ausencia de luz. A continuación se liofiliza dializando después frente a agua destilada. Opcionalmente, puede liofilizarse de nuevo para conservarlo en este estado.

## **3.5 EXPERIMENTOS DE CINÉTICA RÁPIDA MEDIANTE LA TÉCNICA DE FLUJO DETENIDO**

### **3.5.1 INTRODUCCIÓN A LA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA**

Las proteínas son capaces de absorber y emitir radiación en la zona ultravioleta del espectro electromagnético. Dicha absorbancia es debida a la presencia de los enlaces peptídicos, aminoácidos aromáticos, y en menor extensión a la existencia de puentes disulfuro. Algunas proteínas que poseen grupos cromóforos presentan también absorción en la región visible del espectro. Durante el proceso de absorción la energía de la luz se emplea en promover electrones desde un estado inicial a otro excitado de mayor energía, de tal manera que en el caso de electrones deslocalizados de sistemas aromáticos la absorción de energía se produce en las regiones visible o del ultravioleta cercano. La fluorescencia de emisión surge a partir de la presencia de los aminoácidos aromáticos y se puede observar por la emisión de energía que se produce cuando los electrones que están en un estado excitado vuelven al estado de energía inicial en el que se encontraban antes de ser excitados.

En consecuencia, la emisión de fluorescencia se observa cuando un electrón previamente excitado vuelve desde el primer nivel de excitación al nivel de energía en el que estaba inicialmente, con la particularidad de que en dicho estado excitado el electrón pierde parte de la energía que posee debido a procesos rápidos no radiativos, como transiciones vibracionales (relajación). Por esa razón, la energía de la luz emitida al volver al estado inicial es menor que la de la luz absorbida para pasar al estado excitado, dando lugar a que la fluorescencia presenta longitudes de onda superiores a las de absorción. Durante el tiempo de vida media del estado excitado pueden existir interacciones o perturbaciones que afecten al mismo, y consecuentemente, al espectro de emisión. Por esta razón, la fluorescencia de emisión es mucho más sensible a los cambios en el entorno del grupo cromóforo que la de absorción de luz, por eso es una técnica muy extendida en la investigación de cambios conformacionales en proteínas.

En el caso de las proteínas, la fluorescencia se debe a la presencia de los aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina y, especialmente, a la contribución del triptófano. Éste puede excitarse a longitudes de onda mayores que para los otros dos aminoácidos (por encima de 295 nm). El anillo indólico de su cadena lateral presenta además un coeficiente de extinción molar mayor que el de las cadenas laterales de tirosina y fenilalanina. Así, aunque su

rendimiento cuántico sea similar al de la tirosina, presenta una fluorescencia de emisión mucho más intensa. Por otra parte, su cadena lateral también es muy sensible a cambios en el entorno. A esto podemos añadir que las proteínas no suelen contener en su composición un gran número de triptófanos. Los valores de fluorescencia que presentan estos aminoácidos se cuantifican y comparan mediante la sensibilidad, definida como el producto del coeficiente de extinción molar del máximo de emisión y del rendimiento cuántico, y que presenta un valor muy pequeño para fenilalanina en comparación al triptófano y tirosina. Por eso la fluorescencia de la fenilalanina no puede ser observada en el estado nativo. Otro factor importante es la transferencia de energía entre residuos que afecta especialmente a la fluorescencia de la fenilalanina debido a que su emisión disminuye por su capacidad de transferir energía a los otros dos aminoácidos. Así, el triptófano y la tirosina absorben energía alrededor de los 280 nm, región en la que la fenilalanina emite fluorescencia. Por otra parte, en el caso de proteínas plegadas que contienen triptófanos y tirosinas la emisión de las tirosinas también se ve afectada porque la emisión de los triptófanos es mucho mayor. Esto se debe por una parte, a que la longitud de onda de emisión del triptófano se desplaza hacia valores de longitud de onda menores que la tirosina y por otra a que los residuos de tirosina pueden transferir energía no radiativa a los triptófanos (Eftink, 1991; Penzer, 1980; Cantor & Schimmel, 1980; Brand & Witholt, 1967). Para que esto ocurra, ambos residuos deben estar contenidos en la misma molécula de proteína y orientados en ella favorablemente.

Los cambios producidos en la conformación de las proteínas a lo largo del proceso de desplegamiento implican cambios en el entorno, de forma que residuos que en el estado nativo (plegado) se encuentran protegidos, pueden estar expuestos al solvente en el estado desplegado. Esto se traduce en cambios en la fluorescencia, especialmente, según se ha mencionado, en el triptófano. Estos cambios pueden darse en el valor del máximo de emisión, que depende del entorno. Así, para un triptófano protegido en el interior apolar de la estructura nativa de una proteína este cambio se encuentra en el intervalo comprendido entre 308 y 340 nm. Este amplio intervalo se debe a una localización variable del anillo indólico respecto a cadenas laterales de otros grupos como puentes disulfuro, histidinas protonadas o enlaces peptídicos por ejemplo. El máximo de su espectro de emisión se desplaza en longitud de onda hasta valores entre 340 y 350 nm para el caso de estar expuesto al disolvente en el estado desplegado.

También pueden darse cambios en la intensidad de emisión, que puede aumentar o disminuir simultáneamente al desplazamiento del máximo de emisión. Dichos cambios en

intensidad se producen por los cambios en el entorno producidos gracias al paso de conformación nativa al estado desplegado, en el que este residuo está expuesto al solvente.

En el caso de la tirosina su máximo de emisión de fluorescencia, se encuentra alrededor de 303 nm, independientemente de su entorno molecular. Por eso, si una proteína contiene tirosinas y no triptófanos, el desplegamiento estará dirigido sólo por cambios en la intensidad de emisión de este residuo, que suele presentar valores menores en el estado nativo respecto al del estado desplegado.

La posición del máximo de emisión de estos dos residuos varía también en función de la naturaleza y concentración del solvente, incluso en ausencia de cambios conformacionales. Generalmente, las proteínas pueden desplegarse a través de cambios en la temperatura o por el uso de agentes desnaturizantes (guanidina y urea). Estos factores también contribuyen a cambiar los espectros de emisión del triptófano y tirosina.

### **3.5.2 FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA DE FLUJO DETENIDO**

Las proteínas pueden desnaturizarse mediante la adición de un desnaturizante químico como urea o guanidina, de un ácido o una base, mediante la unión o desunión a un ligando determinado o mediante la variación de la temperatura o presión. Dentro de los estudios de las cinéticas de plegamiento y desplegamiento, el diseño experimental más frecuentemente usado se basa en el uso de las técnicas de flujo, mediante las que se consigue mezclar de forma rápida la disolución de proteína con la disolución de agente desnaturizante. Existen, sin embargo, otros métodos basados en la variación de propiedades físicas, como los llamados “salto de temperatura” (Jovin, 1975) o “salto de presión” (Vidugiris et al., 1995) o incluso los que comprenden reacciones inducidas por láser (Chan, et al., 1996). Otras técnicas cinéticas como el intercambio hidrógeno-deuterio, seguido por resonancia magnética nuclear, informan acerca de cambios locales en la estructura secundaria (Englander & Mayne, 1992; Roder et al., 1988; Udgaonkar & Baldwin, 1988; Kim & Baldwin, 1980). Sin embargo, este método requiere grandes cantidades de muestra y no permite obtener una relación señal-ruido alta como en el caso de las medidas de fluorescencia que se obtienen mediante el flujo detenido.

Para el caso de pequeñas proteínas globulares, las cinéticas de las reacciones de plegamiento y desplegamiento inducidas por un agente desnaturizante, suelen ser curvas monoexponenciales, hecho que indica la existencia de una única barrera de energía de

activación para la reacción. En el caso de algunas proteínas, particularmente aquellas constituidas por varios dominios y/o conformaciones alternativas, las cinéticas suelen presentar respuestas más complicadas, dando lugar a cinéticas multiexponenciales. Estos casos multiexponenciales se producen como consecuencia de la existencia de múltiples estados desplegados que se interconvierten lentamente o de la existencia de varias barreras de energía que el sistema ha de vencer para pasar de un estado inicial a otro final.

La sensibilidad del método de flujo detenido permite utilizar disoluciones de proteína en el intervalo de concentración micromolar, con lo que no es necesario disponer de grandes cantidades de muestra, minimizando así problemas asociados a la agregación y baja solubilidad de la misma. En estas condiciones, el instrumento obtiene una buena relación señal-ruido, con una resolución temporal limitada sólo por el tiempo muerto de mezcla del sistema. Puede aplicarse también en estos casos otros observables físicos, como el dicroísmo circular o la espectroscopía de absorción. Según se describe en la sección 3.7 el DC es una técnica que mide los cambios en el contenido de  $\alpha$ -hélices y estructura  $\beta$  de una proteína, y su utilización presenta algunas desventajas frente a la fluorescencia, debido a que la urea y la guanidina absorben luz ultravioleta por debajo de 210 nm, hecho que limita el uso de bajas longitudes de onda cuando se requieren altas concentraciones de estos agentes desnaturizantes. La espectroscopia de absorción, como ya se ha dicho anteriormente, es menos sensible que la espectroscopia de fluorescencia.

Otra ventaja del uso de la fluorescencia se basa en que la presencia de los grupos fluoróforos en las proteínas permite obtener información acerca de la exposición de estos grupos al solvente, movimientos locales y globales en la estructura, distancias entre restos y existencia de superficies hidrofóbicas. Los cambios en la fluorescencia que se producen pueden seguirse midiendo parámetros (Eftink, Maurice R., 1994) tales como la intensidad de la fluorescencia a distintas longitudes de onda de excitación y emisión, el rendimiento cuántico, la longitud de onda del máximo de emisión, el tiempo de vida de fluorescencia o la anisotropía de la fluorescencia, que proporciona información de la libertad conformacional en distintos estados de la proteína.

### 3.5.3 INSTRUMENTACIÓN

A la hora de describir la instrumentación que se utiliza en este tipo de técnica, hay que destacar algunos aspectos que se detallan a continuación:

En primer lugar, el diseño mecánico del instrumento debe de dotar al sistema con los siguientes componentes básicos:

- Componentes convencionales de un espectrofotómetro y/o fluorímetro que midan los cambios en absorción y/o emisión de fluorescencia según se desee.
- Un dispositivo que permita la mezcla rápida de los componentes de la reacción.
- Un sistema de adquisición de datos que presente una respuesta rápida.

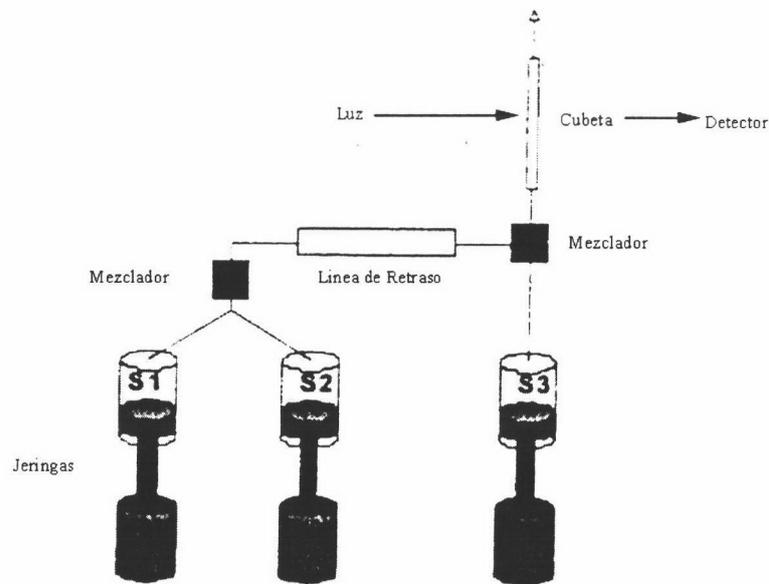
En nuestro caso el sistema utilizado ha sido el módulo de flujo detenido SFM-3 de Bio-Logic. Dicho módulo se compone de un sistema mecánico que permite que dos o tres disoluciones puedan ser mezcladas e inyectadas dentro de una cubeta de medida, como se observa en la Figura 3.5.1. Este sistema se compone de los siguientes elementos: tres jeringas, cuyos émbolos se mueven con tres motores independientes controlados a través de la unidad MPS-51, dos mezcladores para disoluciones de alta densidad, una línea de retraso, un compartimento de observación que contiene la cubeta de medida acoplada al equipo de fluorescencia y un bloque de termostatación de todo el sistema y de las disoluciones.

Tanto el compartimento de observación como las jeringas del módulo SFM-3 están montados en posición vertical, facilitando así la eliminación de burbujas de las disoluciones durante el proceso de llenado de las mismas.

A continuación se describen brevemente cada uno de estos elementos:

*El bloque de jeringas* que compone este sistema consta de tres jeringas de diferentes volúmenes según su uso. Así, según la Figura 3.5.2 en un experimento la jeringa 1 se rellena con disolución tampón y su capacidad es de 20 mL. La jeringa 3 contiene la disolución de proteína y su capacidad es de 5 mL. La jeringa 2, de 20 mL de capacidad, se rellena con la misma disolución que la jeringa 1 para evitar fenómenos de difusión entre ésta y la jeringa 1, aunque no se utiliza en la realización de los experimentos.

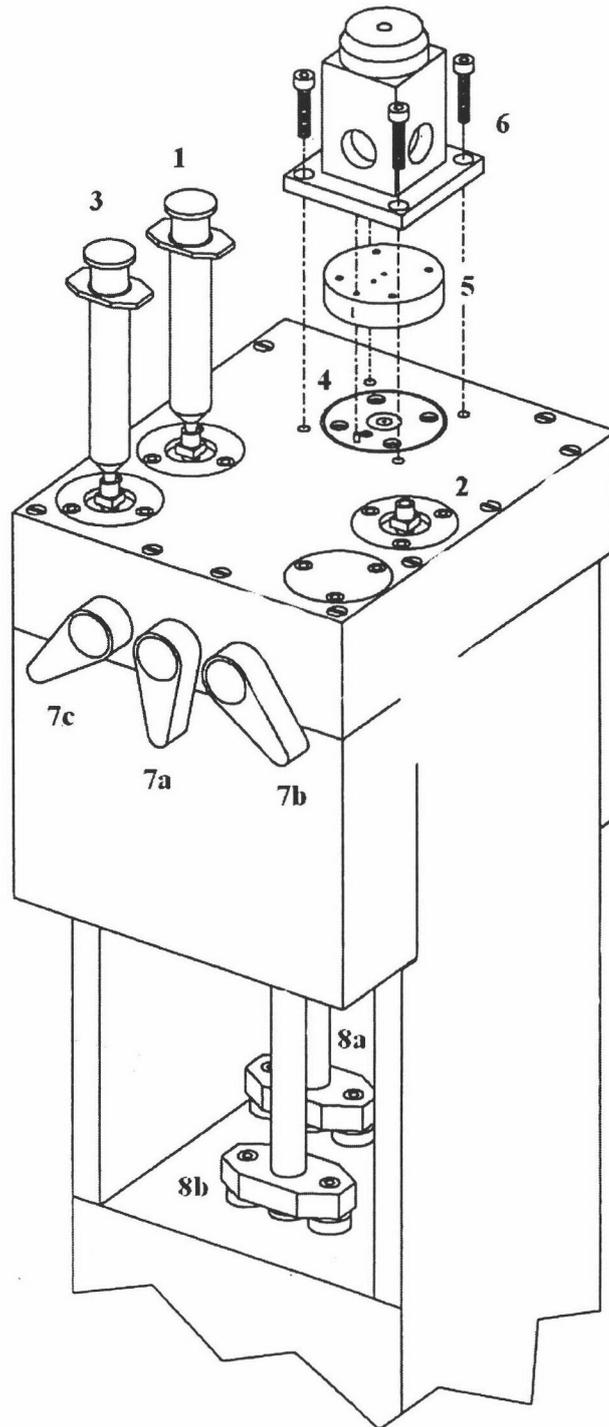
*La línea de retraso* está construida dentro de unos espaciadores hechos con diversos materiales inertes, dependiendo del modelo comercial. Dichos espaciadores se insertan entre los mezcladores para ajustar el volumen y el tiempo de envejecimiento de la reacción en este tramo (Figura 3.5.2). Para evaluar este tiempo de envejecimiento hay que tener en cuenta el volumen de mezcla en el espacio comprendido entre los dos mezcladores. Dicho volumen incluye el volumen comprendido en la línea de retraso y los volúmenes muertos (volúmenes sobre las caras de los espaciadores y los mezcladores). El volumen de la línea de retraso suele



**Figura 3.5.1:** Sistema SFM-3 para medida de cinéticas mediante flujo detenido. Dos o tres disoluciones pueden mezclarse e inyectarse dentro de la cubeta de medida instalada dentro de la célula de observación.

ser del orden de 200  $\mu\text{L}$ , aunque puede alcanzar hasta 1000  $\mu\text{L}$ . En los experimentos llevados a cabo en esta memoria no se ha utilizado este dispositivo, sólo el segundo de los mezcladores que se describen a continuación.

Los mezcladores están situados según se observa en la Figura 3.5.2 dentro del bloque de las jeringas y en la parte inferior del compartimiento de observación, bajo la cubeta. En la realización de los experimentos de plegamiento y desplegamiento de proteínas, se mezclan disoluciones con altas concentraciones de urea o guanidina y tampones acuosos. Esto puede provocar artefactos de medida en la cubeta de observación, por las diferencias en la densidad de las disoluciones que se unen en el mezclador, lo que hace que no se pueda seguir la reacción entre los 10 y 30 primeros segundos de producirse la mezcla, dada la falta de homogeneidad de la misma al introducirse en la cubeta. El efecto será mínimo cuando la disolución de desnaturizante, más densa, se diluya en gran proporción (por ejemplo, 10 veces) y su densidad sea parecida a la de la disolución acuosa. Por esta razón, se incluye en el sistema un mezclador especial SAD (Soluciones de Alta Densidad) que bloquea este efecto originado por diferencias en la densidad o incluso la temperatura, permitiendo que la mezcla pueda ser medida desde tiempos del orden del milisegundo una vez iniciada la reacción.



**Figura 3.5.2:** Esquema general de la unidad SFM-3 con sus diferentes componentes: 1: jeringa 1; 2: jeringa 2; 3: jeringa 3; 4: primer mezclador; 5: línea de retardo; 6: célula de observación que incluye el segundo mezclador y la cubeta de medida; 7a, 7b, 7c: llaves que conectan las jeringas 1, 2 y 3 respectivamente con el sistema interno cuando se encuentran abiertas. En la posición de cierre solo se permite el llenado y vaciado de las mismas mediante el movimiento de los émbolos; 8a, 8b: émbolos de las jeringas 1 y 3 respectivamente (en la figura no se llega a observar el émbolo de la jeringa 2).

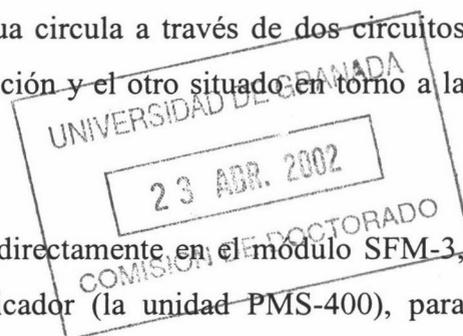
El compartimento de observación (Figura 3.5.2) consta de cuatro ventanas ópticas, una para iluminación y tres para observación, de forma que pueden hacerse, entre otras, medidas de absorbancia, transmitancia, dicroísmo circular o en el caso que nos concierne, fluorescencia de emisión, a una o dos longitudes de onda. En las ventanas colocadas en ángulo recto respecto al punto de incidencia de la luz se colocan lentes para aumentar la eficiencia de detección de la luz.

Este compartimento puede equiparse con diferentes tipos de cubetas, clasificadas en función al tipo de medida que se pretende realizar: dicroísmo circular, fluorescencia, absorbancia o dispersión de luz. Entre los parámetros que diferencian a unas cubetas de otras están: el paso de luz, el volumen muerto de la cubeta, y el tiempo muerto, calculado a una constante de flujo determinada. Hay que notar que todas las cubetas disponibles en el mercado están construidas de Suprasil, material transparente en el intervalo de 185 hasta 2500 nm, así un mismo tipo de cubeta puede usarse para diferentes aplicaciones.

El sistema de regulación térmica que comparten las jeringas, válvulas y el compartimento de observación permite el estudio de cinéticas rápidas que sólo pueden observarse a determinadas temperaturas. La regulación de la temperatura se consigue conectando el módulo SFM-3 a un baño. El flujo de agua circula a través de dos circuitos internos: uno alrededor de las jeringas y sistema de inyección y el otro situado en torno a la válvula de bloqueo y el compartimento de observación.

Como la detección de la señal medida se realiza directamente en el módulo SFM-3, éste está conectado a un canal de detección ó amplificador (la unidad PMS-400), para asegurar que la señal emitida sea la adecuada, regulando el ruido a través de dos filtros y también el voltaje, que controla el valor de la señal, evitando que se produzca una saturación de ésta. Por otra parte, el módulo SFM-3 se controla a su vez a través del software suministrado por Bio-Logic.

Aparte del sistema mecánico descrito, existe un sistema de alimentación de corriente que permite obtener un alto rendimiento del sistema SFM-3 y una velocidad adecuada a los motores de parada o detención. Este sistema se compone de tres suministradores de potencia independientes a corriente constante, controlados cada unos de ellos por sus propios microprocesadores. La secuencia de impulsos de corriente que se envía a los motores de



parada se almacenan en la memoria de unas tarjetas que cada microprocesador contiene, conectados a su vez a un PC que controla y sincroniza la función de los tres suministradores de potencia.

Una vez descrito el diseño mecánico del instrumento, resultará más sencillo comprender el funcionamiento del mismo que se basa en lo siguiente:

Las jeringas del sistema SFM-3 se mueven a partir de tres motores de parada o detención independientes, cada uno de los cuales proporciona un número de pasos determinado por revolución. La alimentación de cada motor está controlada a través de un microprocesador, lo que permite utilizar volúmenes de disolución de  $0.14 \mu\text{L}$  en cada paso cuando se usan jeringas de tamaño estándar (20 mL). El movimiento del motor produce un movimiento lineal y continuo de la jeringa incluso con flujos lentos.

Cada motor puede ponerse en funcionamiento de forma manual o automática. La primera opción se utiliza en el proceso de llenado o lavado de las jeringas y la segunda durante el experimento.

Los impulsos del motor pueden ir dirigidos al llenado o vaciado de las jeringas. La independencia de funcionamiento de las tres jeringas origina una gran versatilidad en las secuencias de inyección, permitiendo realizar inyecciones con una sola jeringa, o el llenado desigual de éstas, etc.

### **3.5.4 DISEÑO DE LOS EXPERIMENTOS**

Antes de preparar los experimentos de plegamiento y desplegado, existen algunos parámetros controlados por el propio instrumento que deben tenerse en cuenta:

El tiempo muerto se define como el tiempo antes del cual es imposible observar el transcurso de la reacción. De forma ideal podría decirse que el tiempo muerto depende sólo de la constante de flujo de la mezcla cuando sale del último mezclador hacia la cubeta y del volumen existente en este tramo. Por tanto, el tiempo muerto se calcula dividiendo el volumen de líquido que hay entre el último mezclador y el centro de la cubeta de medida (volumen muerto de la cubeta, en  $\mu\text{L}$ ) entre la constante de flujo ( $\text{mL/s}$ ). De esta forma, cuando la constante de flujo aumenta, el tiempo muerto debe disminuir y cuando el volumen entre el último mezclador y la cubeta disminuye, el tiempo muerto debe disminuir también. Sin

embargo, existen otros factores relacionados entre sí que influyen sobre este parámetro, como la amplitud de la señal, el correcto lavado de la cubeta y la proteína en cuestión, por lo que es necesario adquirir un compromiso entre ellos para conseguir resultados satisfactorios.

La cavitación es un fenómeno que ocurre cuando, debido a turbulencias, aparecen regiones de baja presión en el líquido formándose una “cavidad” en el mismo. Estas regiones contienen el vapor del líquido en cuestión. Las cavidades no desaparecen por completo, sino que dejan tras de ellas pequeñas burbujas de vapor que interfieren con los métodos de observación óptica utilizados. La probabilidad de que aparezcan cavidades aumenta con la constante de flujo al pasar el líquido por el mezclador o con la viscosidad del líquido para una constante de flujo dada. Sin embargo, puede evitarse la aparición de este fenómeno desgasificando previamente las disoluciones que se utilizarán en el experimento.

La amplitud de la señal es proporcional al paso de luz de la cubeta y a la concentración de la muestra que genera dicha señal. En nuestro caso, concentraciones en torno a 30  $\mu\text{M}$  originan intensidades de fluorescencia en el intervalo de 0.2 a 1, suficientes para obtener una relación señal-ruido adecuada.

La constante de flujo es un parámetro que suele estar limitado por la velocidad impuesta por los motores de las jeringas. A modo de ejemplo, en caso de disponer de tres jeringas estándar de 20 mL de capacidad en el sistema, con una cubeta de medida adaptada al sistema de observación con un volumen de 15.6  $\mu\text{L}$  (comprendido desde el último mezclador hasta el centro de la cubeta) y utilizando una constante de flujo límite de 10 mL/s se pueden obtener tiempos muertos del orden de 1.6 milisegundos. En función de la jeringa utilizada, 5 ó 20 mL, el límite en los valores de la constante de flujo está comprendido en los intervalos 0.01-1.32 mL/s y 0.045-6 mL/s respectivamente. Otros factores como la viscosidad elevada de las disoluciones o bajas temperaturas ambientales pueden disminuir la velocidad alcanzada por las jeringas. En los experimentos llevados a cabo en esta memoria no se han superado en ningún momento los valores límite de las constantes de flujo. Esto se comprueba calculando el valor de dicha constante de flujo alcanzado en las jeringas 1 y 3 a partir de los valores de los volúmenes empleados en las disoluciones de ambas (según se indica en la Tabla 3.5.1) para preparar las mezclas medidas en la cubeta, con un volumen total de 200  $\mu\text{L}$  en todos los casos y el tiempo empleado para llevar a cabo las mezclas de 50 ms.

La longitud de onda de excitación se selecciona a través de un monocromador en el valor deseado. En el caso de la longitud de onda de emisión, se utilizan unos filtros (a modo de lentes) que permiten seleccionar el intervalo de longitud de onda de emisión a partir de la longitud de onda de excitación seleccionada. En el caso de los experimentos llevados a cabo en esta memoria sobre la proteína Best5I25V del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina y los mutantes realizados sobre la misma, la presencia de dos triptófanos en las posiciones 41 y 42 de sus secuencias hacen posible seleccionar la longitud de onda de excitación a 290 nm y la emisión a 305 nm (Martínez & Serrano, 1999), es decir, los filtros escogidos permiten realizar las medidas de emisión desde 305 nm en adelante. La razón de seleccionar 290 nm para la excitación, en lugar de 295 nm propio de los casos en los que se desea excitar triptófanos selectivamente, y 305 nm para la emisión, como valor mínimo se basa en minimizar la interferencia del pico Raman del tampón acuoso, ya que la posición de éste varía en función de la longitud de onda de excitación de forma directamente proporcional y suele superponerse al espectro de emisión de las proteínas.

### **3.5.5 PREPARACIÓN DE LOS EXPERIMENTOS**

Cualquier experimento cinético de estabilidad de proteínas realizado mediante la técnica de flujo detenido consta de dos partes, las correspondientes a las cinéticas de plegamiento y desplegamiento de la proteína, que se llevan a cabo en experimentos independientes.

Para las disoluciones de muestra se prepara un tampón en las condiciones de fuerza iónica y pH a las que se deseen hacer los experimentos y se dializa la proteína a una concentración mínima de 2 mg/mL frente a este tampón según se indica en la sección 3.4.1. Es conveniente que todas las proteínas (mutantes) que se van a utilizar en un mismo estudio comparativo se dialicen frente al mismo tampón para conseguir la igualdad de condiciones en todas ellas, dada la sensibilidad de las medidas de fluorescencia. Los mutantes dializados se congelan en nitrógeno líquido hasta el momento de su uso, en el que se descongelan a temperatura ambiente, se centrifugan durante 10 minutos a máxima velocidad en una centrífuga de mesa a 4 °C y se mide su concentración.

Con el mismo tampón de diálisis se prepara la disolución madre de agente desnaturizante, en este caso urea, a una concentración en torno a 9 M, en el tampón de los

experimentos como se indica en la sección 3.4.2. No es necesario filtrar esta disolución en el momento de su preparación, puesto que tendrá que hacerse justo en el momento de rellenar las jeringas del instrumento para comenzar el experimento. Mezclando un volumen apropiado de la disolución madre de urea con el correspondiente del tampón, se preparan diluciones a concentraciones 8 M, 6 M y 4 M de urea, necesarias para los experimentos de desplegamiento de la proteína. Tanto las disoluciones de urea como el tampón sobrante se congelan a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en fracciones de 50 mL hasta el momento de su uso. La razón para conservar así las disoluciones se debe, entre otros motivos, a la descomposición que sufre la urea con el tiempo cuando permanece a temperatura ambiente.

### 3.5.6 REALIZACIÓN DE LOS EXPERIMENTOS

Para realizar las cinéticas en la dirección de desplegamiento, se parte de la disolución dializada de proteína a una concentración aproximada entre 2 mg/mL y 4 mg/mL en el tampón acuoso. Se prepara una dilución de ésta de unos 20 mL en el mismo tampón de forma que la concentración de proteína esté en torno a  $30\text{ }\mu\text{M}$  (unos 0.2 mg/mL). También se descongelan las disoluciones necesarias de urea a las distintas concentraciones preparadas. Todas las disoluciones se termostatan en un baño a la temperatura a la que se deseen realizar los experimentos,  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  en nuestro caso.

A continuación se transfiere la muestra directamente a la jeringa correspondiente del instrumento (jeringa 3, de 5 mL de capacidad, de la Figura 3.5.2), filtrándola previamente a través de un filtro Millipore de  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Se procede de la misma forma con la disolución 9 M de urea, cargando esta vez la jeringa 1 del instrumento, de 20 mL de capacidad.

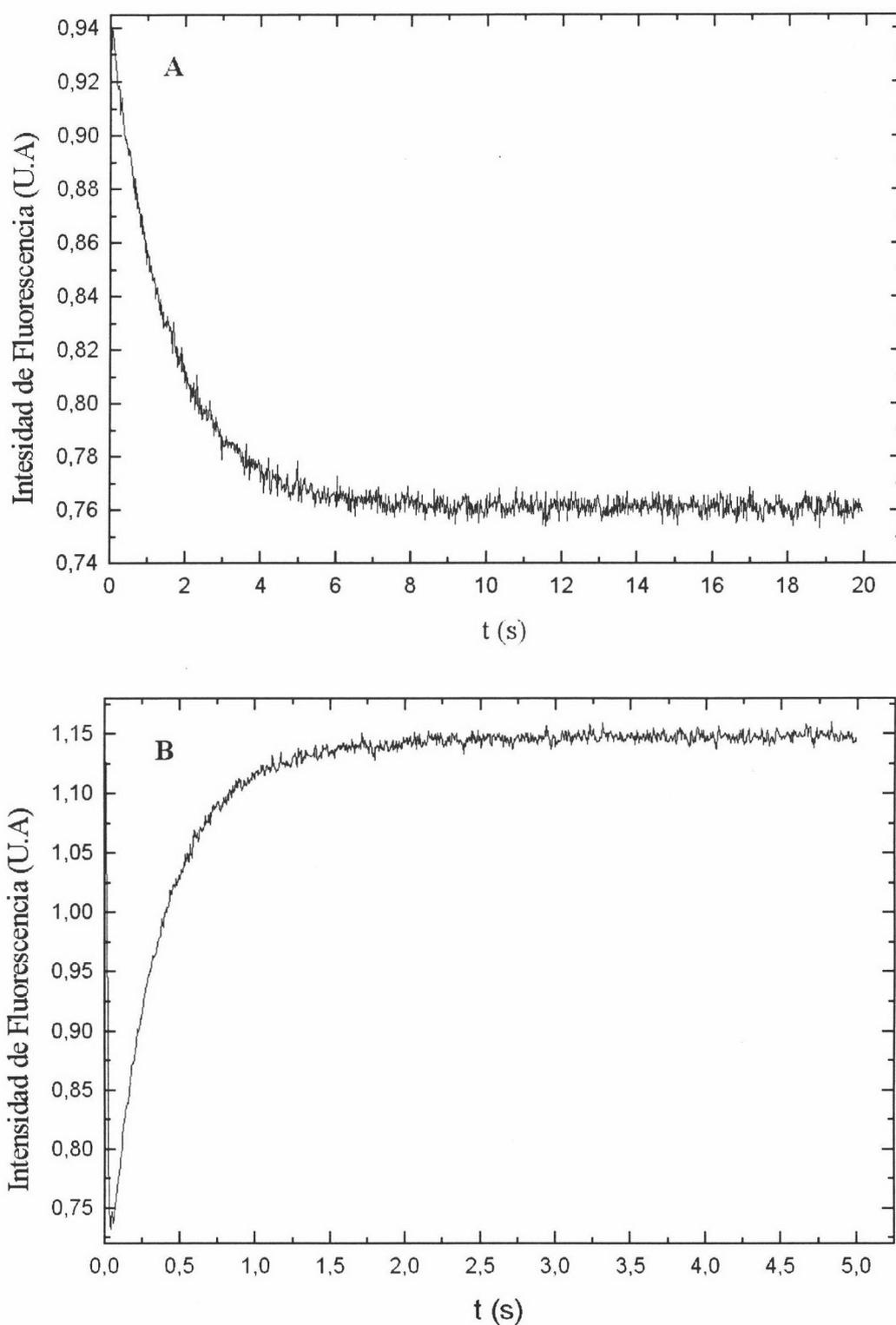
Antes de cargar las jeringas hay que proceder al lavado de los émbolos de ambas jeringas con un volumen pequeño de las disoluciones de llenado que se desecha. Seguidamente hay que cargar las jeringas evitando la acumulación de burbujas de aire que suelen traducirse en distorsiones en las medidas (cavitación). Para ello se selecciona la jeringa en cuestión y se mueve el émbolo en el modo manual en las direcciones de llenado y vaciado de la jeringa en repetidas ocasiones hasta comprobar que no quedan ni se producen burbujas cuando se vacía el compartimento.

Las disoluciones de ambas jeringas deben dejarse entonces termostatar dentro del sistema MPS-51 al menos 15 minutos.

Para construir el gráfico de Chevron (sección 3.5.9) hay que obtener las cinéticas de desplegamiento a diferentes concentraciones de urea. Cada una de las curvas obtenidas es el resultado de realizar un “disparo” o medida de una mezcla que contiene una concentración determinada de proteína y desnaturalizante. Es necesario, pues, diseñar una colección de estas mezclas que contengan diferentes concentraciones de urea, teniendo en cuenta que se necesita un volumen total de 200  $\mu\text{L}$  de disolución para llenar completamente la célula de medida y obtener una medida correcta del observable en cada cinética. Para el caso de cada una de las mezclas escogidas es necesario ajustar la escala de tiempo en función de la velocidad del proceso de desplegamiento para conseguir curvas de desplegamiento completas en las que pueda observarse claramente la evolución global del proceso y la región final correspondiente al “plateau” (Figura 3.5.3), de forma que el análisis posterior de la misma no conlleve la obtención de la constante de velocidad con un error considerable. Es preciso desechar unas cuantas medidas iniciales (por lo menos tres) para lavar y llenar los conductos y la célula de medida con las disoluciones cargadas en las jeringas. Esta operación asegura que la señal que se observa después del disparo corresponde exclusivamente a esa mezcla y no a una anterior. Después de esto, la curva cinética definitiva para una mezcla concreta será el resultado del promedio de 5 ó 6 curvas obtenidas en diferentes disparos, todas ellas comparables entre sí tanto en la forma como en la amplitud total de la señal de fluorescencia. Las mezclas utilizadas se presentan en la Tabla 3.5.1. Hay que notar que no todas las mezclas pueden utilizarse para cualquier mutante o proteína debido a la velocidad del proceso de desplegamiento, lo que da lugar en ocasiones a cinéticas tan rápidas que se producen en el intervalo del tiempo muerto del instrumento.

Una vez adquiridas las curvas cinéticas para una de las concentraciones de urea, por ejemplo la 9 M, se repite el proceso descrito anteriormente para el caso de las disoluciones preparadas de urea a concentraciones 8 M, 6 M y 4 M.

La concentración de las diferentes disoluciones de urea se determina a partir de las cantidades respectivas que sobran en la jeringa al final del experimento. Para ello se mide el índice de refracción correspondiente a cada caso, de la forma descrita en la sección 3.4.2. Es necesario medir también el índice de refracción de la disolución tampón en la que están preparadas estas disoluciones para utilizarlo como referencia en el cálculo de  $\Delta n$  y aplicar la ecuación descrita en la sección mencionada anteriormente.



**Figura 3.5.3:** Perfiles cinéticos del mutante Best5I25V del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina registrados a 25 °C. **A:** Cinética de desplegamiento de una mezcla formada por 48  $\mu\text{L}$  de la disolución conteniendo la proteína a concentración 30  $\mu\text{M}$  en tampón glicina 50 mM, pH 3.5 y 152  $\mu\text{L}$  de una disolución de urea 9 M en el mismo tampón. **B:** Cinética de plegamiento de una mezcla de 48  $\mu\text{L}$  de una disolución conteniendo la proteína a concentración 30  $\mu\text{M}$  en tampón glicina 50 mM, pH 3.5 y urea 9 M, y 152  $\mu\text{L}$  de tampón glicina 50 mM, pH 3.5.

**TABLA 3.5.1**

**VOLÚMENES ( $\mu\text{L}$ ) DE LAS DISOLUCIONES DE PROTEÍNA Y TAMPÓN QUE PUEDEN SER EMPLEADOS PARA PREPAR LAS MEZCLAS UTILIZADAS EN LA REALIZACIÓN DE LAS CINÉTICAS DE PLEGAMIENTO Y DESPLEGAMIENTO EN PRESENCIA DE UREA.**

MEZCLA	JERINGA 3 (proteína)	JERINGA 1 (tampón)	MEZCLA	JERINGA 3 (proteína)	JERINGA 1 (tampón)
1	100	100	13	52	148
2	96	104	14	48	152
3	92	108	15	44	156
4	88	112	16	40	160
5	84	116	17	36	164
6	80	120	18	32	168
7	76	124	19	28	172
8	72	128	20	24	176
9	68	132	21	20	180
10	64	136	22	16	184
11	60	140	23	12	188
12	56	144	24	8	192

A continuación, se realizan los experimentos para la obtención de las cinéticas en la dirección del plegamiento. Antes de experimentos para la obtención de las cinéticas en la dirección del plegamiento. Antes de comenzar, es preciso lavar y enjuagar repetidas veces las jeringas 1 y 3 (Figura 3.5.2) con el tampón con el que se rellenarán dichas jeringas.

Se parte de la disolución de proteína dializada igual que en el caso anterior y se diluye en el tampón de urea 9 M hasta obtener un volumen total de 6 mL con una concentración 30  $\mu\text{M}$  de proteína.

Se procede de la misma manera que en los experimentos de desplegamiento, con la diferencia de que ahora la jeringa 1 se carga con disolución tampón en las condiciones de la diálisis y la jeringa 3 se carga con la disolución de la proteína desnaturalizada en urea. Una cinética de plegamiento típica se muestra en la Figura 3.5.3.

Como en el caso anterior, es necesario medir al finalizar el experimento los índices de refracción de las disoluciones de proteína en urea y tampón, con los restos de disolución que quedan en las jeringas, para calcular las concentraciones de urea presentes en cada mezcla utilizada. En este caso  $\Delta n$  se calcula restando al índice de refracción de la disolución de la proteína en presencia de urea, el correspondiente a la proteína en el tampón.

Las mezclas empleadas en estos experimentos se resumen en la Tabla 3.5.1.

### 3.5.7 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES SEGÚN LA TEORÍA DEL ESTADO DE TRANSICIÓN

El estado de transición en el proceso de desplegamiento de una proteína que sigue el modelo de dos estados se define de forma sencilla como el punto de mayor energía a lo largo del camino que conduce del estado inicial (nativo) al estado final (desnaturalizado), en la representación de la energía de Gibbs en función de la coordenada de reacción. (Figura 3.5.4). En el caso de un proceso en el que se dé la presencia de intermedios, a cada uno de ellos le corresponde su propio estado de transición.

La reacción transcurre a través de una superficie de energía potencial que comprende una zona para el estado inicial y una zona para el estado final, separadas ambas por una barrera energética. La teoría del estado de transición (TET) supone que existe un equilibrio entre el estado de partida y el estado de transición ( $TS^\ddagger$ ) (Laidler & King, 1983):

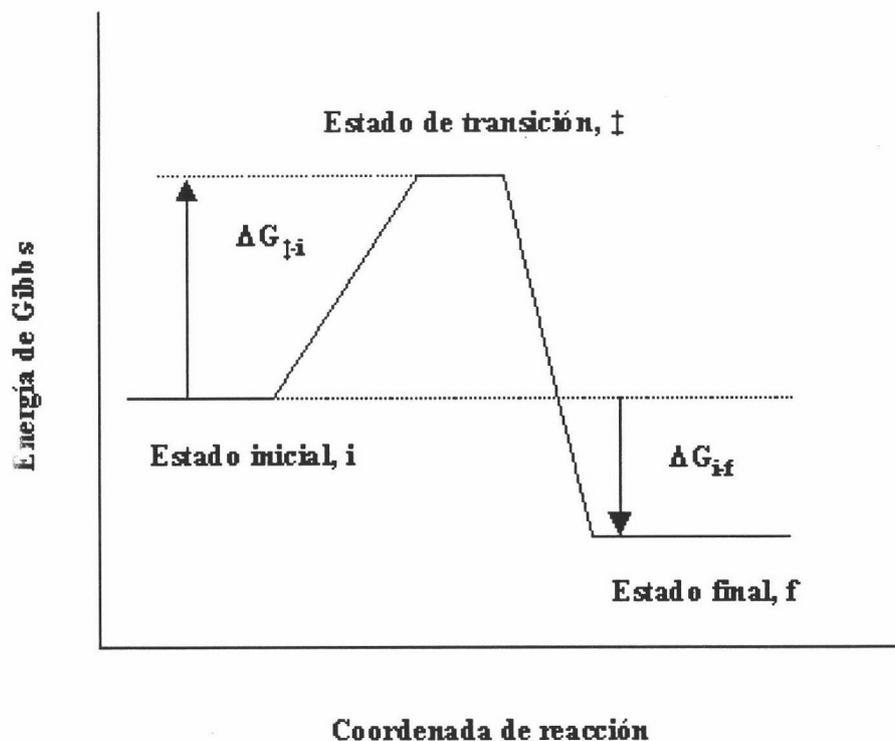


Por tanto, partiendo del estado nativo N de la proteína, existe un equilibrio entre este estado y el estado de transición  $[TS^\ddagger]$ , cuya constante de equilibrio sería  $K^\ddagger$ , mientras que el proceso cinético para llegar al estado desplegado D, es el que viene determinado por la constante de velocidad  $k_{\ddagger-N}$ . En el caso de partir del estado desplegado, la reacción, sería la siguiente:



Para llevar a cabo el desarrollo matemático de esta teoría hay que considerar otras suposiciones previas. En primer lugar, que todas las moléculas que cruzan la barrera energética llegan al estado final, ya que en esta situación dichas moléculas se encuentran en una zona descendente hasta llegar a dicho estado. En segundo lugar, que durante la reacción se mantiene la distribución de Boltzmann para las energías de las moléculas del estado inicial. Por último, también supone que las moléculas que cruzan la barrera de energía desde el estado de partida, tienen una distribución de Boltzmann de energías correspondiente a la temperatura del estado inicial. Con estas premisas, se obtiene la ecuación de Eyring:

$$k = (k_B \cdot T/h) \cdot K^\ddagger \quad (3.5.1)$$



**Figura 3.5.4:** Teoría del estado de transición. El estado de transición es el correspondiente al estado de mayor energía a lo largo de la ruta que conduce del estado inicial al estado final. La altura de la barrera de energía del estado de transición determina la magnitud de la constante de velocidad medida.

donde  $k$  representa la constante de velocidad  $k_{\ddagger-N}$  ó  $k_{\ddagger-D}$  según los dos casos descritos,  $k_B$  es la constante de Boltzman,  $h$  es la constante de Planck y  $T$  es la temperatura absoluta. La constante  $K^\ddagger$  representa la constante del equilibrio químico que tiene lugar entre el estado inicial (D ó N) y el estado de transición ( $[TS^\ddagger]$ ). En un sentido riguroso, este equilibrio implica que en el estado de transición existirá un número de moléculas, algunas de las cuales, después de un tiempo determinado evolucionarán para pasar al estado final, con una constante de velocidad  $k$ , mientras que otras volverán al estado de inicial. Sin embargo, este equilibrio no puede interpretarse de esta manera, ya que el estado de transición,  $[TS^\ddagger]$ , no es un estado en el que la molécula exista realmente y pueda ser aislado. Tan solo implica a aquellas moléculas que pasan la barrera energética desde el estado inicial y, según se ha indicado anteriormente, todas las que lo consiguen pasan al estado final, con lo que el estado de transición no puede dar lugar a una auténtica reacción de equilibrio químico con el estado inicial sea éste cualquiera de los dos posibles en los que la proteína existe (D ó N).

Sabiendo que la energía de Gibbs del proceso de activación puede expresarse también como:

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \cdot \Delta S^\ddagger = -R \cdot T \cdot \ln K^\ddagger \quad (3.5.2)$$

siendo R la constante de los gases, sustituyendo en la ecuación de Eyring (3.5.1) se obtendría:

$$k = (k_B \cdot T/h) \cdot \exp(-\Delta G^\ddagger / R \cdot T) \quad (3.5.3)$$

de donde:

$$k = (k_B \cdot T/h) \cdot \exp(\Delta S^\ddagger / R) \cdot \exp(-\Delta H^\ddagger / R \cdot T) \quad (3.5.4)$$

### 3.5.8 DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE LAS CONSTANTES DE VELOCIDAD

Las constantes de velocidad para los procesos estudiados de plegamiento y despleamiento se calculan a partir del ajuste no lineal a una ecuación monoexponencial de las curvas obtenidas, correspondientes a una concentración de urea determinada, dado que el proceso cinético puede ser considerado de primer orden. Para ello se utiliza programa Bio-Kine de la casa comercial Biologic.

El observable físico seguido en nuestro caso fue la intensidad de fluorescencia, según se describe en la sección 3.5.1, por lo que el cálculo de la constante de velocidad para una concentración de urea determinada viene descrito por la siguiente ecuación monoexponencial de velocidad:

$$I_t = \Delta I_u \cdot \exp(-k \cdot t) \quad (3.5.5)$$

donde k es la constante de velocidad  $k_{\ddagger-N,urea}$  ó  $k_{\ddagger-D,urea}$  según se trate de los procesos de despleamiento o plegamiento respectivamente a una concentración dada de urea y  $\Delta I_u$  es la amplitud de la exponencial, asociada al cambio total de fluorescencia que ocurre durante el proceso cinético, a esa misma concentración de urea. Los valores de  $\Delta I_u$  se calculan a partir de la diferencia entre los valores de intensidad de fluorescencia de la muestra al comienzo y final de la curva cinética estudiada en la dirección de despleamiento y de plegamiento respectivamente. Una cinética de despleamiento como la que se representa en la Figura 3.5.3 presenta un valor de  $\Delta I_u$  mayor que cero, debido a la disminución de la intensidad de fluorescencia con el tiempo. Por el contrario, en una cinética de plegamiento (Figura 3.5.3)  $\Delta I_u$  toma valores negativos por el aumento de la señal con el tiempo.

Por consiguiente, para cada una de las curvas de las cinéticas de plegamiento y despleamiento, obtendremos el valor de la amplitud  $\Delta I_u$  y el de la constante de velocidad

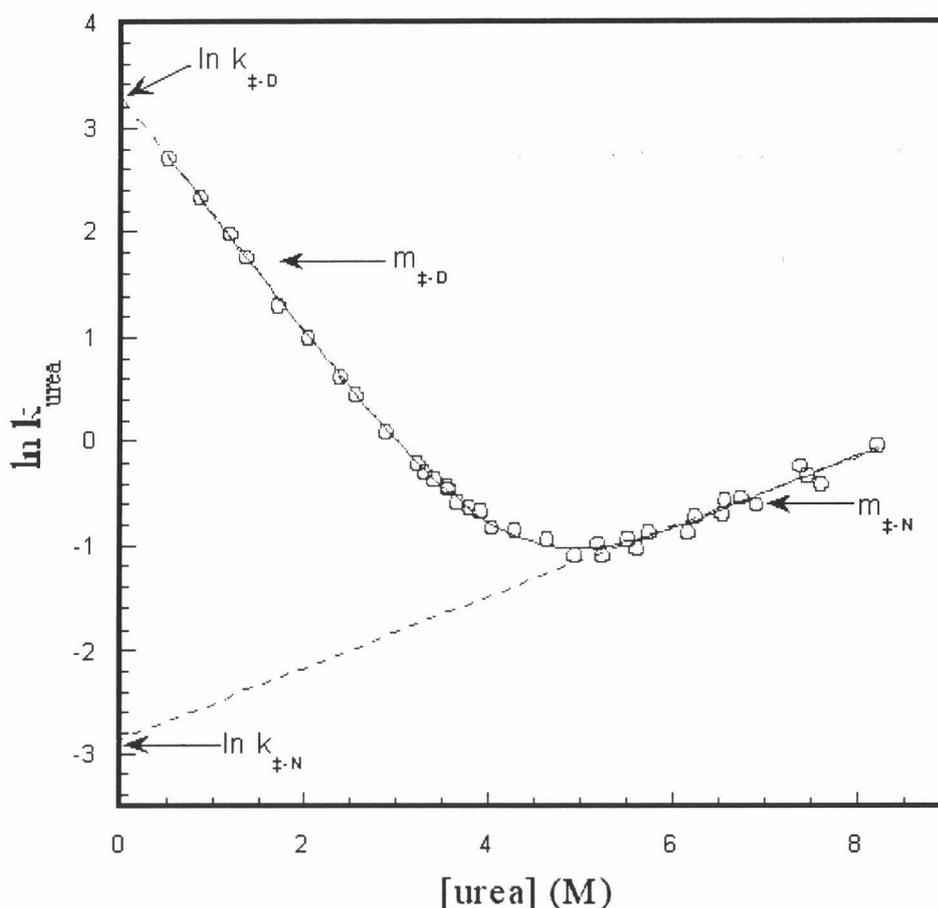
correspondiente, en  $s^{-1}$ . Es muy importante para determinar de forma correcta estos parámetros, especialmente las constantes de velocidad, estudiar el gráfico de las desviaciones de residuos de los datos experimentales sobre la curva resultante del análisis monoexponencial. La amplitud promedio de los puntos obtenidos de dicho gráfico debe ser muy próxima a cero y es un indicador del grado en que la ecuación aplicada es válida para la descripción de los datos experimentales. Las desviaciones del gráfico de los residuos dependen en gran medida de la corrección del modelo cinético utilizado.

En el caso del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina estudiado en esta memoria se observan dos fases cinéticas en la reacción de plegamiento: una rápida, que se completa en menos de 5 s y una fase lenta independiente de la concentración de urea y con una constante de aproximadamente  $0.02 s^{-1}$ . Esta fase lenta constituye alrededor del 4 % de la amplitud total de fluorescencia y es debida a la isomerización de las prolinas en las posiciones 20 y 54 (Viguera et al., 1994b) y no se considerará en el análisis de los datos.

### 3.5.8 GRÁFICOS DE CHEVRON

Cuando representamos en un gráfico, a una temperatura dada, la dependencia entre el logaritmo de las constantes de velocidad aparentes obtenidas a cada concentración de urea en función de ésta obtenemos un gráfico de Chevron, como el que se muestra en la Figura 3.5.5. Existen en la literatura numerosos estudios que detallan el análisis de este tipo de representación (Martínez et al., 1999; Ibarra-Molero & Sánchez-Ruiz, 1996; Chen et al., 1992; Chen et al., 1989 a y b; Perry et al., 1989; Hurle et al., 1987; Matthews & Hurle, 1987; Beasty et al., 1986).

En un gráfico de Chevron (Figura 3.5.5) el mínimo corresponde al punto en el que se cumple que  $k_{\ddagger-N,urea} = k_{\ddagger-D,urea}$ . A partir de este mínimo puede definirse el valor  $[urea]_{1/2}$  como la concentración de urea en la que se cumple que el cambio de energía libre de Gibbs se iguala a cero. A altas concentraciones de desnaturalizante (rama de la derecha de la curva de la Figura 3.5.5), cuando se produce el fenómeno de desplegamiento de la proteína, la constante que se mide es  $k_{\ddagger-N,urea}$ . A la pendiente de dicha rama se la define como  $m_{\ddagger-N}$ . De la extrapolación de esta rama hasta igualar la concentración de urea al valor cero, se puede calcular el valor de la constante en agua:  $k_{\ddagger-N}$ . A bajas concentraciones de desnaturalizante (rama de la izquierda de la Figura 3.5.5), en la reacción de plegamiento de la proteína, se mide  $k_{\ddagger-D,urea}$ , correspondiendo el valor de la pendiente de dicha rama al parámetro que llamaremos



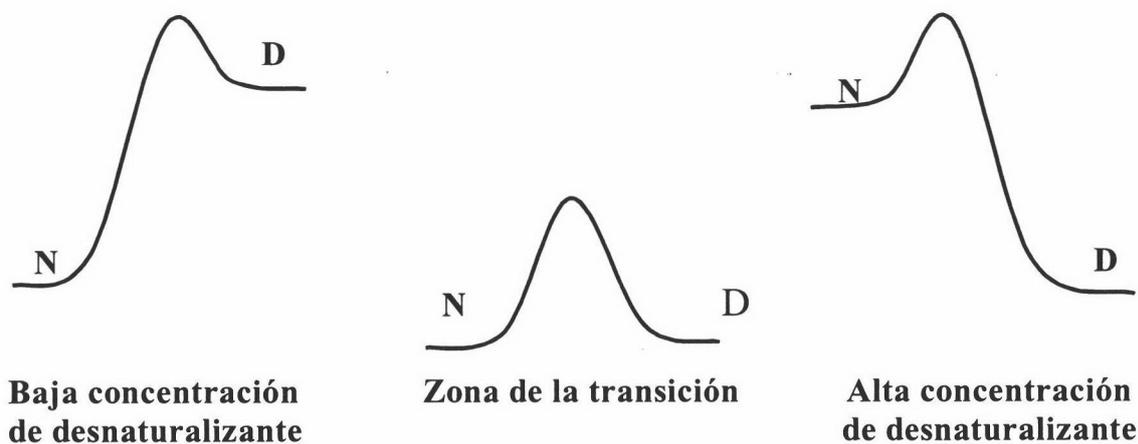
**Figura 3.5.5:** Gráfico Chevron de Best5I25V realizado a 25 °C, en tampón glicina 50 mM, pH 3.5 en el que se observan las ramas de desplegamiento (izquierda) y plegamiento (derecha) y la zona de la transición (mínimo de la curva). Los símbolos representan los datos obtenidos experimentalmente a partir de la realización de experimentos cinéticos en las direcciones de plegamiento y desplegamiento, analizados según la ecuación 3.5.5. La línea continua corresponde al análisis realizado mediante la ecuación 3.5.11.

$m_{\text{‡-D}}$ . En este caso, también se puede obtener por extrapolación el valor de la constante de velocidad en ausencia de urea, cuando se cumple que  $[\text{urea}] = 0$ . Dicho valor se representa como  $k_{\text{‡-D}}$ . En la Figura 3.5.6 se presenta un esquema en el que se distinguen estos procesos predominantes existentes en cada una de las ramas del Chevron.

La ecuación matemática general que describe ambas ramas del gráfico de Chevron se deduce a partir de la relación  $k_{\text{urea}} = k_{\text{‡-N,urea}} + k_{\text{‡-D,urea}}$ , de forma que:

$$\ln k_{\text{urea}} = \ln (k_{\text{‡-N,urea}} + k_{\text{‡-D,urea}}) \quad (3.5.6)$$

La dependencia lineal de  $\ln k([\text{urea}])$  con la concentración de urea que se observa en las dos ramas del gráfico de Chevron, implica una dependencia lineal de la energía de Gibbs de activación con dicha concentración, según la ecuación de Eyring definida en esta sección



**Figura 3.5.6:** Diagramas de energía relativos a los estados nativo, desplegado y de transición, representados de forma simplificada, para el caso hipotético de una proteína que despliega siguiendo el modelo de dos estados. A baja concentración de desnaturalizante (rama de la izquierda del gráfico de Chevron) el estado energéticamente más favorecido es el nativo. A alta concentración de desnaturalizante, (rama de la derecha del gráfico de Chevron), por el contrario, el estado más favorecido es el desnaturalizado. En la región del estado de transición (mínimo del gráfico de Chevron) las constantes de velocidad de los procesos de plegamiento y desplegamiento se igualan entre sí.

(ecuación 3.5.1). Las expresiones generales que relacionan  $k_{\ddagger-N,urea}$  y  $k_{\ddagger-D,urea}$  con la concentración de urea son las siguientes:

$$\ln k_{\ddagger-N,urea} = \ln k_{\ddagger-N} + m_{\ddagger-N} \cdot [urea] \quad (3.5.7)$$

$$\ln k_{\ddagger-D,urea} = \ln k_{\ddagger-D} + m_{\ddagger-D} \cdot [urea] \quad (3.5.8)$$

Con estas dos relaciones y la ecuación 3.5.6, la expresión global que define el gráfico de Chevron es la siguiente:

$$\ln k_{urea} = \ln [(k_{\ddagger-D} \cdot \exp(m_{\ddagger-D} \cdot [urea]) + k_{\ddagger-N} \cdot \exp(m_{\ddagger-N} \cdot [urea]))] \quad (3.5.9)$$

Por otra parte, se demostró en el caso concreto del estudio experimental con mutantes inestables del dominio SH3 que el cambio del logaritmo neperiano de la constante de velocidad para el proceso de desplegamiento,  $k_{\ddagger-N,urea}$ , frente a la concentración de urea en el gráfico de Chevron no es lineal y muestra una cierta curvatura a altas concentraciones de urea (Martínez et al., 1998; Prieto et al., 1997; Viguera et al., 1996b). Por otra parte, Matouschek & Fersht (1993) y Johnson & Fersht (1995), mostraron un fenómeno similar en el caso de la

proteína barnasa. Esta curvatura, en el caso de los mutantes inestables de SH3 se describe por la siguiente ecuación:

$$\ln k_{\ddagger-N,urea} = \ln k_{\ddagger-N} + m_{\ddagger-N} \cdot [urea] - 0.014 \cdot [urea]^2 \quad (3.5.10)$$

El último término del segundo miembro de esta ecuación mejora la calidad del ajuste y no tiene ningún soporte teórico, habiendo sido obtenido como un valor promedio de las medidas experimentales (Prieto et al., 1997). A partir de aquí, la ecuación de la curva completa del gráfico de Chevron queda escrita de la siguiente forma:

$$\ln k_{urea} = \ln (k_{\neq D} \cdot \exp (m_{\neq D} \cdot [urea])) + k_{\neq N} \cdot \exp (m_{\neq N} \cdot [urea] - 0.014 \cdot [urea]^2) \quad (3.5.11)$$

### 3.5.10 APLICACIÓN DEL MÉTODO DE INGENIERÍA DE PROTEÍNAS PARA LA CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL ESTADO DE TRANSICIÓN

Mediante el método de ingeniería de proteínas (Fersht, 1995) que se describirá a continuación, es posible determinar, usando los valores de las constantes de velocidad determinadas a partir de los gráficos de Chevron, las energías de interacción que se producen en la molécula de proteína en su estado de transición, correspondiente a su reacción de desnaturalización. La idea básica de este análisis está en determinar la extensión en que una determinada interacción, que existe en el estado nativo, se encuentra presente en el estado de transición. En la práctica, esto se lleva a cabo realizando una mutación del aminoácido en cuestión por otro de cadena lateral más corta, con el objeto de eliminar esa determinada interacción. Con relación a esto, es necesario a priori presuponer que la mutación realizada no alterará la ruta de plegamiento, que no cambiará las estructuras de los estados nativo y desnaturalizado y que la nueva cadena lateral no introducirá nuevas interacciones. Esta mutación introducida va a producir diferencias en el comportamiento cinético entre la especie mutada y la especie natural, permitiendo estas diferencias determinar la relevancia de dicha interacción en el estado de transición.

Desde un punto de vista experimental, el parámetro que determina el grado de formación de cada interacción en el estado de transición se denomina  $\Phi_{\ddagger-D}$ , y se define como el cociente entre la diferencia en el cambio de energía libre de Gibbs debido al proceso de plegamiento y el de equilibrio, establecido entre la especie de referencia y la especie mutada en esa determinada interacción (Fersht, 1995):

$$\Phi_{\ddagger-D} = \Delta\Delta G_{\ddagger-D} / \Delta\Delta G_{N-D} \quad (3.5.12)$$

En primer lugar, para determinar el valor de  $\Delta\Delta G_{\ddagger-D}$  hay que tener en cuenta que las constantes cinéticas medidas experimentalmente para los procesos de plegamiento y desplegamiento pueden expresarse en función de cambios en la energía de Gibbs. Para ello, se despeja el valor de  $K^\ddagger$  de la ecuación 3.5.1 y se sustituye en la ecuación 3.5.3, dando lugar a la expresión general:

$$\Delta G^\ddagger = -R \cdot T \cdot \ln(k \cdot h / k_B \cdot T) \quad (3.5.13)$$

$$\Delta G^\ddagger = -R \cdot T (\ln k - \ln(h / k_B \cdot T))$$

En el caso del proceso de plegamiento, y siguiendo la ecuación anterior, podemos escribir las expresiones correspondientes para la especie de referencia y el mutante,  $(\Delta G_{\ddagger-D})_{ref}$  y  $(\Delta G_{\ddagger-D})_{mut}$ , como:

$$(\Delta G_{\ddagger-D})_{ref} = -R \cdot T \cdot \ln(k_{\ddagger-D,ref} - \ln(h / k_B \cdot T)) \quad (3.5.14)$$

$$(\Delta G_{\ddagger-D})_{mut} = -R \cdot T \cdot \ln(k_{\ddagger-D,mut} - \ln(h / k_B \cdot T)) \quad (3.5.15)$$

donde  $k_{\ddagger-D,ref}$  y  $k_{\ddagger-D,mut}$  se refieren a los valores calculados como se detalla en la sección 3.5.9 para  $k_{\ddagger-D}$  en el caso de la especie como referencia (ref) y del mutante de la misma (mut) respectivamente.

A partir de las dos ecuaciones anteriores, el valor de  $\Delta\Delta G_{\ddagger-D}$  se expresa de la siguiente forma:

$$\Delta\Delta G_{\ddagger-D} = (\Delta G_{\ddagger-D})_{ref} - (\Delta G_{\ddagger-D})_{mut} = -R \cdot T \cdot \ln(k_{\ddagger-D,ref} / k_{\ddagger-D,mut}) \quad (3.5.16)$$

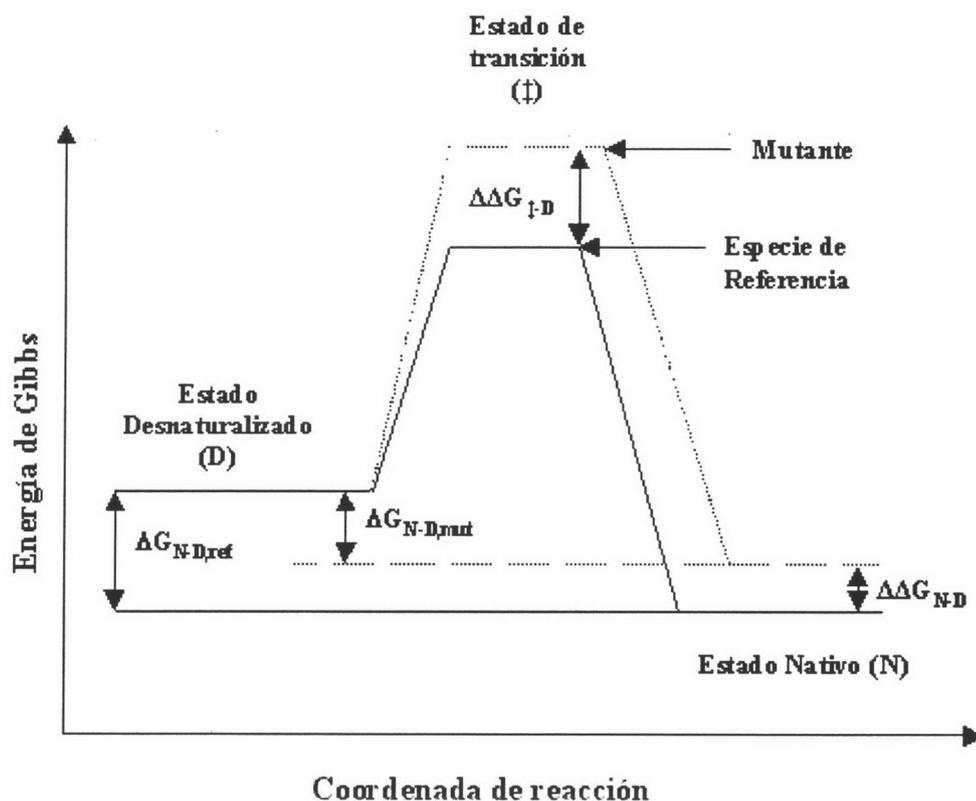
En el caso del proceso de desplegamiento, el cambio en la energía del estado de transición entre la especie de referencia y el mutante relativo al estado nativo,  $\Delta\Delta G_{\ddagger-N}$ , se expresa igualmente como:

$$\Delta\Delta G_{\ddagger-N} = (\Delta G_{\ddagger-N})_{ref} - (\Delta G_{\ddagger-N})_{mut} = -R \cdot T \cdot \ln(k_{\ddagger-N,ref} / k_{\ddagger-N,mut}) \quad (3.5.17)$$

En esta ecuación, los valores de  $(\Delta G_{\ddagger-N})_{ref}$  y  $(\Delta G_{\ddagger-N})_{mut}$  guardan relaciones equivalentes a las definidas en las ecuaciones 3.5.14 y 3.5.15 mientras que  $k_{\ddagger-N,ref}$  y  $k_{\ddagger-N,mut}$  corresponden a las constantes de velocidad  $k_{\ddagger-N}$  calculadas en la sección 3.5.9 para la referencia (ref) y el mutante (mut) respectivamente.

En segundo lugar, el valor de la energía de desestabilización inducida por la mutación,  $\Delta\Delta G_{N-D}$ , se define en función del cambio de energía de Gibbs entre el estado nativo y el desnaturalizado para la referencia y el mutante, como:

$$\Delta\Delta G_{N-D} = (\Delta G_{N-D})_{ref} - (\Delta G_{N-D})_{mut} = \Delta\Delta G_{\ddagger-D} - \Delta\Delta G_{\ddagger-N} \quad (3.5.18)$$



**Figura 3.5.7:** Diagrama de energías de Gibbs correspondiente a un caso hipotético de una proteína y un mutante de la misma que desnaturalizan siguiendo el modelo de dos estados y presentan, por tanto, un único estado de transición. Los parámetros señalados en este esquema se describen en el texto y permiten realizar el análisis de  $\Phi$ .

En la Figura 3.5.7 se muestra gráficamente el valor de dicha energía.

A partir de las definiciones dadas para las funciones anteriores se deduce que éstas pueden calcularse mediante los datos cinéticos experimentales. El parámetro  $\Phi_{‡-D}$ , calculado según la ecuación 3.5.12, representa la pérdida de energía en el estado de transición relativa al estado nativo, inducida por una mutación puntual en la proteína.

A su vez, podemos expresar este parámetro en función del cambio de energía en el estado de transición respecto al estado desplegado debida a dicha mutación, como:

$$\Phi_{‡-N} = \Delta\Delta G_{‡-N} / \Delta\Delta G_{N-D} \quad (3.5.19)$$

De esta forma,  $\Phi_{‡-D}$  se relaciona con el valor de  $\Phi_{‡-N}$  mediante la expresión:

$$\Phi_{‡-D} = 1 - \Phi_{‡-N} \quad (3.5.20)$$

De esta última expresión se deduce fácilmente que los valores de  $\Phi_{‡-D}$  y  $\Phi_{‡-N}$  están comprendidos entre 0 y 1. Existe una relación entre  $\Phi_{‡-D}$  y el grado de formación de estructura

durante el plegamiento de forma que el valor de dicho parámetro puede informar sobre el estado de plegamiento de la región que envuelve a la cadena lateral del resto mutado, esto es, si está completamente plegada, parcialmente plegada o desplegada en el estado de transición. Así, teniendo en cuenta que ha de cumplirse que  $0 \leq \Phi_{\ddagger-D} \leq 1$  se pueden encontrar las siguientes situaciones según el valor calculado para  $\Phi_{\ddagger-D}$  (Fersht, 1995):

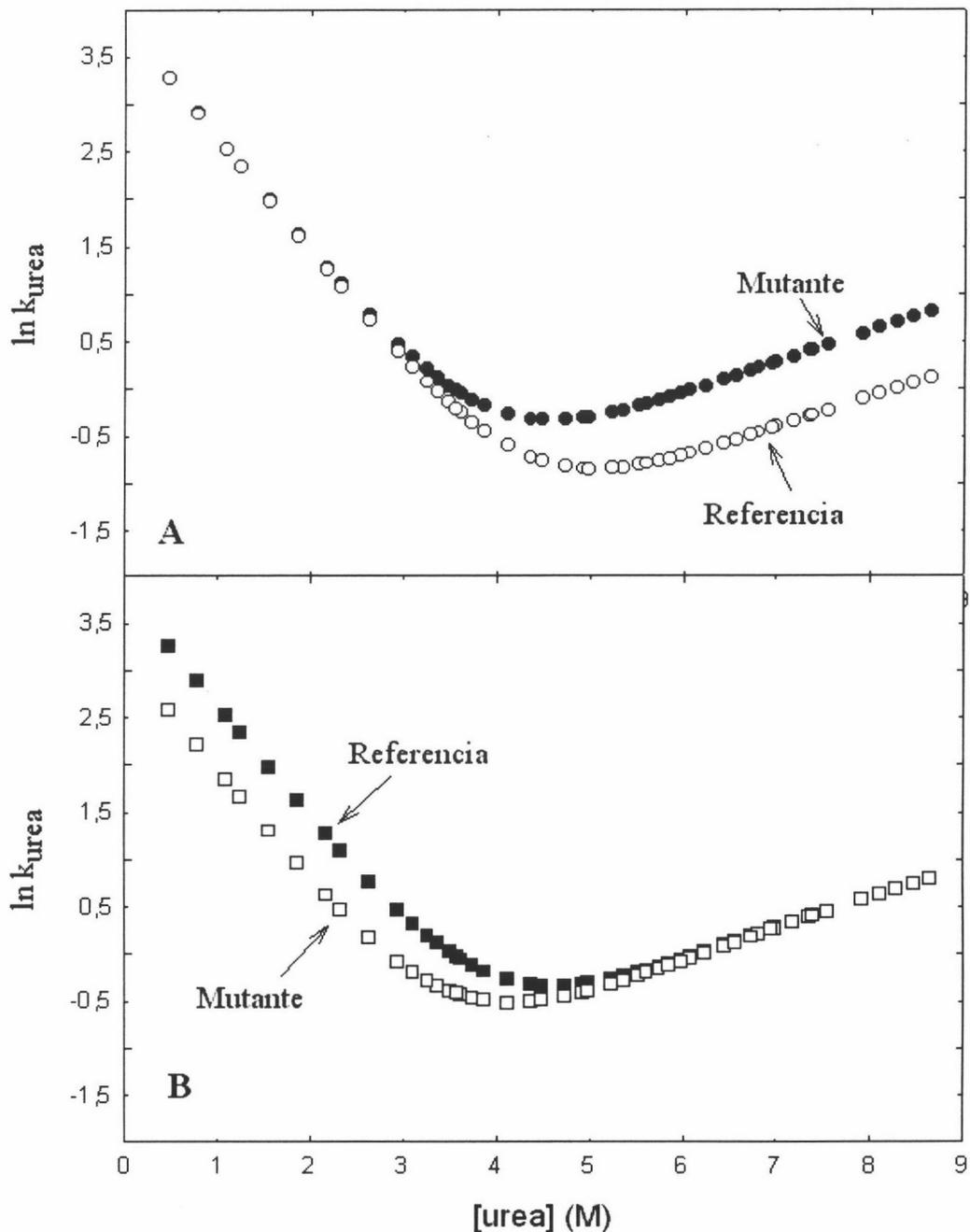
En primer lugar, si  $\Phi_{\ddagger-D} = 0$  (ó  $\Phi_{\ddagger-N} = 1$ ) en la ecuación 3.5.12 se cumple que  $\Delta\Delta G_{\ddagger-D} = 0$  y si esto es así, según la ecuación 3.5.16 se da que  $k_{\ddagger-D,ref} = k_{\ddagger-D,mut}$ . Según esta última relación, se observará en el gráfico Chevron correspondiente que las ramas de plegamiento de la referencia y mutante coinciden, indicando que la mutación no afecta a la cinética de plegamiento (Figura 3.5.8, panel A) y por tanto, la interacción que implica la mutación no estará involucrada en la formación del estado de transición. Es decir, la región de la proteína que contiene la mutación está completamente desplegada en el estado de transición.

En segundo lugar, si  $\Phi_{\ddagger-D} = 1$  (ó  $\Phi_{\ddagger-N} = 0$ ) según la relación (3.5.20), se obtiene que  $\Phi_{\ddagger-N} = 0$  y si esto es así, en la ecuación 3.5.19 se cumple que  $\Delta\Delta G_{\ddagger-N} = 0$ . Según esto, en la ecuación 3.5.17 se tiene que dar que  $k_{\ddagger-N,ref} = k_{\ddagger-N,mut}$ .

Esto último implica que en los gráficos Chevron del mutante y la referencia las ramas del desplegamiento coinciden, es decir, que la mutación afecta exclusivamente a las cinéticas de plegamiento cuyas constantes,  $k_{\ddagger-D,ref}$ ,  $k_{\ddagger-D,mut}$  adquieren valores distintos y sus ramas no coinciden (Figura 3.5.8, panel B). Dicho de otra forma, en este caso la región de la proteína que contiene la mutación está expuesta al solvente en igual extensión en los estados de transición y desnaturalizado (está completamente desplegada en estos dos estados) tanto en el mutante como en la referencia. Es decir, la interacción está igualmente presente en el estado de transición y en el estado nativo.

Puede ser posible también que  $\Phi_{\ddagger-D}$  adopte valores intermedios entre los dos límites descritos:  $0 < \Phi_{\ddagger-D} < 1$ . A pesar de que la relación entre  $\Phi_{\ddagger-D}$  y la formación de la estructura a lo largo de la ruta de plegamiento no sigue una dependencia de tipo lineal, puede decirse que valores elevados de  $\Phi_{\ddagger-D}$  indican que la estructura está prácticamente formada aunque no estén presentes todas las interacciones existentes en el estado nativo. La interpretación de los valores intermedios de  $\Phi_{\ddagger-D}$  resulta compleja, debido a la existencia de una serie de razones que dan lugar a que este parámetro adopte valores comprendidos en el intervalo anteriormente definido (Fersht, 1994a). Algunas de estas causas se resumen a continuación:

En primer lugar, la formación de interacciones de carácter débil de tipo no covalente en un único estado o la existencia de rutas de plegamiento paralelas que dan lugar a una



**Figura 3.5.8:** Gráficos Chevron del caso hipotético de una proteína (referencia) y un mutante de la misma. **A.**  $\Phi_{\neq D} = 0$  ( $\Phi_{\neq N} = 1$ ). En este caso las ramas de la cinética en la dirección de plegamiento de la referencia (círculos rellenos) y del mutante (círculos huecos) coinciden ( $k_{\neq D,ref} = k_{\neq D,mut}$ ) indicando que no ha tenido lugar formación de la interacción involucrada en el estado de transición respecto al estado desplegado (es decir, que hay una completa ruptura de la estructura en el estado de transición respecto al estado nativo). **B.**  $\Phi_{\neq D} = 1$  ( $\Phi_{\neq N} = 0$ ). Las ramas de desplegamiento de la referencia (cuadrados negros) y mutante (cuadrados huecos) coinciden cumpliéndose que  $k_{\neq N,ref} = k_{\neq N,mut}$ . En tal caso, la mutación afecta exclusivamente a la cinética de plegamiento, indicando que la interacción involucrada está igualmente presente en el estado de transición y en el nativo (es decir, existe una completa formación de la estructura en el estado de transición respecto al estado desnaturalizado).

mezcla de estados de transición, en algunos de los cuales las interacciones están completamente formadas mientras que en otros no. Como ejemplo se encuentra el caso del inhibidor de quimiotripsina CI-2. Realizando una serie de mutaciones en los mismos elementos de estructura, se ha comprobado que estos valores intermedios de  $\Phi_{\neq D}$  no resultan de rutas paralelas de plegamiento con una mezcla de estados de transición, unos completamente formados y otros desplegados, sino de la formación de interacciones débiles en un único estado de transición (Martínez & Serrano, 1999; Fersht et al., 1994b; Otzen et al., 1994).

Otra causa posible de los valores intermedios de  $\Phi_{\ddagger-D}$  pueden deberse a que la cadena lateral del aminoácido mutado es capaz de interactuar con diferentes partes de la estructura, que a su vez siguen distintas rutas de desplegamiento (Serrano et al., 1992; Matouscheck et al., 1992).

En tercer lugar, puede producirse una distorsión en la estructura del mutante en el estado plegado que varía en el estado de transición, dando lugar a una nueva contribución a la energía de Gibbs introducida por la mutación y debida a esta reorganización en la estructura. La existencia de estos artefactos se comprobó mediante el análisis de una serie de mutaciones en una región determinada de la proteína barnasa, llegando a la conclusión de que en el estado de transición de su ruta de desplegamiento los valores de  $\Phi_{\ddagger-D}$  varían gradualmente dentro del intervalo en el que ha definido este parámetro, en función a la región donde estén situados dichos residuos (Fersht, 1993).

Además de los casos descritos hasta el momento sobre los valores que  $\Phi_{\ddagger-D}$  (ó  $\Phi_{\ddagger-N}$ ) puede tomar, hay que añadir que valores negativos de este parámetro (ó valores por encima de 1 de  $\Phi_{\ddagger-N}$ ) implican que  $\Delta\Delta G_{\ddagger-D} > \Delta\Delta G_{N-D}$  indicando que la mutación estabiliza el estado de transición, desestabilizando el estado nativo y, más aun, que la cadena lateral del resto involucrado en la mutación está originando contactos en el estado de transición que no tienen lugar en el estado nativo (contactos no nativos).

### **3.6 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO**

#### **3.6.1 FUNDAMENTOS DE LA CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO**

La calorimetría diferencial de barrido (CDB) es actualmente la técnica más completa para caracterizar la energética del plegamiento-desplegamiento de las proteínas. En general, con esta técnica se estudian los cambios conformacionales inducidos por la temperatura en proteínas, ácidos nucleicos y biomembranas. Entre las referencias que destacan los aspectos más importantes de la CDB aplicada a proteínas se encuentran las siguientes: Sánchez-Ruiz, 1995; Cooper et al., 1994 a y b; Freire et al., 1990; Chowdy y Cole, 1989; Privalov, 1989, 1982, 1979; Sánchez-Ruiz y Mateo, 1987; Sturtevant, 1987; Mateo, 1984; así como diversas tesis realizadas en este departamento (García-Mira, 2001; Fernández, 2000; Sadqi, 2000; Ibarra-Molero, 1998; Azuaga, 1995; Martínez, 1995; Conejero-Lara 1993; Ruiz-Sanz 1990).

Un experimento de calorimetría diferencial de barrido consiste en registrar la capacidad calorífica aparente de una disolución de macromolécula en función de la temperatura, obteniendo un *termograma*. El posterior análisis de la capacidad calorífica basándonos en la termodinámica del equilibrio puede proporcionar la caracterización completa del proceso de plegamiento- desplegamiento de una proteína, por ejemplo, lo que permite obtener la capacidad calorífica parcial absoluta del sistema y los parámetros termodinámicos asociados, tales como el cambio de entalpía,  $\Delta H_D$ , de entropía,  $\Delta S_D$ , de energía de Gibbs,  $\Delta G_D$ , y de capacidad calorífica,  $\Delta C_p$ , correspondiente a la transición inducida por la temperatura, así como la función de partición y la población de los estados predominantes en los que se encuentra el sistema y sus parámetros termodinámicos característicos.

#### **3.6.2 INSTRUMENTACIÓN**

A lo largo de las tres últimas décadas, se ha llevado a cabo un destacado desarrollo de la instrumentación necesaria en los estudios mediante CDB, debido al enorme interés que ha despertado el estudio termodinámico de los sistemas biológicos, particularmente proteínas y polinucleótidos. Esto ha permitido, en comparación con los primeros instrumentos diseñados, poder utilizar pequeños volúmenes de muestra y trabajar con disoluciones acuosas de biomoléculas a muy baja concentración (en el orden de 1 mg/mL). Además de esto, se

encuentra el hecho de que la pequeña magnitud de los calores puestos en juego requiere de una alta sensibilidad que permita medirlos con la suficiente precisión.

Los microcalorímetros que se utilizan tienen características comunes. En primer lugar, la medida de la capacidad calorífica se lleva a cabo de forma continua, calentando o enfriando la muestra a velocidad constante, y diferencial, (de ahí el nombre de microcalorímetro diferencial de barrido) midiendo la diferencia de capacidad calorífica entre dos células lo más parecidas posible que contienen la disolución de biomolécula objeto del estudio y la disolución de referencia. Esta forma de operar permite automatizar el proceso de medida y obtener una información más precisa de la función de capacidad calorífica.

Cuando se comienza un barrido se suministra a dos resistencias eléctricas, que están íntimamente asociadas a la superficie de cada una de las células, la misma intensidad de corriente, cuyo valor se fija a través de la velocidad de barrido seleccionada. La medida de la diferencia de capacidad calorífica entre las dos células se lleva a cabo mediante un método de compensación simétrica. Este método consiste en que cuando se produce algún efecto térmico, por ejemplo la desnaturalización de una proteína o la fusión de una bicapa lipídica, se produce una diferencia de temperatura entre las células, detectada por la termopila que está en contacto íntimo con ellas. En ese momento, la termopila suministra una señal eléctrica proporcional que va a incrementar, a través de un sistema regulador, la potencia que recibe la célula de menor temperatura. De esta forma, la diferencia de temperatura entre la célula de referencia y la de muestra se anula gracias a un mecanismo de retroalimentación, manteniéndose una velocidad de barrido constante. La diferencia de potencia que se debe aplicar a la célula de muestra para que la diferencia de temperatura entre ambas células sea igual a cero en cualquier momento es la magnitud que se sigue continuamente en función de la temperatura, de forma que esta potencia eléctrica diferencial que suele expresarse como  $\mu\text{W} = \mu\text{J/s}$  ó  $\mu\text{cal/s}$ , es directamente proporcional a la diferencia de capacidad calorífica que existe entre las dos células (en  $\mu\text{J/grad}$  ó  $\mu\text{cal/grad}$ ) siendo así constante la velocidad de barrido (grado/s).

Todos los estudios de CDB descritos en esta memoria se han realizado en un VP-DSC de Microcal Inc. USA adquirido recientemente por nuestro grupo de investigación. Este modelo, comparado con el resto de los sistemas de CDB que ofrece el mercado actualmente, representa un avance en la sensibilidad, reproducibilidad, estabilidad, mejora de la adiabaticidad y facilidad en el manejo. Se ha logrado también una mejora significativa en la relación señal-ruido de un orden de magnitud respecto a instrumentos de generaciones

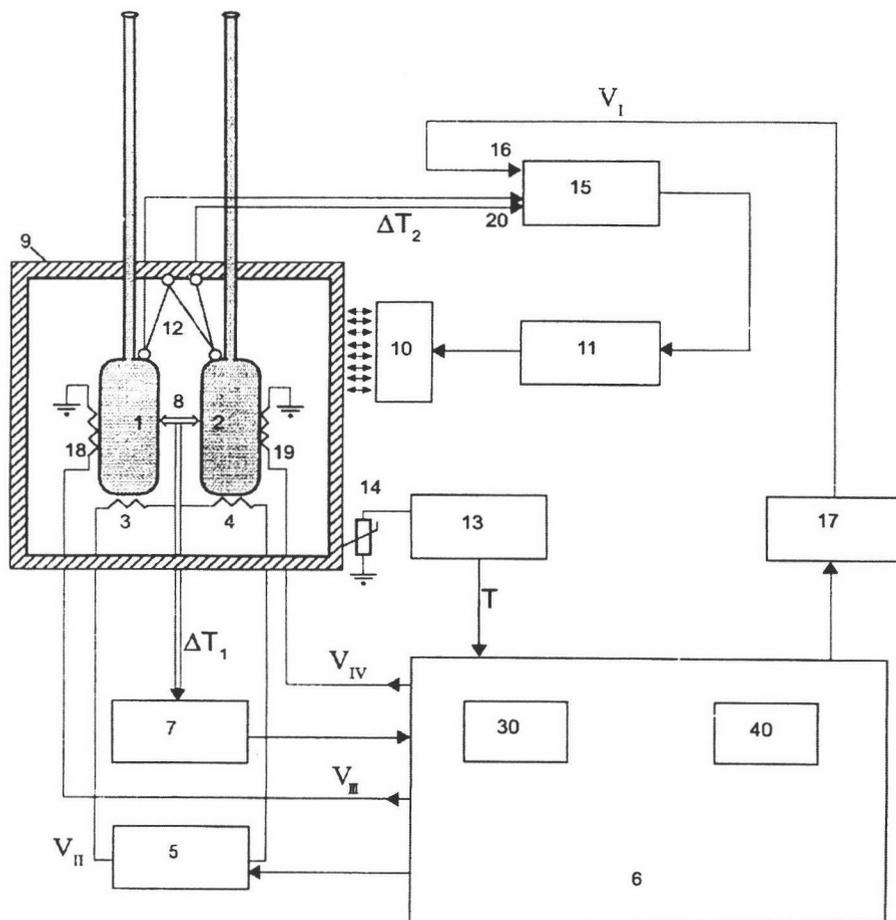
anteriores, lo que permite obtener termogramas informativos utilizando cantidades de sólo 50 µg de proteína. Las células de este instrumento tienen forma de moneda, y están fabricadas con tántalo 61, material de gran resistencia (equiparable a la del vidrio) a la corrosión frente a casi todos los ácidos, aunque es altamente sensible al ataque por medios fuertemente alcalinos. El volumen efectivo de las células es de 0.52 mL. Ambas están fijadas en el interior de una coraza cilíndrica que garantiza la adiabaticidad del sistema, y puede accederse a ellas a través de unos tubos capilares de 1.5 mm de diámetro interno. El intervalo de temperatura de operación de este instrumento está comprendido entre -10 y 130 °C y es capaz de registrar barridos tanto calentando como enfriando (este último en modo no adiabático), sin necesidad de utilizar ningún dispositivo exterior, ya que utiliza un mecanismo interno Peltier. Las velocidades de barrido se seleccionan a voluntad dentro de un intervalo entre 0.1 y 2 K/min. En el caso de que el barrido supere la temperatura de ebullición de la disolución, el instrumento dispone de un sistema de presurización que puede alcanzar presiones de hasta 35 psi, evitando así la ebullición de las muestras. El esquema del instrumento se muestra en la Figura 3.6.1.

El VP-DSC también es el primer calorímetro con el que es posible seleccionar un tiempo de respuesta entre 5 y 30 segundos. El tiempo de respuesta está estrechamente relacionado con la sensibilidad del aparato, de forma tal que ésta aumenta conforme lo hace el tiempo de respuesta. Este hecho supone una gran ventaja en el estudio de transiciones anchas, que constituyen el caso más común observado en la mayoría de las proteínas, en las que se requiere de una gran sensibilidad para resolver el pico y por tanto de un tiempo de respuesta elevado. Sin embargo, en el caso de transiciones agudas, es aconsejable el uso de tiempos de respuesta cortos que evitan distorsionar la forma del termograma correspondiente. Aún así, el aumento del ruido, que no depende del uso de tiempos de respuesta menores, reduce la calidad de los datos obtenidos. Detalles adicionales sobre el diseño y características del VP-DSC, pueden consultarse en Plotnikov et al., 1997.

### 3.6.3 EL EXPERIMENTO CALORIMÉTRICO

#### A) Preparación de la experiencia

En un experimento de CDB deben de estar garantizados previamente tanto el grado de pureza como la integridad de la proteína. La concentración de la misma debe determinarse de



**Figura 3.6.1:** Esquema 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 y controlados por el voltaje  $V_{II}$  de la fuente de alimentación, 5. Dicha fuente a su vez está conectada al computador, 6, a través de una tarjeta convertora analógico-digital (A/D), 30. Los elementos auxiliares de calentamiento, 18 y 19, se alimentan de la tarjeta A/D y se emplean en la calibración y retroalimentación. El dispositivo de medida del efecto térmico, 7, así como el sensor de cristal, 8, para medir la diferencia de temperatura,  $\Delta T_1$  entre las dos células, son parte del sistema de medida por compensación. Rodeando 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 amplificador sumador 15. El amplificador sumador tiene como una de las entradas la señal 20, procedente del sensor 12, que mide la diferencia de temperatura  $\Delta T_2$  entre las células y la coraza. La otra entrada, 16, es un voltaje  $V_I$ , de una 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 mediante un sensor, 14 situado en la coraza térmica; la señal de salida del dispositivo se digitaliza en el convertor A/D, 30. Las señales calibradas  $\Delta T_1$  y  $\Delta T_2$ , así como la temperatura se registran de forma continua durante el experimento y se almacenan en la memoria del computador, 40, con un periodo de muestreo seleccionado por el usuario.

forma rigurosa como se describe en la sección 3.4.3 para evitar que los errores en la concentración se reflejen en la posterior determinación de los parámetros termodinámicos.

La proteína se prepara como se indica en la sección 3.4.1. Una vez preparada, es necesario filtrarla o centrifugarla en centrífuga de mesa a máxima velocidad durante 15 minutos a 4 °C para evitar las partículas en suspensión que puedan quedar en la disolución. El volumen final de ésta debe de ser al menos de 1.2 mL para facilitar el llenado de las células evitando la aparición de burbujas

### **B) La línea base instrumental**

Si las dos células del instrumento fuesen idénticas, sólo se necesitaría un barrido para determinar la diferencia de capacidad calorífica existente entre la célula de muestra y la de referencia. Sin embargo, las dos células no son exactamente iguales, lo que conlleva tener que registrar un barrido adicional para sustraer y eliminar la contribución a la señal experimental debida a estos factores instrumentales.

Según esto, el primer paso consiste en registrar la línea base instrumental, cuando se rellenan las dos células con el tampón en el que va disuelta la muestra. Se registran barridos de temperatura sucesivos (sin rellenar las células al finalizar cada registro) para asegurarnos de que la línea base es reproducible, de tal forma que la diferencia entre dos termogramas consecutivos se encuentre dentro del intervalo de las especificaciones del instrumento ( $\pm 2$   $\mu\text{cal/grado}$ ). En la práctica, la reproducibilidad de la respuesta térmica del instrumento se consigue empleando el mismo ciclo térmico durante varios barridos consecutivos, que incluye el uso de parámetros como la temperatura de inicio y finalización del barrido, velocidad del mismo, y tiempo de equilibrado entre el final de un barrido y comienzo del siguiente. Seguir este protocolo de operación es muy importante antes de comenzar con los experimentos de proteína.

### **C) Barrido de la muestra de proteína**

Una vez adquirida la línea base instrumental, se llena la célula de muestra con la disolución de proteína cuando el calorímetro alcanza la temperatura ambiente, generalmente entre 20 y 30 °C. Esta operación ha de realizarse en el menor tiempo posible, para no tener demasiado tiempo el bloque calorimétrico destapado, verificándose que no hay burbujas en la

célula. A continuación, se comprueba la concentración de la proteína en el interior de la célula, ya que se produce una dilución de ésta del 1 ó el 2 % al introducirla en la célula debido a que ésta puede no estar completamente seca. Para ello, se registra el espectro ultravioleta-visible de la solución que sobra del proceso de llenado de la célula, cuya composición es equivalente a la que se encuentra en ésta.

Un termograma típico para una proteína consiste en una curva que presenta un pico endotérmico asociado a una transición (Figura 3.6.2). Este pico se produce por la absorción del calor asociado usualmente a la desnaturalización térmica de la proteína. Las capacidades caloríficas de los estado nativo y desnaturalizado corresponden a los valores de las señales obtenidas en las zonas de la pre- y post-transición.

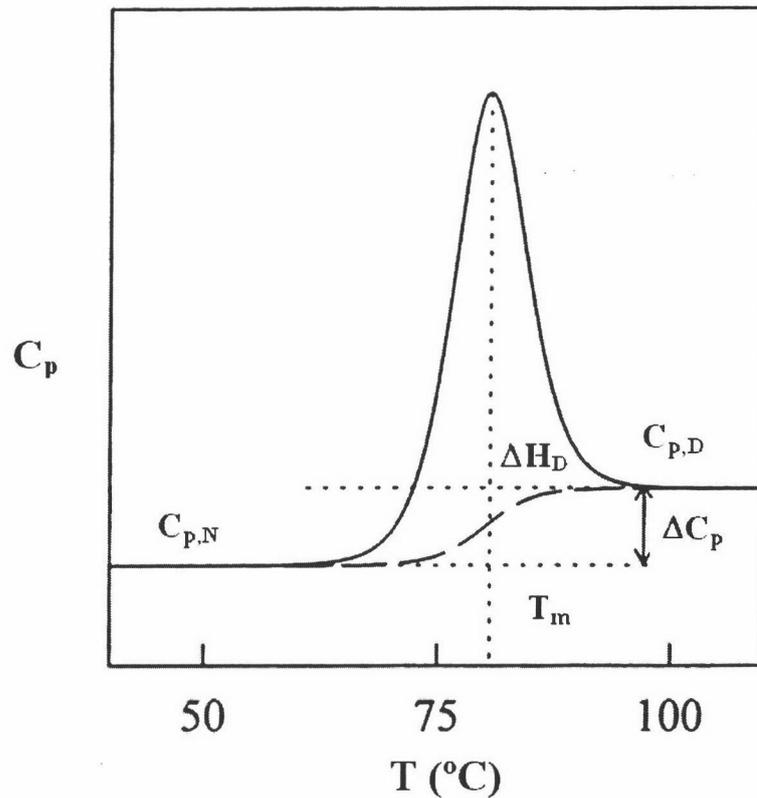
Posteriormente, se resta la línea base instrumental al termograma obtenido en el barrido de proteína-tampón (contenidos en la célula de muestra y referencia respectivamente), con el objeto de eliminar las contribuciones debidas al instrumento, lo que va a generar, en la mayor parte dentro del intervalo de temperaturas registrado, valores negativos de la capacidad calorífica. Esto se debe a que la capacidad calorífica de la disolución de la célula de referencia tiene un valor mayor que la correspondiente a la muestra (Privalov y Khechinashvili, 1974) ya que en ésta última la proteína desplaza una cantidad de agua cuya capacidad calorífica es mayor que la de la proteína.

Con el propósito de comprobar la reversibilidad del proceso de desnaturalización de la proteína, se registra un segundo barrido consecutivo sin extraer la muestra de la célula. La reversibilidad se expresa en términos del porcentaje de área bajo la curva que se recupera en el segundo barrido y su importancia se refleja en el posterior análisis de los termogramas obtenidos, ya que no se puede aplicar un método de análisis basado en la termodinámica del equilibrio a procesos irreversibles que no transcurran en equilibrio termodinámico.

Una vez hayan concluido los barridos, se procede inmediatamente a la limpieza de las células con abundante agua Milli-Q, para evitar la formación de depósitos de restos de proteína en las paredes de la célula de muestra.

#### **D) Calibrado y corrección dinámica**

Los valores de capacidad calorífica (J/K) se obtienen a partir de la señal original de voltaje que se obtiene del calorímetro (en mV), haciendo uso de la constante de calibrado (k) del instrumento, parámetro que es necesario determinar previamente. Para ello, hay que



**Figura 3.6.2:** En trazo continuo se representa la curva de capacidad calorífica en función de la temperatura de una proteína hipotética.  $C_{p,N}$  y  $C_{p,D}$  representan las capacidades caloríficas de los estados nativo y desnaturalizado respectivamente. La curva sigmoideal (trazo discontinuo) representa la capacidad calorífica promedio de la proteína descrita por el tercer término de la ecuación 3.6.13. El área comprendida entre las dos curvas anteriores corresponde al cambio total de entalpía debido a la desnaturalización,  $\Delta H_D$  o entalpía calorimétrica.  $T_m$  corresponde a la temperatura de desnaturalización, que en el caso de curvas simétricas como ésta coincide prácticamente con el máximo de capacidad calorífica. Los parámetros empleados para esta simulación son  $\Delta C_p = C_{p,D} - C_{p,N} = 7 \text{ kJ} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ;  $\Delta H_D = 400 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  y  $T_m = 80 \text{ }^\circ\text{C}$ .

suministrar una cierta potencia conocida a la resistencia de una de las células y medir a continuación la variación en la señal que tiene lugar como consecuencia (Figura 3.6.3). Una vez se conoce esta constante de calibrado (en  $\text{mV}/\mu\text{W}$ ) y la velocidad de barrido,  $v$ , del experimento (en  $\text{K}/\text{min}$ ) se puede transformar la señal original en unidades de capacidad calorífica ( $\text{kJ}/\text{K}$ ). A continuación es necesario normalizar los valores obtenidos para el número de moles de proteína presentes en el interior de la célula, considerando el volumen efectivo de la célula ( $V_{\text{cel}}$ ), la concentración de proteína en el interior de la misma ( $c$ ) y el peso molecular de la proteína ( $P_m$ ). Esta operación tiene lugar empleando el siguiente factor

de conversión  $f$ , que permite transformar directamente los valores de voltaje iniciales (mV) en valores de capacidad calorífica molar ( $\text{kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ ):

$$f = \frac{P(\text{g/mol}) \cdot 60(\text{s/min}) \cdot 10^{-6} (\text{W}/\mu\text{W})}{k(\text{mV}/\mu\text{W}) \cdot V_{\text{cel}} (\text{mL}) \cdot c(\text{mg/mL}) \cdot v(\text{K/min})} \quad (3.6.1)$$

En el VP-DSC, el programa de adquisición de datos emplea una constante de calibración determinada por MicroCal Inc. para registrar la señal en mcal/K. De todos modos, se recomienda realizar una calibración eléctrica cada seis meses aproximadamente así como una calibración de la temperatura de forma periódica cada seis meses también.

Como cualquier instrumento de medida, el calorímetro tiene un tiempo de respuesta determinado, de forma que las curvas que se registran tienen un cierto grado de distorsión. Por esta razón, es necesario corregir los termogramas. En el caso de un calorímetro que presente una dinámica de primer orden hay que realizar la siguiente operación para llevar a cabo la corrección dinámica:

$$C_p(T) = C_p^*(T) + t_R \cdot v \cdot \frac{dC_p^*(T)}{dT} \quad (3.6.2)$$

donde  $C_p(T)$  es la señal real producida por el sistema de estudio,  $C_p^*(T)$  es la señal obtenida experimentalmente, distorsionada por la respuesta del instrumento,  $v$  la velocidad de barrido y  $t_R$  el tiempo de respuesta del instrumento, determinado previamente a través de la caracterización dinámica del mismo (López-Mayorga & Freire, 1987; Lechuga, 1986; López-Mayorga, 1983). En el VP-DSC la corrección dinámica se hace de forma automática según el tiempo de respuesta preseleccionado.

### 3.6.4 ANÁLISIS PRELIMINAR DE LOS TERMOGRAMAS

Los ficheros originados por el programa de adquisición de datos, VP-Viewer, contienen el valor de la señal proporcional a la variación de capacidad calorífica de la disolución de proteína (en mV) con la temperatura. Para procesar estos datos experimentales se siguen los siguientes pasos:

En primer lugar, es necesario importar los ficheros obtenidos en el programa VP-Viewer al programa MicroCal Origin para CDB v 4.1. Durante este proceso se lleva a cabo de forma automática tanto la conversión de unidades de mV a unidades típicas de capacidad calorífica (en cal/K) como la corrección dinámica del termograma, basándose en la última

calibración realizada y en el tiempo de respuesta preseleccionado. Una vez aquí, hay que restar al termograma la línea base instrumental.

A continuación se normalizan los datos teniendo en cuenta la concentración de proteína y el volumen efectivo de la célula, expresando la capacidad calorífica en términos de capacidad calorífica molar parcial kJ/K·mol.

El perfil de capacidad calorífica obtenido hasta el momento muestra que la capacidad calorífica de la proteína en el estado desnaturalizado es significativamente mayor que en el estado nativo, debido a que la desnaturalización va acompañada de un aumento en la capacidad calorífica. Por otra parte, la diferencia de capacidad calorífica entre una disolución de macromoléculas biológicas y el disolvente correspondiente es normalmente negativa como ya se ha comentado (Figura 3.6.3). Esta diferencia se puede escribir como:

$$\Delta C_{p,p}(T) = C_{p,p}(T) \cdot m_p - C_{p,s}(T) \cdot \Delta m_s \quad (3.6.3)$$

en la que  $C_{p,p}$  y  $C_{p,s}$  son las capacidades caloríficas parciales de la proteína y del disolvente respectivamente,  $m_p$  la cantidad de proteína en la célula calorimétrica y  $\Delta m_s$  la cantidad de disolvente desplazado por la proteína en disolución.

Teniendo en cuenta que:

$$\Delta m_s = m_p \cdot \frac{V_p(T)}{V_s(T)} \quad (3.6.4)$$

donde  $V_p(T)$  y  $V_s(T)$  son los correspondientes volúmenes específicos parciales de la proteína en disolución y del disolvente respectivamente, obtenemos que:

$$C_{p,p} = C_{p,s}(T) \cdot \frac{V_p(T)}{V_s(T)} + \frac{\Delta C_{p,p}(T)}{m_p} \quad (3.6.5)$$

Podemos considerar que en el caso de disoluciones acuosas la capacidad calorífica del disolvente,  $C_{p,s}(T)$  y su volumen específico,  $V_s(T)$ , son los correspondientes al agua pura, con lo que  $C_{p,s}(T) = 1 \text{ cal/K}\cdot\text{g}$  y  $V_s(T) = 1 \text{ mL/g}$  (Privalov y Potekhin, 1986). Con esto, la ecuación 3.6.5 puede escribirse así:

$$C_{p,p} = 4.186 \cdot 10^{-3} \cdot V_p(T) \cdot P_m + \Delta C_{p,p}(T) \cdot f \text{ (kJ / K}\cdot\text{mol)} \quad (3.6.6)$$

donde  $P_m$  es el peso molecular de la proteína en Dalton y  $f$  es el factor de conversión de unidades descrito en la sección anterior.

Para estos cálculos se ha supuesto en buena aproximación que el volumen específico parcial de la proteína es igual a 0.73 mL/g, valor que se utiliza como promedio para todas las

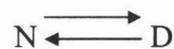
proteínas globulares, confirmado por Makhatadze et al. (1990) a partir de los volúmenes específicos de cada aminoácido. El resultado para estos cálculos se muestra en la Figura 3.6.3.

### 3.6.5 ANÁLISIS DE LOS TERMOGRAMAS SEGÚN LA TERMODINÁMICA DE EQUILIBRIO

A partir del tratamiento realizado sobre los termogramas en la sección anterior, disponemos de la función capacidad calorífica molar parcial de la proteína  $C_p(T)$  en función de la temperatura, para las condiciones experimentales del estudio. Con esta función pueden obtenerse los parámetros termodinámicos que caracterizan el proceso de desnaturalización térmica. Para ello, es preciso suponer un modelo que describa de manera satisfactoria el comportamiento de la proteína.

A continuación se desarrolla la formulación matemática del modelo que se ha utilizado en esta memoria para el análisis de los termogramas de CDB obtenidos. El modelo de equilibrio de dos estados constituye el mecanismo más simple de desnaturalización descrito para una proteína. Según esto, durante el proceso de desplegamiento sólo existen dos estados poblados significativamente en equilibrio: el estado nativo que posee una estructura plegada (N) y el estado desnaturalizado o desplegado (D). Podría decirse que ambos estados son en realidad, desde el punto de vista termodinámico-estadístico, dos macroestados constituidos cada uno de ellos por una serie de microestados con valores de entalpía similares.

Así, para el equilibrio



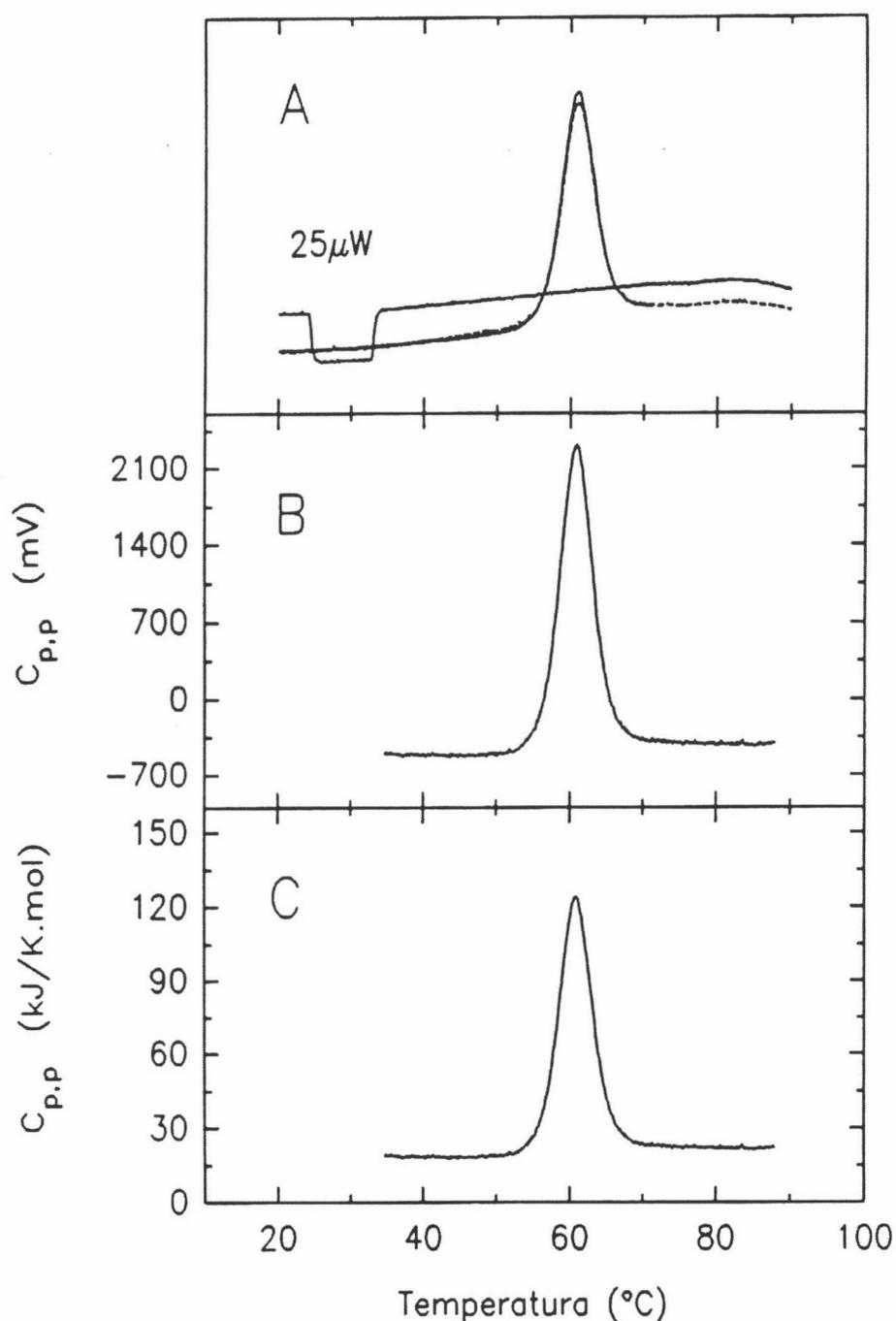
La constante de equilibrio aparente, para la desnaturalización, viene dada por:

$$K_D = \frac{[D]}{[N]} \quad (3.6.7)$$

y la fracción de proteína que se encuentra en el estado D,  $x_D$ , será:

$$x_D = \frac{[D]}{[N] + [D]} = \frac{K_D}{1 + K_D} \quad (3.6.8)$$

En general, el cambio de un parámetro termodinámico debido a la desnaturalización ( $\Delta J$ ) puede definirse como la diferencia entre los valores que adquiere este en los estados desnaturalizado y nativo respectivamente:  $\Delta J = J_D - J_N$ .  $J$  puede identificarse con la energía de Gibbs (G), la entalpía (H), la entropía (S) o la capacidad calorífica a presión constante ( $C_p$ ). Tal como acabamos de definir  $\Delta J$ , el estado que se tomará de referencia es el nativo



**Figura 3.6.3:** *A.* Perfil experimental de la capacidad calorífica frente a la temperatura de la proteína Barnasa (tomado de Martínez et al., 1995) en tampón acético/acetato, pH 4.5. En la línea base se representa un calibrado de 25  $\mu$ W. El primer y segundo barrido de la muestra son prácticamente indistinguibles, salvo que la altura de la endoterma en el segundo de ellos es un poco menor. *B.* Representa el termograma resultante de restar al primer barrido la línea base instrumental. *C.* Termograma resultante de aplicar la conversión de unidades a valores de capacidad calorífica absoluta.

De la misma forma, podríamos definir cualquier parámetro J que describa al sistema como  $\langle J \rangle = x_N \cdot J_N + x_D \cdot J_D$ . A partir de aquí podemos definir la entalpía molar parcial del sistema:

$$\langle H \rangle = x_N \cdot H_N + x_D \cdot H_D = H_N + x_D \cdot \Delta H_D = H_N + \frac{K_D}{1 + K_D} \cdot \Delta H_D \quad (3.6.9)$$

donde  $\Delta H_D$  es la diferencia de entalpía de desplegamiento,  $\Delta H_D = H_D - H_N$ . A partir de aquí, definiremos la capacidad calorífica molar parcial,  $C_p$ , como:

$$C_p = \left[ \frac{\partial \langle H \rangle}{\partial T} \right]_p = C_{p,N} + \frac{\Delta H_D}{(1 + K_D)^2} \left[ \frac{\partial K_D}{\partial T} \right]_p + \frac{K_D}{(1 + K_D)} \left[ \frac{\partial \Delta H_D}{\partial T} \right]_p \quad (3.6.10)$$

donde  $C_{p,N}$  es la capacidad calorífica molar parcial del estado nativo.

Para expresar la dependencia de  $\Delta H_D$  y  $K_D$  con la temperatura utilizaremos las relaciones de Kirchoff y van't Hoff respectivamente:

$$\left[ \frac{\partial \Delta H_D}{\partial T} \right]_p = \Delta C_p \quad (3.6.11)$$

$$\left[ \frac{\partial \ln K_D}{\partial T} \right]_p = \frac{\Delta H_D^0}{RT^2} = \frac{1}{K_D} \left[ \frac{\partial K_D}{\partial T} \right]_p \quad (3.6.12)$$

donde  $K_D = \exp\left(-\frac{\Delta G_D^0}{RT}\right)$ , siendo  $\Delta G_D^0$  la diferencia de energía de Gibbs entre el estado desplegado y el nativo. Tanto el valor de  $\Delta G_D^0$  como el de  $\Delta H_D^0$  se definen en condiciones estándar, a 298 K y 1 atmósfera de presión.

La ecuación 3.6.10 puede escribirse entonces como:

$$C_p = C_{p,N} + \frac{(\Delta H_D^0)^2}{RT^2} \cdot \frac{K_D}{(1 + K_D)^2} + x_D \cdot \Delta C_p \quad (3.6.13)$$

Por último necesitaremos hacer uso de las relaciones sencillas:

$$\left[ \frac{\partial \Delta S_D}{\partial T} \right]_p = \frac{\Delta C_p}{T} \quad (3.6.14)$$

En estas ecuaciones,  $\Delta S_D$  y  $\Delta C_p$  representan las diferencias de entropía, y de capacidad calorífica molares parciales entre los estados N y D, respectivamente.

Con respecto al valor que  $\Delta C_p$  toma dentro del intervalo de temperatura en el que ocurre la desnaturalización, hay que destacar que para la mayoría de las proteínas se ha considerado que permanece constante de forma aproximada. Sin embargo, Privalov y

colaboradores (Privalov et al., 1989) llevaron a cabo un análisis de las curvas de capacidad calorífica de varias proteínas globulares, del que se dedujo que la capacidad calorífica del estado desplegado no es una función lineal de la temperatura, con lo que el valor de  $\Delta C_p$  no es constante. Esta variación de  $\Delta C_p$  con la temperatura es importante en el caso de aquellas transiciones que tengan lugar en intervalos relativamente amplios de temperatura. Es sabido que, generalmente, la función  $C_p$  del estado nativo sigue una tendencia de tipo lineal, de forma muy aproximada, en el intervalo de temperatura previo a la transición de desnaturalización, que suele extrapolarse a temperaturas superiores. Sin embargo, en el caso de la función capacidad calorífica molar parcial del estado desnaturalizado, no es tan sencillo. Numerosos estudios de CDB han revelado que esta función presenta una curvatura apreciable a temperaturas menores de 40 °C (Ruiz-Sanz, et al., 1999; Padmanabhan, et al., 1999; Viguera et al., 1994b; Privalov et al., 1989). Por otra parte, Privalov y Makhatadze determinaron que puede estimarse la función de la capacidad calorífica molar parcial de una cadena polipeptídica desplegada a partir de su contenido en aminoácidos (Makhatadze & Privalov, 1990; Privalov & Makhatadze, 1990), sumando las contribuciones a dicha función de los grupos terminales  $-NH_2$  y  $-COOH$ , de cada enlace peptídico ( $-CHCONH-$ ) y de las cadenas laterales de cada aminoácido en el intervalo de temperatura comprendido entre 5 y 125 °C. El algoritmo empírico descrito por estos autores (al que llamaremos PM) estima la dependencia de la capacidad calorífica molar parcial del estado desplegado con la temperatura mediante un polinomio de segundo orden. También Hinz y colaboradores (Häkel et al., 1999) han propuesto recientemente un algoritmo similar para estimar el valor de la función  $C_{p,D}$  (método HHH).

Así pues, las funciones más sencillas que describen la capacidad calorífica molar parcial de los estados nativo y desnaturalizado describirse con las siguientes ecuaciones:

$$C_{p,N}(T) = a_N + b_N \cdot t_r \quad (3.6.15)$$

$$C_{p,D}(T) = a_D + b_D \cdot t_r + c_D \cdot t_r^2 \quad (3.6.16)$$

donde  $t_r = T - T_r$ , siendo  $T_r$  la temperatura que escogemos como referencia.

De aquí, podemos expresar  $\Delta C_p$  como la diferencia entre las dos funciones anteriores:  
 $\Delta C_p(T) = C_{p,D}(T) - C_{p,N}(T) = [(a_D - a_N) - (b_D - b_N) \cdot T_r + c_D \cdot T_r^2] + [(b_D - b_N) - 2 \cdot c_D \cdot T_r] \cdot T + c_D \cdot T^2$  ó de la misma forma, como:

$$\Delta C_p(T) = A + B \cdot T + C \cdot T^2 \quad (3.6.17)$$

donde  $A = [(a_D - a_N) - (b_D - b_N) \cdot T_r + c_D \cdot T_r^2]$ ,  $B = [(b_D - b_N) - 2 \cdot c_D \cdot T_r]$  y  $C = c_D$ .

Este tipo de análisis se ha realizado con éxito en el caso de diversas proteínas en nuestro grupo de investigación (Ruiz-Sanz, et al., 1999; Padmanabhan, et al., 1999; Azuaga et al., 1995; Viguera et al., 1994b)

Una vez establecida la dependencia de  $\Delta C_p$  con la temperatura, pueden calcularse las dependencias con ésta de  $\Delta H_D$  y  $\Delta S_D$ , integrando de forma sencilla las ecuaciones 3.6.11 y 3.6.14, mediante las siguientes expresiones:

$$\Delta H_D(T) = \Delta H_m + \int_{T_m}^T \Delta C_p \cdot dT \quad (3.6.18)$$

$$\Delta S_D(T) = \Delta S_m + \int_{T_m}^T \frac{\Delta C_p}{T} \cdot dT \quad (3.6.19)$$

donde  $\Delta H_m$  y  $\Delta S_m$  son los incrementos de entalpía y entropía del desplegamiento a la temperatura de la transición ( $T_m$ ), que se define como aquella temperatura en la que se cumple que  $x_D = 0.5$ , es decir, que  $K_D = 1$ . El valor de  $T_m$  coincide de forma aproximada con el máximo de la curva de capacidad calorífica en aquellos casos en que las transiciones sean simétricas y estrechas. Por otra parte, cuando  $T = T_m$ ,  $\Delta G_D^0 = 0$ . Esto permite calcular para esta temperatura,  $T_m$ , el cambio de entropía  $\Delta S_m$ , mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta S_m = \frac{\Delta H_m}{T_m} \quad (3.6.20)$$

Haciendo uso de la ecuación anterior en las ecuaciones 3.6.18 y 3.6.19 obtendremos las expresiones integradas que muestran la dependencia de  $\Delta H_D$  y  $\Delta S_D$  con la temperatura:

$$\Delta H_D(T) = \Delta H_m + A \cdot (T - T_m) + \frac{B}{2} \cdot (T^2 - T_m^2) + \frac{C}{3} \cdot (T^3 - T_m^3) \quad (3.6.21)$$

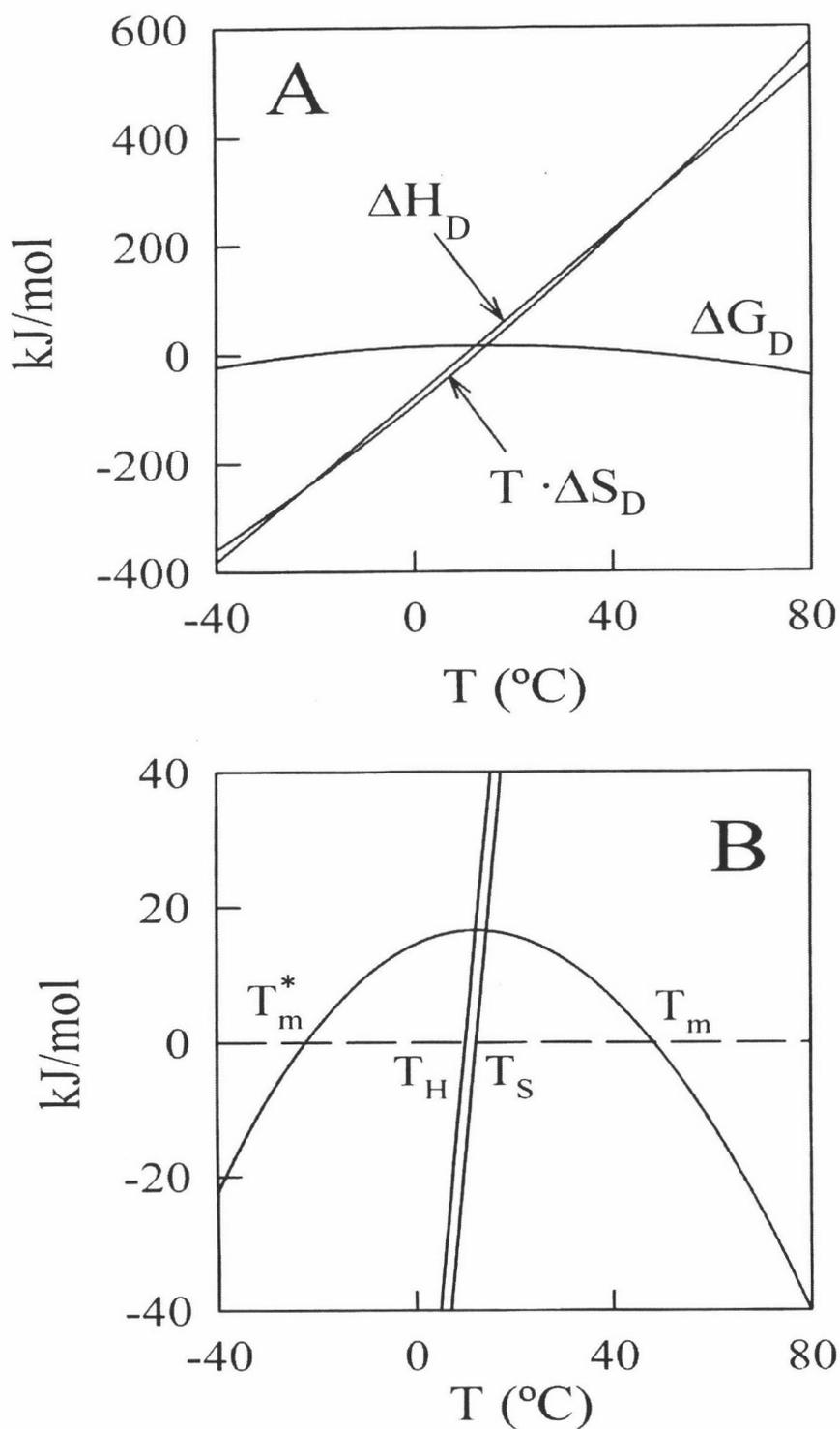
$$\Delta S_D(T) = \frac{\Delta H_m}{T_m} + A \cdot \ln\left(\frac{T}{T_m}\right) + B \cdot (T - T_m) + \frac{C}{2} \cdot (T^2 - T_m^2) \quad (3.6.22)$$

Si en el caso de la desnaturalización de una proteína se representa la dependencia de  $\Delta G_D$  frente a la temperatura, mediante la siguiente función,

$$\Delta G_D(T) = \Delta H_D(T) - T \cdot \Delta S_D(T) \quad (3.6.23)$$

se obtiene la curva de estabilidad representada en la Figura 3.6.4.

La curva de estabilidad refleja propiedades importantes, que han sido descritas en la literatura (Becktel y Schellman, 1987; Schellman, 1987) y se resumen a continuación. En primer lugar, la pendiente de la curva de estabilidad responde a la expresión:  $[\partial \Delta G_D / \partial T]_p = \Delta S_D$ . Como se observa en la Figura 3.6.4, dicha curva presenta un único máximo



**Figura 3.6.4:** A. Dependencia de las variaciones de entalpía, entropía y energía de Gibbs con la temperatura para una proteína hipotética. B. Ampliación del eje de ordenadas del panel A, sobre la curva de estabilidad de la proteína,  $\Delta G_D(T)$ . En él se muestran las temperaturas de desnaturalización a alta y baja temperatura,  $T_m$  y  $T_m^*$  respectivamente, así como las temperaturas de inversión de entalpía  $T_H$  y  $T_S$  en las que  $\Delta H_D$  y  $\Delta S_D$  se igualan a cero, respectivamente.

a la temperatura en la que  $\Delta S_D$  se iguala a cero. Esta temperatura se define como la temperatura de máxima estabilidad ( $T_S$ ). Existe otra temperatura a la que la entalpía de desnaturalización se anula y se representa como  $T_H$  (su valor es ligeramente menor que  $T_S$ ). En segundo lugar, la curvatura de la curva de estabilidad viene dada por la relación:  $[\partial^2 \Delta G_D / \partial T^2]_p = - \Delta C_p / T$ , obtenida teniendo en cuenta las ecuaciones 3.6.23 y 3.6.14. Esta segunda derivada solo toma valores negativos, debido a que  $\Delta C_p$  siempre es positivo (ver Figura 3.6.2), probablemente por las mismas razones que explican que la transferencia de grupos apolares de un medio apolar a un medio acuoso conllevan un aumento de la capacidad calorífica (Dec & Gill, 1984; 1985; Sturtevant, 1977; Gill & Wadsö, 1976; Breslauer et al., 1974; Tandford, 1973) por la interacción de estos grupos apolares con las moléculas de disolvente (Privalov & Gill, 1988). Durante el desplegamiento de una proteína, este aumento de la capacidad calorífica parece ser debido principalmente a la exposición de los restos hidrofóbicos al medio acuoso que inicialmente se encuentran “enterrados” en el interior de la proteína nativa (Sturtevant, 1977). En el panel B de la Figura 3.6.4 se observa que el valor en el que  $\Delta G_D$  alcanza su valor máximo corresponde generalmente a temperaturas próximas a la fisiológica, condiciones en las que  $\Delta G_D > 0$ , y por tanto, donde el estado nativo está favorecido. El valor de  $\Delta G_D$  a 25 °C se toma como una medida de la estabilidad de la proteína. Otro punto importante en la curva de estabilidad es aquél en el que  $\Delta G_D$  se iguala a cero a alta temperatura, es decir para  $T = T_m$  y a partir del cual adopta valores negativos, favoreciéndose el estado desnaturalizado. Por otra parte, el punto de corte con el valor cero de  $\Delta G_D$  a baja temperatura, resultado de extrapolar la curva en este intervalo de temperaturas, corresponde a la temperatura a la que la proteína desnaturalizaría por “frío” (desnaturalización “fría”),  $T_m^*$ . Este fenómeno fue predicho hace unos 40 años por Brandts (1964) y posteriormente confirmado experimentalmente por Privalov et al. (1986). Generalmente, la temperatura a la que se predice la desnaturalización por frío es inferior a los 0 °C y a veces puede detectarse experimentalmente sobreenfriando la disolución de proteína o bien adicionando agentes desnaturalizantes, como urea o guanidina, que desplazan esta temperatura a valores superiores. Diversos estudios realizados por CDB sugieren que la desnaturalización fría es una propiedad común en las proteínas globulares (Azuaga et al., 1992; Griko y Privalov, 1992; Tamura et al., 1991; Griko et al., 1988, 1989; Privalov et al., 1986), confirmando así las características mencionadas acerca de la curva de estabilidad.

De esta manera, podemos decir que una vez calculados los valores de  $T_m$ ,  $\Delta H_m$  y  $\Delta C_p$  determinados como se ha descrito a partir del termograma obtenido experimentalmente, disponemos de la información termodinámica completa de la proteína en estudio. En la Figura 3.6.2 se muestran dichos parámetros. Hay que notar que la formulación matemática que se ha descrito hasta el momento, sólo es válida para el análisis de aquellas curvas de  $C_p$  en las que el modelo de equilibrio de dos estados permite describir adecuadamente el proceso de desnaturalización del sistema en estudio.

En algunos casos puede ocurrir que la curva experimental no se describa adecuadamente a partir del cálculo de los valores de  $T_m$  y  $\Delta H_m$ , por cumplirse bajo determinadas condiciones experimentales que la función  $\Delta G_D(T)$  no se anule a ninguna temperatura dentro del intervalo de estudiado (esto impide el cálculo de  $T_m$ ); más aun, los valores que adquiere este parámetro termodinámico en dicho intervalo se encuentran por debajo de cero, lo que implica que la población del estado desnaturalizado es siempre superior a la correspondiente al estado nativo ( $x_N < 0.5$ ). En este caso se escogen como referencia para la determinación de los parámetros termodinámicos los valores de  $T_H$  y  $T_S$ . Si se aplican las relaciones  $\Delta H_D(T_H) = 0$  y  $\Delta S_D(T_S) = 0$  en el proceso de integración de las ecuaciones generales (3.6.11) y (3.6.14) obtenemos expresiones análogas a (3.6.21) y (3.6.22):

$$\Delta H_D(T) = A \cdot (T - T_H) + \frac{B}{2} \cdot (T^2 - T_H^2) + \frac{C}{3} \cdot (T^3 - T_H^3) \quad (3.6.24)$$

$$\Delta S_D(T) = A \cdot \ln\left(\frac{T}{T_S}\right) + B \cdot (T - T_S) + \frac{C}{2} \cdot (T^2 - T_S^2) \quad (3.6.25)$$

el resto de las expresiones encontradas para el caso general pueden ser aplicadas a este caso igualmente.

Debido a que la CDB es una técnica que permite medir tanto directa como indirectamente la variación de la entalpía que tiene lugar durante el proceso de desnaturalización de una proteína, ha sido considerada hasta no hace mucho tiempo como una vía de estudio suficiente para comprobar la validez y aplicabilidad del modelo de dos estados al análisis del proceso de desnaturalización de las proteínas (Viguera et al., 1994b; Jackson y Fersht, 1991; Schellman, 1987; Privalov, 1979; Tandford, 1968). El valor de la entalpía para este proceso se corresponde con el área y a su vez condiciona la anchura de la curva, de cuya forma puede obtenerse también aquel valor. Según esto, la entalpía del proceso de desnaturalización, dentro del análisis descrito por el modelo de dos estados, se puede determinar de dos formas distintas: a través de la medida directa del área bajo la curva de la

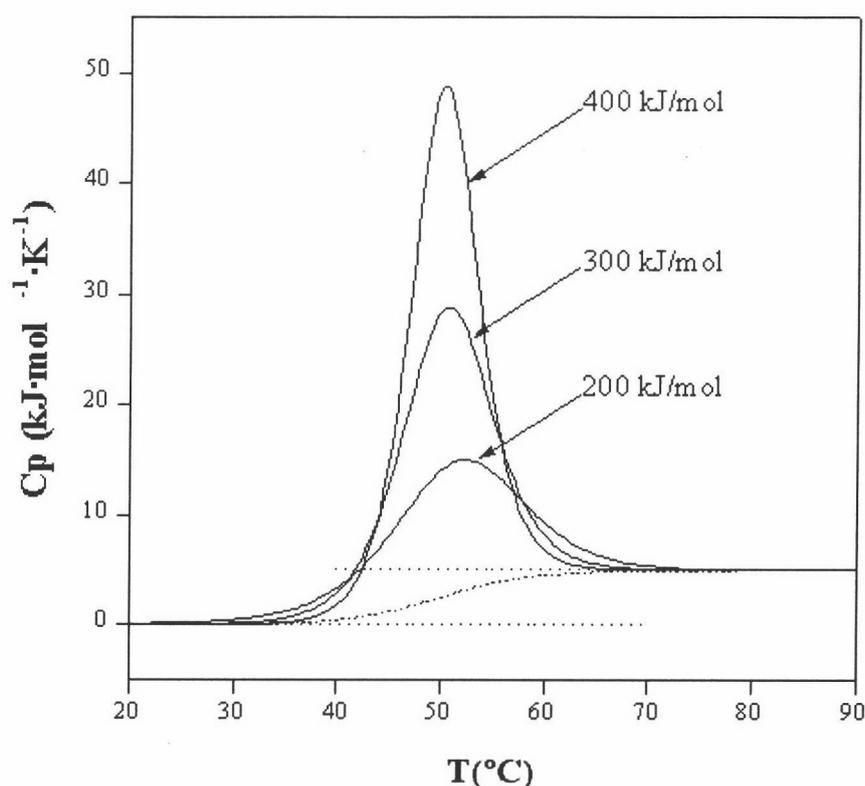
transición de la desnaturalización, obteniéndose la llamada entalpía calorimétrica ó experimental (Figura 3.6.5) que sólo es posible medir mediante el uso de la CDB, y de forma indirecta, integrando la ecuación de van't Hoff, que relaciona la variación de la constante de equilibrio con la temperatura:

$$\left[ \frac{\partial \ln K_D}{\partial T} \right]_p = \frac{\Delta H^{vH}}{RT^2} \quad (3.6.26)$$

Así, se obtiene la entalpía de van't Hoff,  $\Delta H^{vH}$ . Éste método es el único que puede utilizarse en el estudio del desplegamiento térmico reversible de proteínas mediante el uso de técnicas distintas a la calorimetría. De todas maneras, la utilización de técnicas complementarias enriquece notablemente la información obtenida por CDB y es necesaria cuando la transición muestra algunas desviaciones del modelo de dos estados, como en el caso de asociaciones, intermedios metaestables o especialmente en transiciones multiestado. Ejemplos concretos de dichas técnicas son la electroforesis en gel (Creighton, 1986), espectroscopia de dicroísmo circular o fluorescencia (Azuaga et al., 1999; van Nuland et al., 1998; Viguera et al., 1994b; Filimonov et al., 1993), cromatografía de exclusión molecular (Conejero-Lara & Mateo, 1996; Uverski, 1993), ultracentrifugación analítica (Azuaga et al., 1995), intercambio hidrógeno-deuterio (Sadqi et al., 1999; Yi & Baker, 1996), estudios cinéticos de los procesos de plegamiento y desplegamiento (Viguera et al., 1994b; Jackson & Fersht, 1991), etc.

Así pues, a partir de una curva de  $C_p$  se pueden determinar de forma sencilla tanto la entalpía calorimétrica como la de van't Hoff (Privalov, 1979). La igualdad entre ambas es el *criterio calorimétrico* para verificar que la transición sigue el modelo de dos estados. Privalov y colaboradores (Privalov, 1979) establecieron para un determinado número de proteínas globulares que la relación existente entre la entalpía calorimétrica y la de van't Hoff, era  $r = 1.05 \pm 0.03$ . Este valor próximo a la unidad indica una proporción muy baja de estados intermedios entre los dos estados nativo y desnaturalizado, poniendo de manifiesto la validez del modelo de dos estados.

Sin embargo, estos cálculos requieren de una manipulación previa en las curvas que puede inducir a errores significativos, sobre todo en el caso de transiciones relativamente anchas, como es el caso de las proteínas objeto de estudio de esta memoria. Por esta razón se ha adoptado un criterio calorimétrico alternativo más conveniente, consistente en utilizar un algoritmo de ajuste no lineal de mínimos cuadrados aplicado a los datos de  $C_p$ , utilizando las ecuaciones descritas para el modelo de dos estados como se describirá al final de esta sección.



**Figura 3.6.5:** Curvas simuladas de capacidad calorífica en función de la temperatura mediante las ecuaciones del modelo de equilibrio de dos estados para un valor de  $\Delta C_p = 5 \text{ kJ/K}\cdot\text{mol}$ , una temperatura de desnaturalización,  $T_m = 50^{\circ}\text{C}$  y los valores de  $\Delta H_D$  indicados en cada una de las curvas.

La buena concordancia del ajuste se toma generalmente como prueba suficiente para asegurar la validez de dicho modelo (Privalov et al., 1995; Viguera et al., 1994b).

Las curvas de  $C_p$  obtenidas experimentalmente para la desnaturalización de una proteína se analizan según la formulación del modelo de dos estados, mediante el uso de un algoritmo de ajuste no lineal de mínimos cuadrados. Esto se ha llevado a cabo indistintamente mediante el uso de los programas Origin 5.0 (MicroCal Inc.) y Sigma Plot 2000. En general, el proceso consiste en introducir las ecuaciones del modelo dentro de un conjunto de sentencias que se incluye en la subrutina de operación del programa y se muestra en la sección 7 de esta memoria. De esta manera, la función que describe la  $C_p$  queda expresada en función de la temperatura y de una serie de parámetros apropiados que permanecen variables durante el proceso de operación del programa.

El análisis de las curvas obtenidas puede hacerse sobre una única curva ó sobre un conjunto de ellas, y siguiendo, según convenga, la temperatura  $T_m$  ó  $T_H$  y  $T_S$ .

Mediante un análisis individual de una curva de  $C_p$  en términos de  $T_m$  y  $\Delta H_m$  los parámetros escogidos son:

- $T_m$ : Temperatura a la que  $\Delta G_D = 0$ .
- $\Delta H_m$ : Incremento de la entalpía de desnaturalización a  $T = T_m$ .
- $a_D$ : Ordenada en el origen de la función  $C_{p,D}$  (ecuación 3.6.16).
- $b_N$ : Pendiente de la función  $C_{p,N}$  (ecuación 3.6.15).
- $a_N$ : Ordenada en el origen de la función  $C_{p,N}$  (ecuación 3.6.15).

Los valores de los parámetros  $b_D$  y  $c_D$  de la ecuación 3.6.16 se mantienen fijos durante el proceso de regresión y se obtienen mediante la regresión cuadrática de los datos de  $C_{p,D}$ , calculados a partir de la secuencia de la proteína (Makhatadze & Privalov, 1990). El resto de las magnitudes incluidas en las ecuaciones del modelo dependen de estos dos parámetros. En definitiva, cada curva analizada emplea en total 5 parámetros independientes.

En el caso de aplicar el modelo de dos estados a una curva, haciendo uso de las temperaturas  $T_H$  y  $T_S$ , en las ecuaciones 3.6.24 y 3.6.25 correspondientes, además de éstas, se escogen para realizar el análisis los parámetros equivalentes a los definidos en el párrafo anterior para el caso general, con lo que cada curva emplea 7 parámetros totales para el análisis.

El análisis múltiple de un conjunto de curvas obtenidas bajo diferentes condiciones experimentales, por ejemplo a diferentes valores de pH, realizado en términos de  $T_m$  y  $\Delta H_m$ , utiliza una función de  $\Delta C_p$  común para el conjunto de curvas, calculada como se he descrito en el caso del análisis individual. Los parámetros ajustables en el análisis comunes a las curvas son  $a_N$ ,  $b_N$ ,  $a_D$ ,  $b_D$  y  $c_D$ , de los cuales, estos dos últimos, ó sólo el último pueden mantenerse fijos. El resto de los parámetros ajustables son los valores de  $T_m$  y  $\Delta H_m$ , que se definen para cada una de las curvas.

Si el análisis múltiple se realiza empleando la aproximación de  $T_H$ - $T_S$  pueden tomarse algunas restricciones para disminuir el número de parámetros ajustables. En primer lugar podría suponerse que el valor de la función  $\Delta H_D(T)$  (ecuación 3.6.24) sólo depende de la temperatura y no del pH, con lo que el valor de  $T_H$  resulta el mismo para todas las curvas. En segundo lugar que la función  $\Delta C_p$  es única para el conjunto. Según estas premisas, las funciones que describen la capacidad calorífica de los estados nativo y desnaturalizado,  $C_{p,N}$  y

$C_{p,D}$ , son análogas a las ecuaciones 3.6.15 y 3.6.16, aunque ahora la temperatura de referencia escogida  $T_r = T_H$ :

$$C_{p,N} = a_N + b_N \cdot (T - T_H) \quad (3.6.27)$$

$$C_{p,D}(T) = a_D + b_D \cdot (T - T_H) + c_D \cdot (T - T_H)^2 \quad (3.6.28)$$

La función  $\Delta C_p(T)$  resultante es similar a la ecuación 3.6.17. En el caso de la función  $\Delta S_D(T, \text{pH})$  (ecuación 3.6.25) sí existe dependencia con el pH, debido a que los cambios en la concentración de protones en el medio por cambios en el pH producen a su vez cambios de entropía por la ionización de los grupos de la proteína, con lo que se obtendrá un valor de  $T_S$  para cada una curva.

En el caso concreto de disponer de un conjunto de 4 curvas experimentales, resultan 13 parámetros ajustables en el análisis, de los cuales,  $b_D$ ,  $c_D$ ,  $a_N$ ,  $b_N$  y  $T_H$  son comunes a todas las curvas. El término independiente de la función  $C_{p,D}(T)$ ,  $a_D$ , puede considerarse como parámetro ajustable para cada curva, obteniendo en total, en este caso, 4 valores diferentes, uno para cada valor de pH estudiado (de esta manera es posible alinear las posiciones de todas las curvas a lo largo del eje  $C_p$ ), al igual que el valor de la temperatura  $T_S$ .

El programa utilizado para el análisis proporciona intervalos de error muy rigurosos en la determinación de cada parámetro de ajuste, basándose en el análisis de la matriz de varianza-covarianza del ajuste para un intervalo de confianza del 95 % (para más detalles, consultar el manual del usuario de Origin 5.0 ó Sigma Plot 2000).

Una vez obtenidos los valores de  $T_m$  y  $\Delta H_m$  (ó  $T_H$  y  $T_S$ ), puede completarse la caracterización termodinámica de la proteína, calculando las funciones  $\Delta H_D(T)$ ,  $\Delta C_p(T)$ ,  $\Delta S_D(T)$  y  $\Delta G_D(T)$  a la temperatura de 298.15 K.

## 3.7 DICROÍSMO CIRCULAR

### 3.7.1 FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA

El dicroísmo circular (DC) es una de las técnicas que engloba la espectroscopia de absorción. Se emplea en el estudio de moléculas orgánicas y, en particular, de los cambios conformacionales de proteínas y ácidos nucleicos en disolución (Duddeck, 1995; Nakanishi et al., 1994; Johnson, 1990) ya que esto facilita, a su vez, el seguimiento de dichos cambios inducidos por variaciones de temperatura, pH, presencia de cosolventes, unión de ligandos y cambios en el estado de asociación.

El fenómeno del dicroísmo circular se basa en la diferencia de absorción de la luz circularmente polarizada hacia la derecha e izquierda por parte de las moléculas asimétricas que son ópticamente activas, también llamadas quirales. La quiralidad es una propiedad universal de los sistemas biológicos, como los aminoácidos, que generalmente presentan configuración L, los nucleótidos, que contienen los azúcares D-ribosa y D-desoxirribosa y los carbohidratos con configuraciones D ó L. Los tres sistemas anteriores son las unidades que constituyen las proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos.

Cada uno de los tipos de luz circularmente polarizada (a derecha e izquierda) sigue la ley de Lambert-Beer. Según esto, un espectro de DC para una muestra de un compuesto dado puede definirse inicialmente mediante la diferencia entre las absorbancias que presenta para estas dos formas de luz polarizada, en función de la longitud de onda,  $\lambda$ :

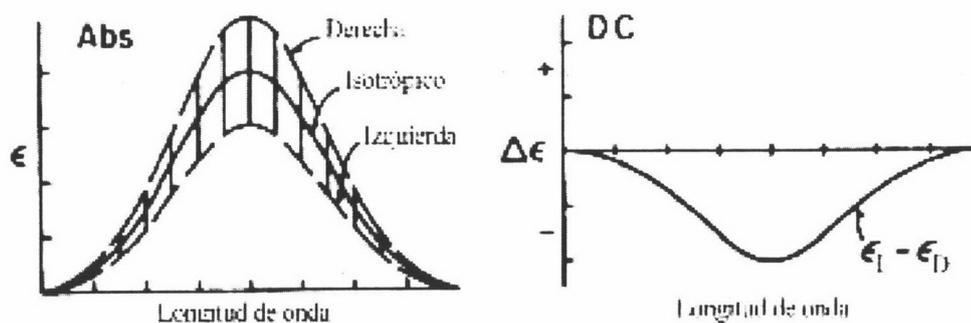
$$\Delta\text{Abs}(\lambda) = \text{Abs}_I(\lambda) - \text{Abs}_D(\lambda) = [\epsilon_I(\lambda) - \epsilon_D(\lambda)] \cdot c \cdot l \quad (3.7.1)$$

$$\Delta\text{Abs}(\lambda) = \Delta\epsilon \cdot c \cdot l$$

donde  $\text{Abs}_I$  y  $\text{Abs}_D$  corresponden a las absorbancias correspondientes a la muestra para la luz circularmente polarizada a la izquierda y derecha respectivamente,  $c$  es la concentración de la muestra expresada en  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $l$  es la longitud del paso de luz de la cubeta en cm, y  $\epsilon_I$  y  $\epsilon_D$  los coeficientes de extinción molar en  $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  para cada tipo de luz.

Las bandas de un espectro de DC pueden ser negativas o positivas, dependiendo de qué tipo de luz se absorba más y sólo se dan a longitudes de onda correspondientes a las bandas de absorción normales (Figura 3.7.1).

Actualmente, los instrumentos que se utilizan para realizar estudios mediante DC reciben el nombre de espectropolarímetros y miden de forma directa la diferencia de



**Figura 3.7.1:** *A. Comparación de los esquemas correspondientes a los espectros de absorción de la luz isotrópica, y polarizada circularmente a derecha o izquierda para una molécula quiral. B. Espectro de DC equivalente a la diferencia entre los coeficientes de extinción de la luz circularmente polarizada a izquierda y derecha.*

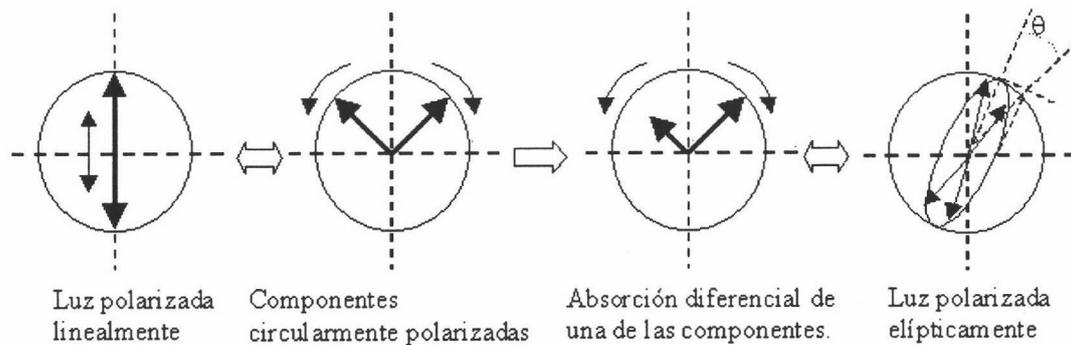
absorbancia  $\Delta\text{Abs}(\lambda)$ . Sin embargo, las primeras medidas de DC empleaban una técnica óptica diferente. Cuando la luz polarizada plana incide sobre una muestra que exhibe DC, las dos componentes circularmente polarizadas que la componen se absorben en diferente magnitud. El DC es proporcional a la excentricidad de la elipse que caracteriza la luz polarizada resultante. La elipticidad,  $\theta$ , es una medida angular de esta excentricidad y constituye la forma original para detectar la medida de DC (Figura 3.7.2). Por razones históricas, la mayoría de los instrumentos comerciales están calibrados en unidades de elipticidad ( $\theta$ ). Generalmente los espectros de DC se expresan en términos de elipticidad molar  $[\theta]$  en  $\text{grados} \cdot \text{dmol}^{-1} \cdot \text{cm}^2$ . Su relación con la diferencia entre los coeficientes de extinción molar viene dada por la relación:

$$[\theta] = 3298 \cdot \Delta\epsilon \quad (3.7.2)$$

que incluye un factor de 100 debido a la conversión de la concentración en  $\text{mol/L}$  a  $\text{dmol/cm}^3$ .

### 3.7.2 INSTRUMENTACIÓN

Como se ha citado en la sección anterior, el instrumento que se utiliza actualmente en la medida del DC recibe el nombre de espectropolarímetro. En el espectropolarímetro se genera un haz de luz monocromática y polarizada linealmente mediante la acción de un monocromador y un polarizador. El instrumento utiliza un modulador fotoeléctrico de alta frecuencia capaz de generar la luz circularmente polarizada a derecha e izquierda (que se alternan a frecuencias de unos 50 kHz) a partir de la luz linealmente polarizada. Este haz

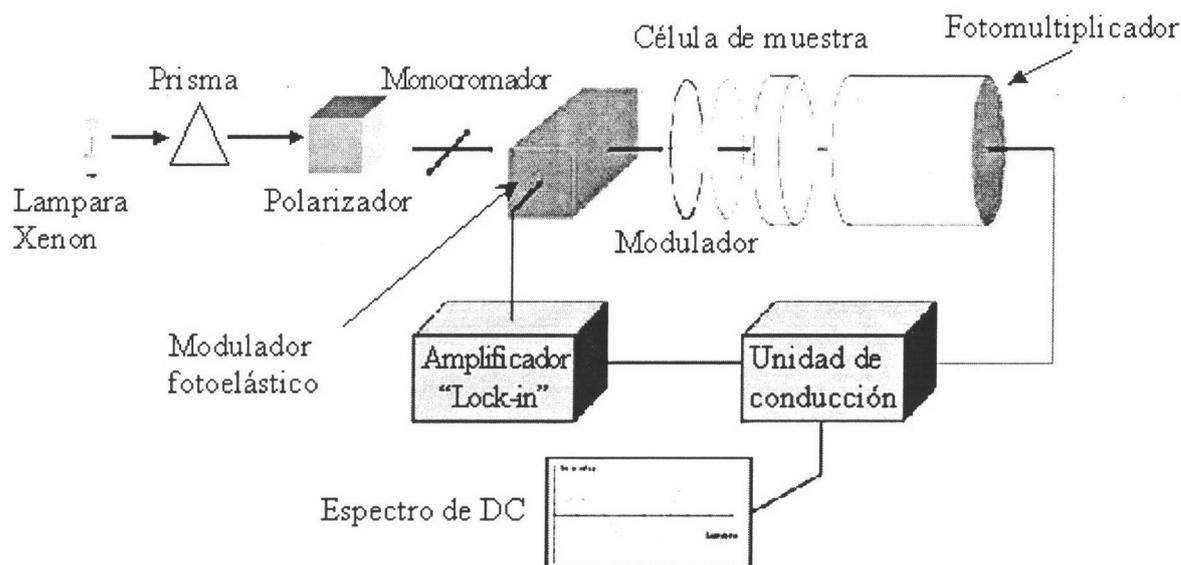


**Figura 3.7.2:** Variación de la elipticidad de la luz polarizada en sentido creciente en función de la absorción diferencial de las componentes circularmente polarizadas.

alternante de la luz polarizada circularmente incide sobre la muestra, que se encuentra contenida en una célula de cuarzo, y posteriormente se detecta mediante un fotomultiplicador. La señal que éste genera se compone de un valor elevado de señal de corriente continua que es proporcional a la intensidad de luz no absorbida que emerge de la muestra; superpuesta a esta señal existe una corriente alterna proporcional a la señal de DC. Estas dos componentes se separan y la señal continua se emplea para controlar el voltaje del fotomultiplicador. En la Figura 3.7.3 se muestra un esquema con los componentes de un espectropolarímetro.

En el caso de los experimentos de DC que se han realizado para esta memoria, el espectropolarímetro que se ha utilizado ha sido un Jasco, modelo J-715, de la casa comercial Japan Co., equipado con un control de la temperatura del compartimento de células y controlado por ordenador.

El control de la temperatura del compartimento de la célula se lleva a cabo mediante un sistema de control modelo PTC-348WI, cuyo funcionamiento se basa en el efecto Peltier, y se controla directamente desde el ordenador del instrumento. La temperatura de la muestra se mide en el interior del compartimento de la célula a través de un sensor consistente en una sonda de resistencia de platino (modelo PT-100) que tiene una precisión de  $\pm 0.2$  °C. Este sensor puede colocarse bien en contacto con el compartimento de la célula (portacélulas) o bien en el interior de la propia cubeta de medida, en contacto directo con la muestra, en caso de utilizar cubetas que necesiten emplear volúmenes de muestra superiores a 0.5 mL (cubeta de paso de luz de 1 cm). En este caso es necesario introducir también dentro de la cubeta un agitador magnético pequeño, cuando se lleven a cabo barridos de temperatura, que permita agitar la disolución de forma continua para evitar la aparición de gradientes de temperatura en la misma. Este programa de barrido de temperatura que permite seguir de forma continua los



*Figura 3.7.3: Esquema representativo de los componentes de un espectropolarímetro.*

cambios en la señal de DC producidos por cambios en la temperatura está incluido dentro del programa de control de temperatura. Es posible realizar barridos de temperatura a velocidad constante, en el intervalo de 0.5 a 5 °C/min, entre - 10 °C y 110 °C.

Las cubetas que se utilizan para las medidas de DC son cubetas de cuarzo de forma cuadrada, que difieren en la longitud del paso de luz. Ésta se escoge en función de la concentración de la muestra y del intervalo de longitud de onda seleccionado para las medidas. En el caso de los espectros y barridos de temperatura recogidos para la proteína circular AS-48, en la región del ultravioleta lejano, las cubetas utilizadas han sido las correspondientes a 0.1 y 0.2 cm de paso de luz.

### 3.7.3 ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS

Como ya se ha mencionado anteriormente, el dicroísmo circular proporciona información acerca de las propiedades conformacionales de las moléculas biológicas. Así, informa de la estructura, que incluye estructura secundaria (UV-lejano) y terciaria (UV-cercano), así como del grado de movilidad de ciertos compuestos. También se obtiene información de las transiciones conformacionales en los procesos de desplegamiento y

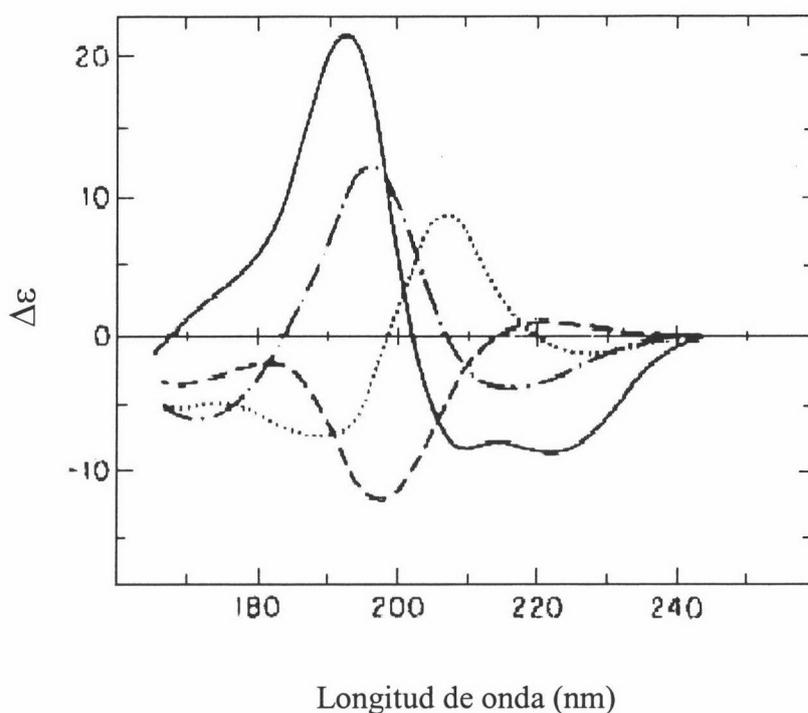
replegamiento de las proteínas y de los cambios conformacionales inducidos por la unión de pequeñas moléculas como substratos, coenzimas, etc.

De todas formas, el análisis procedente de los estudios de DC no proporciona información absoluta sobre la estructura de las proteínas, ya que en éstas coexisten una gran variedad de grupos cromóforos capaces de originar señal de DC y que a su vez se encuentran asimétricamente perturbados por los grupos vecinos. Dentro de estos grupos cromóforos, el que presenta mayor contribución en los espectros de DC es el enlace peptídico, que presenta una gran variedad de conformaciones, según su localización dentro de la proteína. La suma de los espectros de cada grupo cromóforo en cada una de sus conformaciones posibles origina el espectro de DC que se obtiene experimentalmente. No obstante, para la determinación de estos cambios conformacionales es necesario comparar con los espectros de compuestos estándar de estructura conocida mediante difracción de rayos X o resonancia magnética nuclear (RMN).

Las bandas observadas de DC para las proteínas tienen lugar en dos regiones del espectro electromagnético. Por una parte, la región del ultravioleta lejano, comprendida entre 170 y 250 nm de longitud de onda, que está dominada como se ha mencionado en el párrafo anterior por la contribución de los enlaces peptídicos (aunque pueden contribuir en mayor o menor grado otros cromóforos). En segundo lugar, en la región del ultravioleta cercano, entre 250 y 300 nm, la señal de DC se debe a la contribución de los aminoácidos que contienen grupos aromáticos en sus cadenas laterales. Ambas regiones proporcionan información diferente y complementaria sobre la estructura de las proteínas que será analizada a continuación.

### **3.7.3.1 Región del ultravioleta lejano**

Los espectros recogidos dentro de la región del ultravioleta lejano para las proteínas representan la absorción de los grupos amida, y son el resultado de dos transiciones electrónicas distintas que tienen lugar a longitudes de onda mayores de 180 nm. (Peterson & Simpson, 1957; Nielsen & Schellman, 1967). La transición  $n\pi^*$  es típica de compuestos carbonílicos y corresponde a la transición de un electrón desde un orbital no enlazante del oxígeno carbonílico al orbital  $\pi^*$  antienlazante del grupo amida. Esta es una transición prohibida que no se suele observar como banda de absorción discreta al ser muy débil y está



**Figura 3.7.4:** Representación conjunta de los espectros correspondientes a cuatro situaciones de estructura secundaria, en el intervalo de longitud de onda comprendido entre 178 y 260 nm: Hélice alfa(—), lámina beta (—●—●—●—), giro beta (●●●●●●) y estructura desordenada (---) (Brahms & Brahms, 1980).

cerca de la transición más fuerte,  $\pi\pi^*$ . Ésta se observa en torno a los 120 nm en las amidas secundarias y cerca de los 200 nm en las amidas terciarias y se produce mediante la transición de un electrón del orbital  $\pi$  ocupado de mayor energía hacia el orbital  $\pi^*$ . Todas estas transiciones mencionadas poseen una intensidad y energía que depende de los ángulos diedros  $\phi$  y  $\psi$  que determinan la estructura secundaria. Así, la espectroscopía de DC en esta región presenta una gran sensibilidad a los cambios en los diferentes elementos que constituyen la estructura secundaria de las proteínas globulares pequeñas: hélices alfa, láminas beta plegadas, giros beta y estructuras aleatorias (Compton & Johnson, 1986). En la Figura 3.7.4 se representan los espectros típicos de cada una de ellos y se observa que estos espectros difieren entre sí en una medida suficiente como para determinar el contenido de estas estructuras en la proteína.

La determinación de la estructura secundaria de las proteínas a partir de los espectros obtenidos mediante DC en la región del ultravioleta lejano se basa en su ajuste por mínimos cuadrados a partir de la combinación lineal de un conjunto de espectros de DC utilizados como referencia y correspondientes a polipéptidos sintéticos que contienen las diferentes

estructuras secundarias (Brahms & Brahms, 1980; Greenfield & Fasman, 1969). La validez de este método ha sido cuestionada, debido a que los elementos estructurales de las proteínas reales pueden diferir significativamente de los encontrados en los polipéptidos modelo ideales. De hecho, la intensidad del espectro de DC para una hélice varía en función de su longitud. También pueden encontrarse diferencias debidas a contribuciones de los enlaces disulfuro y aminoácidos aromáticos producidas por transiciones de tipo  $\pi\pi^*$  permitidas en la región del ultravioleta lejano. Como contrapartida, existen otros métodos que se emplean en el análisis de los espectros de DC basados en la combinación lineal de los espectros obtenidos para proteínas de estructura conocida mediante difracción de rayos X ó RMN (Provencher & Glöckner, 1981; Chen & Yang, 1971). Aún así, los métodos más recientes utilizan algoritmos matemáticos capaces de descomponer un conjunto de espectros de proteínas de estructura conocida generando unas pocas contribuciones para los diferentes tipos de estructura secundaria. Dichas contribuciones son variables y se escogen de forma tal que el espectro de la proteína problema pueda ser descrito correctamente dentro del ruido experimental (Perczel et al., 1992; Manavalan & Johnson, 1987).

### **3.7.3.2 Región del ultravioleta cercano**

Los cambios en la estructura terciaria de las proteínas globulares pueden determinarse a partir de la obtención de los espectros de DC de las mismas en la región del ultravioleta cercano, comprendida entre 250 y 300 nm, según se ha indicado anteriormente en esta sección. El origen está en la absorción por parte de los grupos cromóforos que se encuentran en las cadenas laterales de algunos aminoácidos. Las transiciones electrónicas para la mayoría de dichas cadenas comienzan a darse a longitudes de onda menores de 190 nm. Aún así, la primera banda de absorción de las cadenas laterales de los aminoácidos tirosina, triptófano, fenilalanina y cisteína comienza a observarse a 290 nm aproximadamente. De todos ellos, el triptófano presenta la banda de absorción más intensa con un máximo de absorción a 282 nm. La formación de un puente de hidrógeno con el grupo indol puede desplazar dicha banda hasta un valor de 12 nm hacia el rojo. La tirosina presenta una banda de absorción, de menor intensidad que el triptófano, con un máximo a 276 nm, acompañada de un hombro a 283 nm. La formación de un puente de hidrógeno por el grupo fenólico produce un desplazamiento de la banda de nuevo hacia el rojo de hasta 4 nm. Por último, la fenilalanina presenta la contribución menos significativa al espectro de DC, debido a su bajo coeficiente de extinción

molar y a la baja sensibilidad que presenta frente a los cambios en su entorno con máximos a 254, 256, 262, y 267 nm. Por otra parte, las cadenas laterales de los residuos aromáticos anteriores tienen bandas de DC débiles localizadas entre 290 y 250 nm, propias de sus entornos estructurales. Estas bandas se observan cuando las cadenas laterales se encuentran inmovilizadas en un entorno asimétrico, típico de la estructura terciaria de las proteínas. El espectro de DC de una proteína en el ultravioleta cercano, no puede analizarse cuantitativamente, ya que depende del entorno asimétrico concreto de cada cromóforo. A pesar de ello, este espectro es muy sensible como observable a pequeños cambios en la estructura terciaria y representa una verdadera huella dactilar para la conformación plegada de una proteína.

### 3.7.4 OBTENCIÓN DE ESPECTROS

Los experimentos de DC que se han llevado a cabo dentro de esta memoria han servido para estudiar el comportamiento y la estabilidad de la proteína circular AS-48 en presencia y ausencia de agentes desnaturalizantes (urea y guanidina), realizando dos tipos de experimentos: desnaturalizaciones inducidas por cambios en la temperatura y titulaciones a temperatura constante de la muestra a diferentes concentraciones de agente desnaturalizante, en este caso guanidina. De forma análoga para ambos casos es necesario en primer lugar preparar las muestras que se van a utilizar para la obtención de los espectros de DC, así como de los barridos de temperatura realizados.

Se parte de una muestra liofilizada de AS-48, de la que se pesa la cantidad adecuada para obtener una concentración que esté en torno a 100  $\mu\text{M}$  después de disolverla en el tampón preparado a unas condiciones de fuerza iónica y pH determinadas, como se indica en el capítulo de Resultados de esta memoria. Se dializa la muestra frente a este tampón como se describe en la sección 3.4.1. A continuación se mide la concentración de esta disolución espectrofotométricamente (sección 3.4.3), obteniéndose así la disolución madre de proteína de concentración perfectamente conocida que se utiliza para preparar las muestras diluidas (entre 20 y 40  $\mu\text{M}$  de proteína) empleadas en los experimentos de DC. De forma simultánea se prepara la disolución de agente desnaturalizante como se indica en la sección 3.4.2. Las alícuotas conteniendo la misma concentración de proteína y diferentes concentraciones de agente desnaturalizante se preparan en todos los casos mezclando en un tubo un volumen fijo de la disolución madre de proteína y el volumen correspondiente de la disolución concentrada

de desnaturizante. Se completa hasta un volumen final (800  $\mu$ L) con el tampón del cambio de diálisis, previamente filtrado. Junto con éstas, se prepara una muestra que contenga la misma concentración de proteína que el resto y no contenga desnaturizante. Para cada una de las muestras anteriores, se prepara un blanco de forma análoga, sustituyendo el volumen de proteína por el volumen equivalente de tampón. Estos blancos se utilizarán como referencia para determinar la concentración de cada muestra. Las alícuotas preparadas, y sus blancos, a las diferentes concentraciones de desnaturizante, se dejan durante toda la noche a temperatura ambiente para que se alcance el equilibrio, antes de realizar los experimentos.

A la hora de comenzar las experiencias, se procede de forma análoga con cada muestra y su blanco antes de ser introducida en el compartimento de la muestra del espectropolarímetro. Se centrifuga durante 10 minutos en una centrífuga de mesa, a máxima velocidad. Este paso es muy importante para evitar que queden partículas en suspensión, en cuyo caso interferirían en las medidas de DC. A continuación se determina su concentración espectrofotométricamente frente al blanco correspondiente. Antes de comenzar el experimento se comprueba la concentración de desnaturizante en la muestra y su blanco (ambas deben de ser equivalentes) midiendo su índice de refracción, de la forma que se indica en las secciones 3.4.2.1 y 3.4.2.2. Una vez finalizado el experimento se medirán de nuevo los índices de refracción para comprobar que la concentración de desnaturizante en las correspondientes alícuotas no ha variado.

En primer lugar es necesario introducir la cubeta conteniendo el blanco (tampón del cambio de la diálisis, o este mismo tampón con disolución de desnaturizante) en el compartimento de la célula, para registrar un espectro que constituye la línea base. A continuación se registra el espectro de la disolución de la proteína bajo las mismas condiciones instrumentales. Posteriormente, en el tratamiento de datos, el espectro del blanco se sustraerá del espectro obtenido con la muestra de proteína para eliminar las diferentes contribuciones experimentales, así como la del disolvente del espectro de DC.

Para llevar a cabo los experimentos es conveniente utilizar siempre las mismas cubetas, colocadas dentro del compartimento de la célula siempre en la misma orientación a la hora de recoger los espectros. Para conseguir espectros con una buena relación señal-ruido, es necesario seleccionar la combinación adecuada de los siguientes parámetros: anchura de banda espectral, velocidad de barrido de longitud de onda y constante de tiempo. En este sentido, un incremento de la anchura de banda espectral mejora la relación señal-ruido, si no se requiere una resolución elevada del espectro de DC; el incremento en el tiempo de

respuesta del instrumento produce el mismo efecto, aunque depende del tiempo disponible para la adquisición de cada valor del espectro. En el manual de instrucciones del espectropolarímetro pueden encontrarse recomendaciones para la selección adecuada de estos parámetros. Además, el programa de adquisición de datos del espectropolarímetro permite realizar el promedio de  $N$  espectros de DC adquiridos de forma consecutiva, de forma que el nivel de ruido del espectro resultante de este promedio será  $N^{1/2}$  veces menor que el de cada espectro individual, ganándose sensibilidad. No obstante, es conveniente llegar a una situación de compromiso entre el número de espectros acumulados y el tiempo requerido para realizarlos. Una acumulación de cuatro espectros es aconsejable para la mayoría de los casos. Otra variable que es necesario tener en cuenta a la hora de adquirir los espectros es la relación entre la concentración de la muestra y el paso de luz de la célula. Para realizar una medida de DC es necesario que llegue luz al fotomultiplicador, de forma que el sistema electrónico del instrumento pueda procesar la señal que aquél genera para separar la componente alterna (señal de DC) de la señal continua, que controla la ganancia del fotomultiplicador (señal que se representa como HT en el modelo utilizado, Jasco 715). Si la absorbancia de la muestra es demasiado elevada, llegará muy poca luz al fotomultiplicador, provocando que el voltaje HT tienda a aumentar. Esto resulta en un aumento relativo del ruido asociado a la medida. Para facilitar el control de este voltaje, el instrumento proporciona un registro del voltaje HT durante la adquisición del espectro. El valor de HT debe permanecer durante cualquier medida por debajo de 600 voltios con el fin de mantener el ruido dentro de un nivel aceptable. Para conseguir esto, es necesario que las muestras empleadas presenten una absorbancia adecuada, generalmente entre 1 y 2. Para ello puede ajustarse la concentración de la muestra o el paso de luz de la cubeta de medida según el intervalo de longitud de onda en el que se trabaje. Así, en el intervalo de longitud de onda que comprende la región del ultravioleta lejano (entre 190 y 250 nm), el coeficiente de extinción del grupo amida peptídico es bastante elevado, con lo que las concentraciones de muestra que se requieren no son elevadas. Si la concentración de la muestra fuese una variable que necesariamente hubiera de fijarse, entonces se reduciría el paso de luz de la cubeta de medida. En nuestro caso se han utilizado las cubetas de paso de luz 0.1 cm ó 0.2 cm y concentraciones en el intervalo entre 20 y 40  $\mu\text{M}$ . En el caso de la región del ultravioleta cercano, entre 320 y 250 nm, el coeficiente de extinción de las bandas de absorción de los grupos aromáticos es menor, hecho que hace posible utilizar cubetas de paso de luz equivalente a 1 cm y concentraciones de muestra en torno a 100  $\mu\text{M}$ .

### 3.7.5 ESTUDIO DEL DESPLEGAMIENTO TÉRMICO DE PROTEÍNAS

El estudio del desplegamiento térmico mediante DC de la proteína circular AS-48 se ha estudiado en ausencia y en presencia de desnaturalizantes (urea y guanidina) registrando los cambios de elipticidad observados en la región del ultravioleta lejano, a una longitud de onda de 222 nm, al variar linealmente la temperatura de la muestra en un intervalo de 3 a 98 °C. En los experimentos llevados a cabo en esta memoria, la velocidad de barrido empleada ha sido de  $2 \text{ K}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Antes de comenzar cualquier barrido de temperatura se deja la cubeta con la muestra dentro un periodo de tiempo entre 10 y 15 minutos para equilibrar a la temperatura deseada la muestra o el blanco (este proceso se lleva a cabo siempre que se cambie el valor de la temperatura y se desee registrar un espectro de DC). A continuación se recoge un espectro a 25 °C. En el caso de la muestra de AS-48 se realizó en todos los casos un calentamiento previo hasta 55 °C con el fin de eliminar posibles agregados ya presentes antes de comenzar los experimentos (a esta temperatura, en ninguna de las condiciones experimentales estudiadas la proteína presenta una población del estado desplegado apreciable significativamente). A continuación se disminuye la temperatura hasta 3 °C en el instrumento registrando un espectro previo antes de comenzar el barrido de temperatura hasta 98 °C, a la velocidad de calentamiento seleccionada (2 K/min). Alcanzada esta temperatura, se enfría rápidamente hasta 3 °C para reducir la irreversibilidad causada por los fenómenos de oligomerización que tienen lugar a alta temperatura una vez se encuentra la proteína en el estado desnaturalizado. En estas condiciones se registra entonces un espectro para comprobar la reversibilidad del proceso de desplegamiento, mediante la comparación de éste con el espectro registrado antes de comenzar el calentamiento. En algunos casos, con objeto de comprobar la formación de agregados a alta temperatura, se registró el espectro de DC a 98 °C, después de dejar la muestra durante 10 minutos a esta temperatura. Este proceso se lleva a cabo igual para las disoluciones del blanco de forma que la medida final en los barridos es la diferencia entre ambos. Durante todo el experimento, el control de la temperatura se lleva a cabo colocando el sensor de temperatura en el compartimento de la célula, es decir, en el bloque portacélulas, ya que es imposible introducirlo directamente en la cubeta en contacto directo con la disolución debido al pequeño paso de luz de aquella.

En el caso de las medidas llevadas a cabo en el ultravioleta cercano, en ausencia y en presencia de urea y guanidina, las medidas se hicieron en una cubeta de 1 cm de camino

óptico. En este caso el sensor de temperatura se introdujo directamente en la cubeta de medida en contacto con la disolución de muestra. Con objeto de minimizar los gradientes de temperatura se agitó mediante un pequeño imán accionado por un agitador magnético acoplado al compartimento de la célula. En estas condiciones experimentales, la temperatura de la muestra se conoce en cada instante y se registra de forma adecuada.

### 3.7.6 TITULACIÓN CON DESNATURALIZANTES

Una curva de titulación típica de una proteína que despliega según el modelo de dos estados suele presentar forma de "S". La estrategia general para obtener una curva de titulación, en presencia de un agente desnaturalizante, puede llevarse a cabo de dos formas distintas:

En primer lugar pueden prepararse diferentes muestras en el mismo tampón conteniendo cada una de ellas igual concentración de proteína y diferentes concentraciones de desnaturalizante. A continuación, se registra el espectro correspondiente de DC a la temperatura escogida para cada una de las muestras preparadas.

La segunda opción puede llevarse a cabo si se dispone de una unidad de titulación automática acoplada al espectropolarímetro, compuesta por dos jeringas de 2.5 mL de capacidad colocadas en un boque en posición vertical. El control de las mismas se lleva a cabo desde el PC haciendo uso del programa adecuado que incluye el sistema. Ambas jeringas están conectadas al compartimento de la célula, de forma que es posible dejar pasar su contenido al interior de la cubeta introduciendo en la disolución directamente dos conectores que se adaptan al tapón de ésta. La cubeta que se utiliza en este tipo de experimentos es la que corresponde a 1 cm de paso de luz, para que sea posible introducir un pequeño agitador magnético que permita mantener la disolución homogénea en cada instante de la titulación. La idea básica consiste en preparar por una parte la disolución de proteína en el tampón a la concentración deseada para el experimento, y por otra una disolución de desnaturalizante concentrada, conteniendo idéntica concentración de proteína. La concentración de desnaturalizante de esta disolución inicial se determina de la forma descrita en la sección 3.4.2, donde  $\Delta n$  es en este caso la diferencia entre el índice de refracción de la

disolución de proteína en desnaturizante y el correspondiente a la disolución de la proteína en tampón.

El fundamento del experimento se basa en colocar en el compartimento de célula la cubeta de medida, como se ha descrito en el párrafo anterior, conteniendo un volumen conocido de la disolución de proteína a la concentración deseada para el experimento, preparada en condiciones nativas. El sistema de jeringas se prepara de forma tal que una de las jeringas esté vacía inicialmente, mientras que la otra contiene la disolución concentrada de desnaturizante y proteína. El experimento consiste en registrar un espectro inicial de la proteína antes de comenzar la titulación (en ausencia de desnaturizante). A partir de aquí, se registran los espectros correspondientes a un número determinado de adiciones de igual volumen en la célula de medida, de forma que en cada una de ellas se retira primero desde la cubeta hacia la jeringa inicialmente vacía un volumen equivalente al que seguidamente se adiciona desde la jeringa que contiene el desnaturizante. Se deja entonces un tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio (en nuestro caso se comprobó que 2 minutos es tiempo suficiente). Lo que se pretende operando en esta manera es conseguir que en la cubeta no varíe la concentración de proteína en ningún momento, mientras que la concentración de desnaturizante aumenta en cada adición respecto a la adición anterior.

Alternativamente, puede llevarse a cabo la experiencia de forma inversa, de manera que la cubeta de medida contiene una disolución de proteína (de igual concentración que la utilizada en el primer experimento) a alta concentración en desnaturizante y la jeringa que antes contenía esta disolución, contiene en su lugar la disolución de proteína en el tampón. El objeto de realizar esta experiencia alternativa se basa en obtener un mayor número de puntos a altas concentraciones de desnaturizante y, por otra parte, es una estrategia válida para comprobar que las medidas se están realizando una vez alcanzado el equilibrio en la disolución contenida en la cubeta de medida lo que indica en nuestro caso que un tiempo de espera de 2 minutos, antes de registrar las medidas, después de cada adición, es suficiente para ello.

En definitiva, la curva completa de titulación corresponde al cambio de la señal registrada (elipticidad) en función de la concentración de desnaturizante que se produce observando la variación de dicha señal a una longitud de onda determinada en cada uno de los espectros de DC tomado a las diferentes concentraciones de desnaturizante. El método experimental descrito en su totalidad, permite construir la curva completa de titulación, ya que el experimento se inicia a concentración cero de desnaturizante, aumentándose en cada

adición la concentración de éste hasta altas concentraciones (o en el método alternativo, dibujando la curva en dirección contraria).

A continuación es preciso determinar la concentración de desnaturalizante en la cubeta de medida para las diferentes adiciones realizadas a lo largo del experimento. Cualquier error cometido en estas concentraciones conduce a errores en las curvas de titulación correspondientes. Por esta razón, una forma de comprobar que en este sentido el experimento se ha realizado con éxito consiste en determinar las concentraciones de desnaturalizante al comienzo y final de la experiencia en la cubeta de medida y jeringa que contiene la disolución de desnaturalizante. El cálculo de las concentraciones de desnaturalizante de las curvas de titulación se realiza de forma sencilla. En el caso de tener inicialmente la disolución de proteína en tampón en la cubeta de medida la fórmula que se aplica es la siguiente:

$$[\text{den}]_n = \frac{[\text{den}]_{(n-1)} \cdot (V_t - V_{a,(n-1)})}{V_t} + [\text{den}]_{a,n} \quad (3.7.3)$$

donde  $[\text{den}]_n$  representa la concentración de desnaturalizante total en la cubeta de medida en una adición  $n$ ,  $[\text{den}]_{(n-1)}$  es la concentración de desnaturalizante total en la cubeta en la adición anterior,  $n-1$ ,  $V_t$  es el volumen total en la cubeta en la adición  $n-1$ ,  $V_{a,(n-1)}$  es el volumen de disolución retirado de la cubeta antes de realizar la adición  $n-1$  y  $[\text{den}]_{a,n}$  la concentración de desnaturalizante adicionada referida a la cubeta.

Para el caso alternativo en el que la cubeta de medida contiene la disolución de proteína en desnaturalizante, la expresión se simplifica:

$$[\text{den}]_n = \frac{[\text{den}]_{(n-1)} \cdot (V_t - V_{a,(n-1)})}{V_t} \quad (3.7.4)$$

Obtenidas las curvas, el paso siguiente consiste en procesar los datos como se describe en la siguiente sección.

Los experimentos de titulación en presencia de guanidina realizados a varias temperaturas que se presentan en esta memoria se realizaron en el laboratorio del Dr. Serrano (EMBL, Heidelberg) en un espectropolarímetro de iguales características al descrito en el apartado 3.7.2, que cuenta además con un sistema de titulación automático de la casa comercial HAMILTON. En este caso, la concentración de proteína utilizada en las disoluciones preparadas fue de  $3 \mu\text{M}$ , en relación al espesor de la cubeta utilizada (1 cm) para no saturar la señal de DC obtenida. Las curvas experimentales obtenidas en nuestro caso para la proteína AS-48 (sección de Resultados) corresponden al método de titulación alternativo

descrito anteriormente, para obtener una curva completa de titulación, dada la alta estabilidad de esta proteína frente a la adición de desnaturalizantes.

### 3.7.7 PROCESAMIENTO DE DATOS

Una vez registrado un espectro de DC o un barrido de temperatura de una muestra y su blanco, lo que constituye la línea base, es necesario realizar el procesamiento de los datos. En primer lugar hay que sustraer a cada espectro o termograma de la muestra el correspondiente al tampón. En segundo lugar hay que normalizar las unidades ya que la medida de elipticidad ( $\theta$ ) que proporciona el instrumento viene dada en milésimas de grado, y normalmente el valor de la elipticidad se expresa como elipticidad molar media por residuo ( $[\theta]_{\text{MMR}}$ ) que viene dada en  $\text{grado} \cdot \text{dmol}^{-1} \cdot \text{cm}^2$ , para lo cual se utiliza la siguiente ecuación:

$$[\theta]_{\text{MMR}} = \theta \cdot P_m / c \cdot l \cdot n \cdot 10 \quad (3.7.5)$$

donde  $\theta$  es la elipticidad medida experimentalmente en milésimas de grado,  $P_m$  es el peso molecular de la proteína,  $n$  es el número de aminoácidos de la misma,  $c$  es la concentración de la proteína expresada en  $\text{mg/mL}$ ,  $l$  es el paso de luz de la cubeta de medida. El factor 10 es el resultado de convertir las unidades de concentración de  $\text{mg/mL}$  a  $\text{dmol/cm}^3$  y la elipticidad a grados a partir de las unidades obtenidas experimentalmente.

En estas condiciones, se aplican los modelos de equilibrio a las curvas obtenidas experimentalmente para determinar los parámetros termodinámicos que rigen la estabilidad de esta proteína.

### 3.7.8 ANÁLISIS DE LAS CURVAS DE TITULACIÓN EN PRESENCIA DE DESNATURALIZANTES

Las curvas de titulación inducidas por la presencia de agentes desnaturalizantes, pueden analizarse con el modelo de equilibrio de dos estados. En la Figura 4.2.9 de la sección de Resultados se representan un conjunto de curvas típicas de desnaturalización obtenidas para la proteína AS-48 que pueden describirse según este modelo.

Para analizar las curvas de titulación aplicando el modelo de dos estados es necesario definir en primer lugar las líneas base de los estados nativo y desnaturalizado. Estos dos estados se caracterizan por tener una variación de elipticidad con la concentración de

desnaturalizante,  $c_{den}$ , prácticamente lineal, definida por dos funciones lineales,  $\theta_{222,N}$  y  $\theta_{222,D}$  para los estados nativo y desnaturalizado respectivamente según las ecuaciones:

$$\theta_{222,N} = \theta_{N,0} + m_N \cdot c_{den} \quad (3.7.6)$$

$$\theta_{222,D} = \theta_{D,0} + m_D \cdot c_{den} \quad (3.7.7)$$

donde  $\theta_{N,0}$  y  $m_N$ , por una parte, y  $\theta_{D,0}$  y  $m_D$  por otra, representan las respectivas ordenadas en el origen y pendientes. El subíndice “den” se refiere en general a los desnaturalizantes urea (“u”) y guanidina (“gu”). El observable experimental elipticidad en función de la concentración de desnaturalizante viene dado por la ecuación:

$$\theta_{222} = \theta_{222,N} \cdot x_N + \theta_{222,D} \cdot x_D \quad (3.7.8)$$

en la que las fracciones  $x_N$  y  $x_D$  están determinadas por el valor de una constante de equilibrio entre los dos estados definidos,  $K(T, c_{den})$ , definida de forma análoga a la de la ecuación 3.6.7 descrita en la sección 3.6, para el modelo de equilibrio de dos estados. Si expresamos  $x_D$  en función de  $K(T, c_{den})$  de forma igual a como se hace en la ecuación 3.6.8, podemos escribir la ecuación 3.7.8 en función de esta constante:

$$\theta_{222} = [\theta_{222,N} + \theta_{222,D} \cdot K(T, c_{den})] / [1 + K(T, c_{den})] \quad (3.7.9)$$

A su vez,  $K(T, c_{den})$  se define en este caso con la siguiente ecuación:

$$K(T, c_{den}) = \exp [-\Delta G(T, c_{den}) / R \cdot T] \quad (3.7.10)$$

Por otra parte, el cambio de la energía de Gibbs que se produce durante el desplegamiento de una proteína en presencia de un agente desnaturalizante, engloba dos términos como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\Delta G(T, c_{den}) = \Delta G_D(T) + \Delta G_b(T, c_{den}) \quad (3.7.11)$$

El primero de estos términos,  $\Delta G_D$ , representa el cambio de energía de Gibbs en ausencia de desnaturalizante, mientras que el segundo,  $\Delta G_b$ , es el término que depende de la unión a la molécula de desnaturalizante. Para llevar a cabo el análisis de las curvas de titulación, en presencia de un desnaturalizante a una temperatura dada, este término se ha descrito en la literatura de diferentes formas (Pace, 1986). En el caso de los experimentos de titulación realizados como se ha descrito en la sección 3.7.6 la dependencia del cambio de elipticidad seguido a 222 nm ( $\theta_{222}$ ) frente a la concentración de desnaturalizante, expresada en términos de molaridad (y/o actividad) a temperatura fija, origina una curva de titulación. Las curvas de titulación pueden analizarse haciendo uso de dos modelos frecuentemente utilizados para el estudio del desplegamiento inducido por la presencia de desnaturalizantes según una

transición de dos estados en equilibrio (sección 3.6.5). Estos modelos se conocen como MEL (modelo de extrapolación lineal) y MUD (modelo de unión al desnaturizante) (Pace, 1986).

### **A) MODELO DE EXTRAPOLACIÓN LINEAL (MEL)**

Es el más sencillo de los dos y el más empleado como método de aproximación de los datos experimentales. Con esta aproximación, la dependencia del cambio de energía de Gibbs de una titulación isotérmica con la concentración de desnaturizante se representa con la siguiente ecuación:

$$\Delta G(T, c_{den}) = \Delta G_D(T) - m_{den} \cdot c_{den} \quad (3.7.12)$$

donde  $c_{den}$  representa la concentración molar de desnaturizante, y  $m_{den}$  es un factor de proporcionalidad. El punto medio de la curva de titulación representa aquella concentración de desnaturizante,  $C_{m,den}$ , a la que el 50 % de la población de la proteína total presente en la muestra se encuentra en estado nativo y el 50 % restante en estado desnaturizado. En este punto se cumple además que  $\Delta G(T, c_{den}) = 0$ . A partir de la ecuación anterior,  $C_{m,den}$  se define como:

$$C_{m,den} = \Delta G_D(T) / m_{den} \quad (3.7.13)$$

Con esta ecuación, podremos expresar el cambio total de energía de Gibbs del desplegamiento en función de  $C_{m,den}$  despejando el valor de  $m_{den}$  y sustituyendo en la ecuación 3.7.12 para obtener la siguiente ecuación:

$$\Delta G(T, c_{den}) = \Delta G_D(T) \cdot (1 - c_{den} / C_{m,den}) \quad (3.7.14)$$

### **B) MODELO DE UNIÓN AL DESNATURIZANTE (MUD)**

Este modelo corresponde al caso de unión de un desnaturizante a sitios de unión idénticos e independientes. El cambio de energía de Gibbs debido al desplegamiento se describe mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta G(T, c_{den}) = \Delta G_D(T) - \Delta n_{b,den} \cdot R \cdot T \cdot \ln [1 + K_b(T) \cdot a_{den}(T)] \quad (3.7.15)$$

en ella,  $a_{den}$  es la actividad del desnaturizante,  $K_b$  es la constante de unión por sitio y  $\Delta n_{b,den}$  es el número de sitios de unión al desnaturizante que se originan como consecuencia del desplegamiento.

Este segundo modelo presenta dos desventajas frente al modelo de aproximación lineal: en primer lugar introduce un parámetro independiente adicional,  $K_b$ , que es preciso

determinar a priori. En segundo lugar, es necesario trabajar en términos de actividades en lugar de utilizar concentraciones molares para el desnaturalizante.

La aplicación de esta aproximación al caso de AS-48 se describe con más detalle en la sección de Resultados.

### 3.7.9 ANÁLISIS DE LAS CURVAS DE DESPLEGAMIENTO TÉRMICO EN PRESENCIA DE DESNATURALIZANTES

Un termograma típico obtenido por DC, de una proteína que despliega siguiendo el modelo de dos estados se muestra en la Figura 3.7.5.

Al igual que en el caso de las curvas de titulación descritas anteriormente, las curvas de desplegamiento térmico pueden analizarse aplicando el modelo de dos estados, de forma análoga a como se describe en la sección anterior, obteniéndose relaciones similares a las ecuaciones generales:

$$\Delta G_D(T) = \Delta H_m \left( 1 - \frac{T}{T_m} \right) + \Delta C_p \left[ T - T_m - T \cdot \ln \left( \frac{T}{T_m} \right) \right] \quad (3.7.16)$$

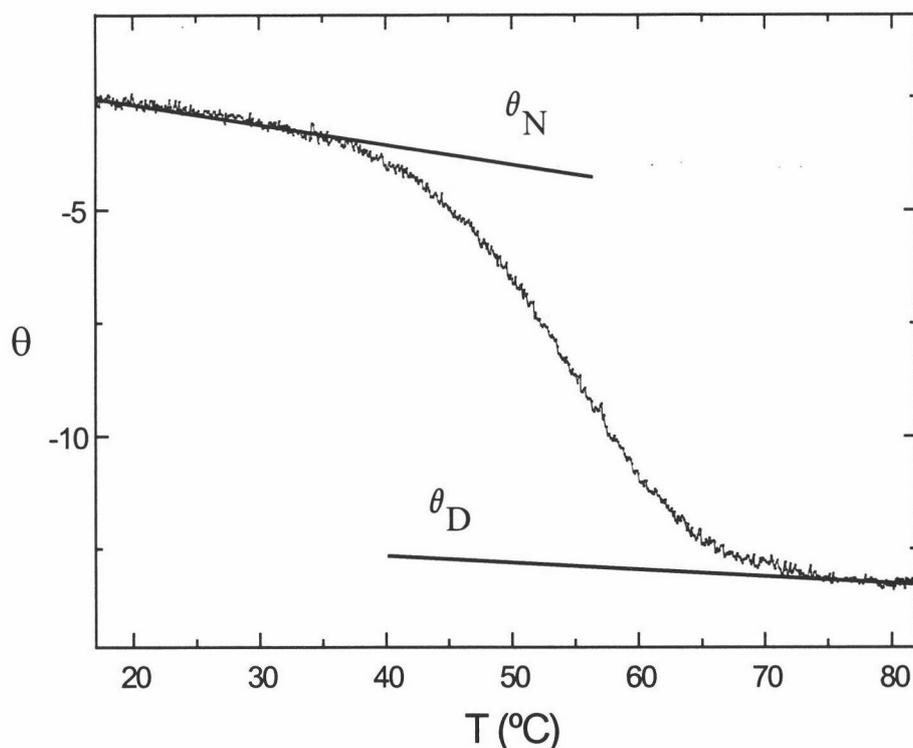
$$\Delta G_D(T) = \Delta C_p \left[ T - T_H - T \cdot \ln \left( \frac{T}{T_S} \right) \right] \quad (3.7.17)$$

Por otra parte, un proceso de desnaturalización térmicamente inducido puede describirse considerando al desnaturalizante como uno de los factores de la disolución que afectan a la estabilidad de la proteína. De esta forma, y suponiendo que a cualquier concentración de desnaturalizante el cambio de capacidad calorífica debido al desplegamiento,  $\Delta C_{p,den}$ , permanece constante con la temperatura, las expresiones correspondientes a los cambios de energía de Gibbs, entalpía y entropía, en presencia de desnaturalizante se definen con expresiones análogas a las descritas para el modelo de dos estados (sección 3.6.5):

$$\Delta G_{den}(T) = \Delta C_{p,den} \left[ T - T_{H,den} - T \ln(T/T_{S,den}) \right] \quad (3.7.18)$$

$$\Delta G_{den}(T) = \Delta H_{m,den} \left( 1 - \frac{T}{T_{m,den}} \right) + \Delta C_{p,den} \left[ T - T_{m,den} - T \cdot \ln \left( \frac{T}{T_{m,den}} \right) \right]$$

$$\Delta H_{den}(T) = \Delta H_{m,den} + \Delta C_{p,den} (T - T_{m,den}) \quad (3.7.19)$$



**Figura 3.7.5:** Curva de desplegamiento inducida por la temperatura típica de DC en el que se representa la elipticidad en función de la temperatura a una determinada longitud de onda para una proteína que despliega supuestamente siguiendo el modelo de dos estados. Los estados nativo, N, y desnaturalizado, D, corresponden a las regiones de menor y mayor temperatura respectivamente y muestran una variación aproximadamente lineal de la elipticidad ( $\theta$ ) con la temperatura.

$$\Delta S_{\text{den}}(T) = \frac{\Delta H_{\text{m,den}}}{T_{\text{m,den}}} + \Delta C_{\text{p,den}} \ln\left(\frac{T}{T_{\text{m,den}}}\right) \quad (3.7.20)$$

donde  $\Delta C_{\text{p,den}}$  no tiene por qué ser necesariamente igual al valor de  $\Delta C_{\text{p}}$ .

El análisis de las curvas de desnaturalización térmica en presencia de desnaturalizantes se realiza aplicando estas ecuaciones y llevando a cabo un proceso de ajuste no lineal de mínimos cuadrados sobre las curvas experimentales obtenidas, asumiendo en el caso más sencillo que el valor de  $\Delta C_{\text{p,den}}$  es independiente del cambio de temperatura. Dicho análisis puede llevarse a cabo de forma múltiple, tal como se ha hecho en el caso de los datos obtenidos para la proteína AS-48 presentados en la sección de Resultados. La idea básica en este tipo de análisis consiste en tomar un conjunto de datos experimentales, en este caso un conjunto de curvas de desnaturalización inducida por la temperatura a diferentes concentraciones de desnaturalizante, y seleccionar de forma adecuada uno o varios parámetros comunes en todas ellas, dentro del sistema de ecuaciones que forma parte del modelo aplicado. En el caso de obtener curvas de DC como, por ejemplo, las que se muestran

para la proteína AS-48 en presencia de urea o guanidina, en la sección de Resultados (Figuras 4.2.6 y 4.2.12) lo más sencillo es suponer una línea base común que describa los estados nativo y desplegado respectivamente para todas ellas. Para lograr disminuir el número total de parámetros ajustables en el análisis, se supone que la forma de la línea base que describe la función del estado nativo no depende de la concentración de desnaturalizante, pero sí su posición, representada por el término independiente de la ecuación correspondiente, y que se deja variable por esta razón, mientras que el resto de los coeficientes de la función permanecen fijos. En el caso de la función que describe el estado desplegado, que puede representarse por un polinomio de segundo grado de la temperatura, la posición de la línea base depende poco o nada de la concentración de desnaturalizante, ya que el estado desplegado consiste en un conjunto de conformaciones con estructura secundaria residual, independiente de los cambios en la concentración de urea o guanidina presente en el medio. Aún así, en este caso también puede dejarse variable el término independiente de la ecuación correspondiente a este estado. Por otra parte, en el caso más sencillo, puede suponerse que el valor de  $\Delta C_{p,den}$  es independiente de la temperatura. A partir de aquí y aplicando las ecuaciones descritas para el modelo de dos estados es posible calcular los parámetros termodinámicos  $\Delta H_{m,den}$  y  $T_{m,den}$  para cada una de las curvas individuales, tanto para los datos obtenidos en presencia de urea como guanidina.

Una vez calculados los valores de  $\Delta H_{m,den}$  y  $T_{m,den}$ , según se ha indicado, es posible calcular el efecto térmico de la unión de las moléculas de desnaturalizante a la proteína, a partir de la obtención de dos ecuaciones estrechamente relacionadas con la aproximación MUD descrita en la sección anterior. Si se diferencia la combinación de las ecuaciones 3.7.11 y 3.7.15 respecto a  $T_{m,den}$  con la condición de que  $\Delta G(T_{m,den}, c_{den}) = 0$ , se obtiene la siguiente expresión:

$$\Delta n_{b,den} = -\frac{\Delta S_D(T_{m,den})}{R} \left[ \ln(1 + K_b \cdot a_{den}) + \frac{d \ln(1 + K_b \cdot a_{den})}{d \ln(T_{m,den})} \right]^{-1} \quad (3.7.21)$$

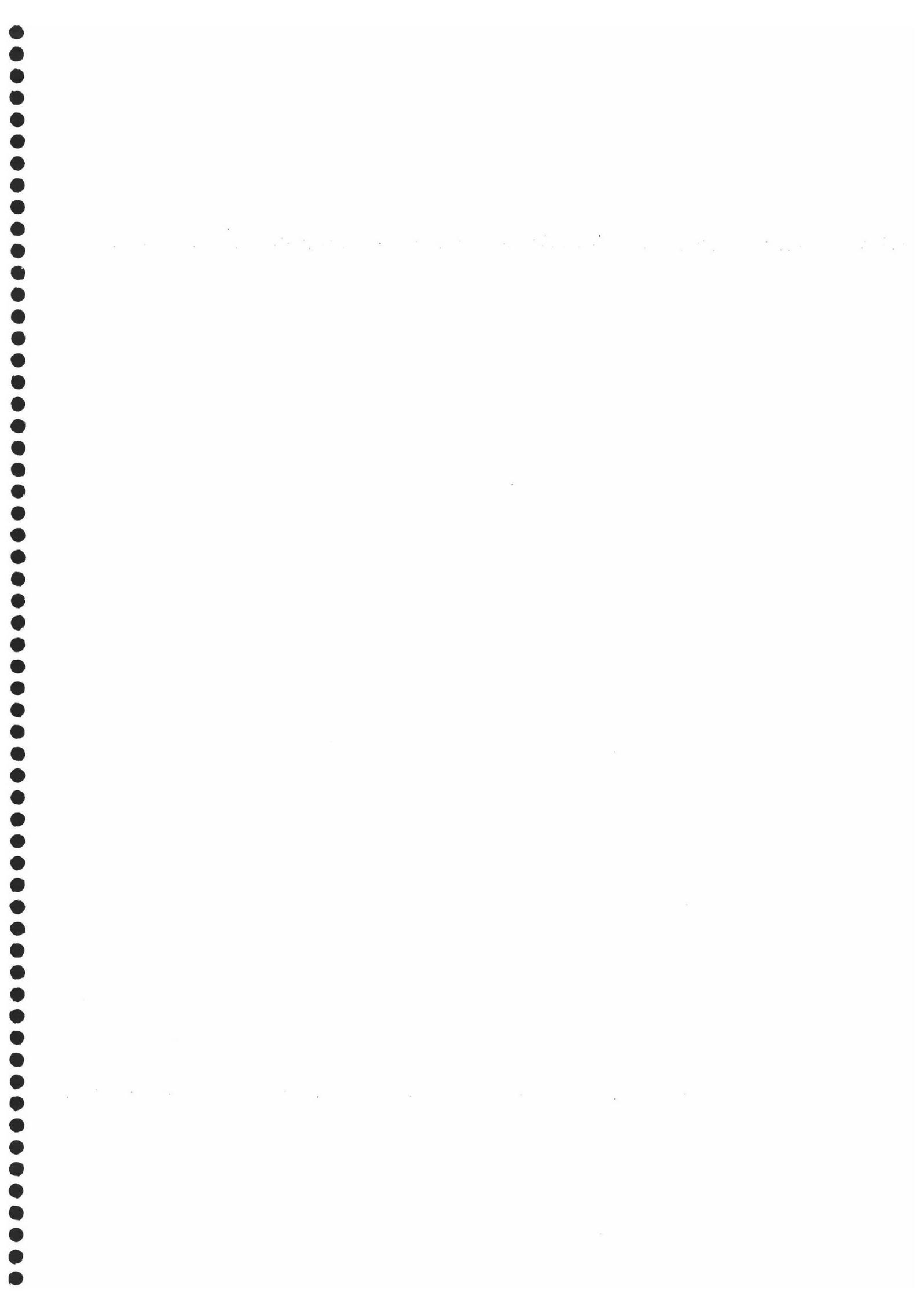
La segunda ecuación se obtiene a partir de la relación:

$$\left( \frac{dT}{da_{den}} \right)_{\Delta G(T_{m,den})=0} = \frac{dT_{m,den}}{da_{den}} = \frac{(\partial \Delta G(T, c_{den}) / \partial a_{den})_T}{(\partial \Delta G(T, c_{den}) / \partial T)_{den}} = -\frac{\Delta n_{b,den} \cdot RT_{m,den} \cdot K_b / (1 + K_b \cdot a_{den})}{\Delta H_{m,den} / T_{m,den}} \quad (3.7.22)$$

que da lugar a la expresión:

$$\Delta n_{b,den} = -\frac{\Delta H_{m,den}}{RT_{m,den}^2} \cdot \frac{dT_{m,den}}{da_{den}} \left[ a_{den}(T_{m,den}) + 1/K_b(T_{m,den}) \right] \quad (3.7.23)$$

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



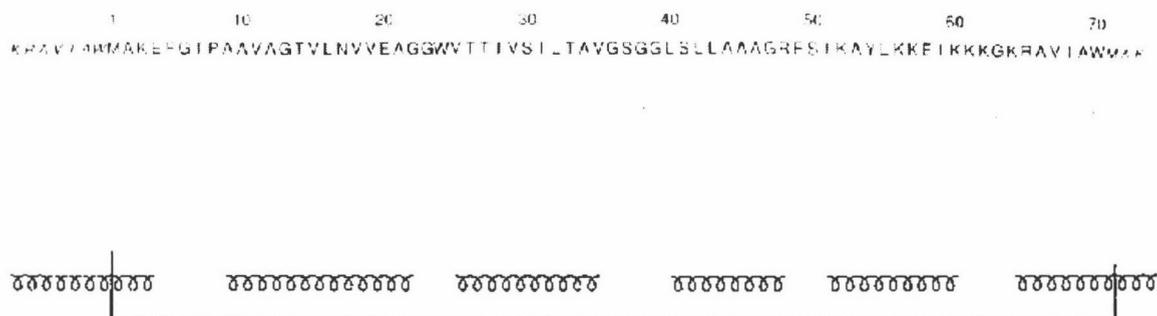
# BACTERIOCINA

## AS-48

### 4.1 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

#### 4.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

Durante los últimos años se ha despertado un enorme interés sobre el estudio y utilización de péptidos antibacterianos, frente al de los antibióticos convencionales, con fines clínicos fundamentalmente, debido a la continua aparición de bacterias resistentes a drogas, hongos y diversos parásitos. Dichos péptidos ejercen una notable actividad antimicrobiana, a través de mecanismos diferentes relacionadas con la inhibición enzimática. Dentro de este grupo se encuentra el péptido de naturaleza cíclica AS-48, de 70 restos y masa molecular de  $7200 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  (González et al., 2000), que se incluye dentro del grupo de las bacteriocinas (productos de síntesis ribosómica, primarios o modificados, que se secretan extracelularmente y presentan un espectro de acción bactericida relativamente estrecho (Jack et al., 1995; Tagg, 1992). Es producido por *Enterococcus faecalis* subespecie *Liquefaciens* S-48 (Gálvez et al., 1985) y presenta un amplio espectro antimicrobiano frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Gálvez et al., 1989b; 1989c; Abriouel et al., 1998). Por ser de naturaleza peptídica se inactiva por endopeptidasas como tripsina, la proteinasa K o la proteasa V-8. A altos valores de pH, entre 10 y 11, presenta una ligera pérdida de actividad, mientras que permanece estable a pH ácido, en el intervalo comprendido entre 3 y 5 (Gálvez et al., 1986; Gálvez, 1987). El análisis de su secuencia aminoacídica muestra una alta proporción en aminoácidos básicos (Lys y Arg), que le proporcionan una fuerte carga positiva, con un punto isoeléctrico en torno a 10.5. Estas cargas positivas se encuentran distribuidas de forma asimétrica a lo largo de la secuencia, donde los 10 residuos básicos que contiene se encuentran distribuidos a lo largo de un segmento de 26 residuos sobre el total de la secuencia. Por otra parte contiene un elevado número de restos hidrofóbicos (Ala, Pro, Val, Met, Ile, Leu y Phe) e hidrofílicos sin carga neta (Ser, Gly, Thr y Tyr) (Gálvez et al., 1989a).



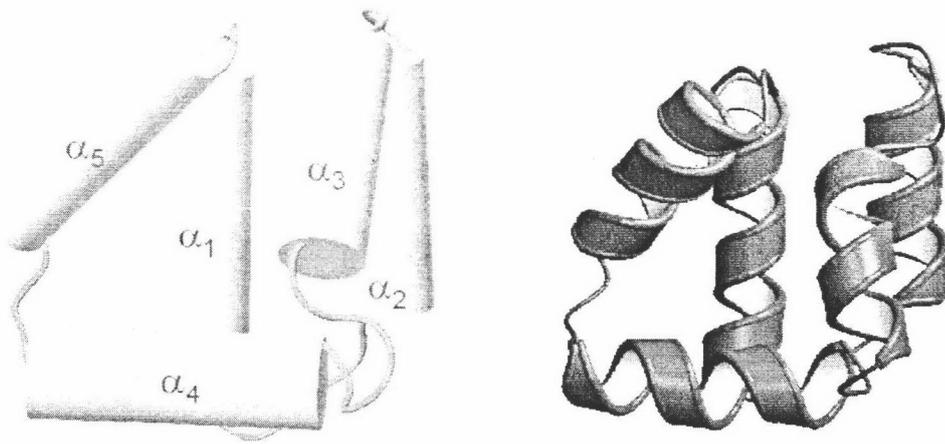
*Figura 4.1.1: Estructura secundaria de AS-48 obtenida mediante RMN (González et al., 2000).*

A pH 3, la carga positiva de AS-48 aumenta aún más debido a que las cadenas laterales pertenecientes a los cuatro restos de Glu se encuentran protonadas. No contiene ninguna cisteína, con lo que su estructura no está estabilizada por la contribución de puentes disulfuro.

#### 4.1.2 ESTRUCTURA

La degradación de AS-48, haciendo uso del método de Edman no presenta resultados positivos, indicando que el extremo N terminal se encuentra bloqueado. Este resultado está de acuerdo con la resistencia al tratamiento con las carboxipeptidasas A y B, que sugiere igualmente el bloqueo del extremo C terminal, convirtiéndolo en un péptido de carácter cíclico. La estructura primaria de AS-48 ha sido determinada finalmente mediante el análisis de los fragmentos obtenidos por tratamiento con proteasas (Samyn et al., 1994).

Los estudios de RMN realizados con AS-48 en solución acuosa (González et al., 2000) han permitido establecer la estructura secundaria de esta proteína (Figura 4.1.1) a partir de la cual se ha resuelto su estructura tridimensional. Así, esta proteína presenta un plegamiento basado en 5 hélices  $\alpha$  (Figura 4.1.1):  $\alpha_1$  (residuos 9 al 21),  $\alpha_2$  (ídem 25 al 34),  $\alpha_3$  (ídem 37 al 45),  $\alpha_4$  (ídem 51 al 62) y  $\alpha_5$  (ídem 64 al 5). Las hélices  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  son antiparalelas entre sí. En un plano paralelo al que forman dichas hélices se sitúa la hélice  $\alpha_4$  que adopta una orientación perpendicular respecto a ambas. Perpendicular a  $\alpha_4$  se dispone a su vez la hélice  $\alpha_3$ , que además cruza el plano formado por las hélices  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  a un ángulo de  $40^\circ$ . Por último, la hélice  $\alpha_5$  cierra el conjunto y se dispone paralela a  $\alpha_3$  formando un ángulo de  $50^\circ$



**Figura 4.1.2:** Representaciones de AS-48 según la estructura tridimensional depositada en Brookhaven Protein Data Bank con el código 1e68.pdb (González et al., 2000).

con  $\alpha_1$  y  $\alpha_4$ . Las caras hidrófobas de las hélices se orientan formando el núcleo hidrofóbico de la proteína, haciendo que la estructura global se compacte.

Cada una de las hélices presenta un patrón de puentes de hidrógeno común, representado por la aparición de puentes de hidrógeno entre grupo CO de un residuo  $i$ , y el grupo NH del residuo  $i + 4$ . Algunos de estos enlaces de hidrógeno están implicados en la estabilización de los lazos que conectan las hélices, como los existentes entre los restos Ala2 - Ile7, Val18 - Gly23 y Thr33 - Gly36, que estabilizan los lazos entre las hélices  $\alpha_5 - \alpha_1$ ,  $\alpha_1 - \alpha_2$  y  $\alpha_2 - \alpha_3$  respectivamente. En el caso de aquellos residuos que se encuentran lejanos en la secuencia no se ha localizado ningún enlace de hidrógeno, con la única excepción del caso del oxígeno carbonílico de la cadena principal de la Phe5 y el protón hidroxílico de la cadena lateral de la Ser50.

Se han encontrado otras proteínas con estructuras que presentan similitudes a la de AS-48, como el caso de algunas proteínas que unen ADN, que presentan un esquema del tipo hélice-giro-hélice. Sin embargo, esta semejanza no puede ser extendida a todas las hélices de AS-48 y, además, no se tienen datos que impliquen la unión de AS-48 con el ADN, haciendo que esta información no adquiera mayor relevancia. Sí se han encontrado, por el contrario, otras proteínas capaces de interactuar con la membrana celular, de estructura helicoidal, como la proteína del canal de potasio 1BL8-A (Doyle et al., 1998), o el dominio de autoensamblaje de clatrina (1B89-A) (Ybe et al., 1999). La mayor similitud con AS-48 corresponde a la proteína NK-lisina, perteneciente a la familia de proteínas que siguen un

plegamiento del tipo saposina. Este polipéptido aislado de intestino porcino (Andersson et al., 1995) tiene 78 residuos y presenta propiedades antibacterianas. Su estructura en solución muestra 5 hélices anfipáticas plegadas en un dominio globular (González et al., 2000; Liepinsh et al., 1997). Dentro de esta familia se encuentran otras proteínas que presentan una elevada homología con la NK-lisina, incluyendo tres puentes disulfuro conservados que no presenta AS-48, así como un conjunto de residuos hidrofóbicos.

#### 4.1.3 ESTABILIDAD Y MECANISMO DE ACCIÓN

Como se describe a continuación, tanto la estabilidad como la función que desempeña AS-48 están íntimamente relacionados con su estructura tridimensional. En primer lugar, los estudios estructurales realizados descritos en la sección anterior muestran que la estabilidad de AS-48 está relacionada con su estructura. AS-48, al igual que la NK-lisina y el resto de las saposinas presentan una alta resistencia a la desnaturalización térmica. La unión del tipo “cabeza-cola” existente entre el Trp70 y la Met1 en mitad de la hélice  $\alpha_5$  parece tener un notable efecto estabilizador en la estructura tridimensional. La interacción de los residuos hidrofóbicos del interior de la hélice  $\alpha_5$  (Val67, Met1 y Phe5) con los del núcleo hidrofóbico interno parecen ser esenciales en la estabilidad del conjunto global. Por otra parte, los resultados preliminares de la expresión del gen que codifica AS-48 demuestran que la forma lineal no es capaz de adoptar la estructura nativa que se observa para el péptido cíclico (González et al., 2000).

Por otra parte, los péptidos con capacidad antibacteriana que contienen una alta carga neta positiva, como AS-48 ó NK-lisina, presentan actividad frente a bacterias y no frente a células de mamífero debido a que sus membranas tienen un alto contenido en ácidos fosfolipídicos (Brock,1974). En el caso de AS-48 su modo de actuación se relaciona con su interacción con la membrana citoplasmática de bacterias sensibles, alterando los niveles de sodio y potasio, lo que conduce a la permeabilización de la membrana celular y el consiguiente colapso del potencial de membrana (Gálvez et al., 1991). Esto se ha comprobado mediante estudios realizados sobre bicapas lipídicas planas que sugieren que la presencia de AS-48 a bajas concentraciones genera una serie de señales eléctricas que pueden corresponder a la formación de canales de diámetro conocido (Gálvez et al., 1991). Así se permite la despolarización celular y la difusión de solutos de bajo peso molecular, disipando el potencial de membrana.

Recientemente se ha tenido en cuenta un concepto unificador basado en el fenómeno de la electroporación molecular para explicar la formación de poros en las membranas originadas por péptidos antibacterianos cargados positivamente. Aunque inicialmente ha sido aplicado al caso de NK-lisina (Miteva et al., 1999), podemos extenderlo a AS-48 ya que sus cargas positivas netas son muy similares y en ambos casos las cargas parecen estar concentradas en una región determinada de la molécula. En general, la electroporación consiste en la formación de poros en las membranas por la presencia de un campo eléctrico externo. En el caso concreto de la electroporación molecular el campo eléctrico se produce por la unión de una molécula cargada a la superficie de la membrana. De acuerdo a este modelo simple AS-48 podría unirse a inicialmente a la superficie de la membrana celular. A continuación, las unidades monoméricas del péptido podrían alinearse de manera que sus superficies hidrofílicas queden enfrentadas a la región fosfolipídica cargada negativamente. En estas condiciones, lo más probable es que la estructura tridimensional del polipéptido se conservase dada su alta estabilidad y que estos monómeros alineados quedaran asociados a la superficie mediante la interacción de sus superficies hidrofóbicas, incrementándose la concentración local y favoreciéndose la electroporación molecular y la permeabilización de la membrana. A partir de este fenómeno es posible proporcionar un mecanismo para la desorganización de membranas de bacterias Gram-negativas, facilitando la actividad de AS-48. Estudios realizados sobre membranas artificiales, así como en células bacterianas y liposomas en presencia de AS-48 corroboran la validez del modelo propuesto (Mendoza et al., 1999; Gálvez et al., 1991).

#### **4.1.4 IMPORTANCIA DE LA CIRCULARIZACIÓN DE PROTEÍNAS**

Actualmente existen numerosas dudas sobre la influencia de los factores estructurales sobre la estabilidad y plegamiento de las proteínas globulares. Así, por ejemplo, aunque en principio podría parecer que las uniones cruzadas, como los puentes disulfuro, podrían aumentar el cambio de energía de Gibbs que se produce durante el desplegamiento, mediante la desestabilización entópica del estado desnaturalizado, los experimentos realizados sobre el diseño artificial de estas uniones disulfuro no han proporcionado resultados que clarifiquen estas cuestiones. Un caso parecido es el que presentan las proteínas circulares, en las que la pérdida de entropía del estado desnaturalizado podría estabilizar la conformación del estado nativo, aunque la magnitud de cada uno de estos efectos no está clara hasta el momento

debido a la falta de resultados experimentales. Para resolver el problema planteado se han tomado vías alternativas de investigación que se describen a continuación.

Muchos de los estudios que se vienen realizando en los últimos años con proteínas utilizando métodos de ingeniería han tratado de cambiar la arquitectura de la cadena polipeptídica, dando lugar a una topología diferente como en el caso de los permutantes circulares y estructuras cíclicas. Así, Luger et al. (1989) fueron pioneros en el diseño y expresión de permutantes circulares. Desde entonces se han desarrollado numerosos trabajos siguiendo la misma línea (Lindqvist & Schneider, 1997; Heinemann & Hahn, 1995), indicando que las proteínas permutadas son termodinámicamente estables y generalmente presentan estructuras tridimensionales similares a las de la proteína en su forma silvestre.

Sin embargo, en el caso de las proteínas circulares no existe un desarrollo de la misma magnitud, debido a la carencia de los protocolos adecuados necesarios para su construcción. Sólo en los tres últimos años el desarrollo de algunos métodos basados en el uso de enzimas han permitido obtener resultados con algunas proteínas circulares “artificiales” (Grantcharova & Baker, 2001; Evans et al., 2000; Noren et al., 2000; Cotton & Muir 1999; Camarero & Muir, 1999; Evans et al., 1999; Iwai & Pluckthum, 1999; Scott et al., 1999). Aun así el efecto de la circularización sobre las proteínas no está claro, aunque parece ser que contribuye de forma positiva a la estabilidad de las mismas. Una mejor elección podría ser realización de los estudios sobre proteínas circulares existentes en la naturaleza, ya que de esta manera se evitarían los efectos de desestabilización de carácter entálpico causados por la circularización cuando se trabaja con proteínas no cicladas de forma natural. En los últimos años se han descrito en la literatura algunos ejemplos de proteínas circulares silvestres, como la Gassericina A (Kawai et al., 1998; Kawai et al., 1994), TrbC del grupo de plásmidos IncP (Eisenbrandt et al., 1999), la microcina J25 (Delgado et al., 1999; Blond et al., 1999) y la bacteriocina AS-48 (Gálvez et al., 1989a; Samyn et al., 1994; Martínez-Bueno et al., 1994), pero no se ha realizado estudio alguno acerca de sus estabilidades.

El estudio de la termodinámica del desplegamiento de AS-48, utilizando técnicas como CDB, DC y la presencia de agentes desnaturalizantes, que se describe a lo largo de esta memoria, nos ha revelado que ésta es una de las proteínas más estables descritas hasta el momento y que parte de dicha estabilidad parece proceder de una importante contribución de carácter entrópico producida por la circularización de su cadena polipeptídica.

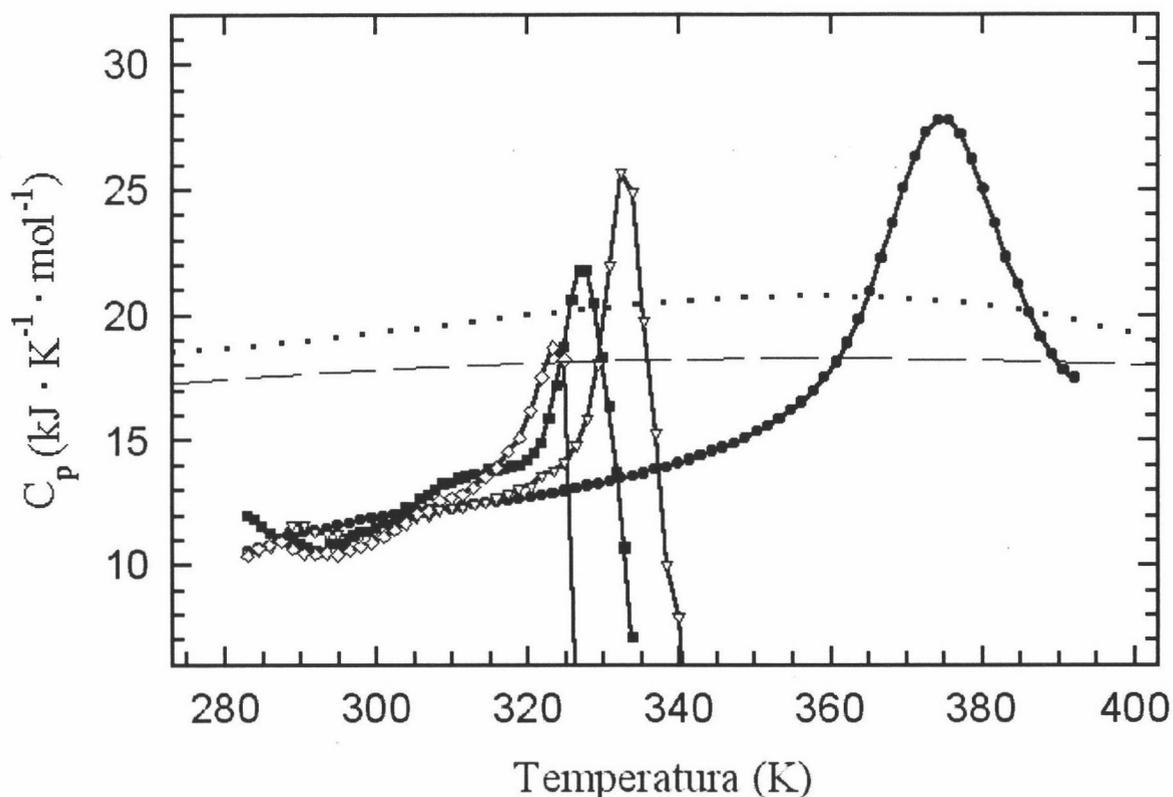
## 4.2 RESULTADOS EXPERIMENTALES

### 4.2.1 ESTUDIO DE LA DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA MEDIANTE CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (CDB)

Estudios previos realizados con AS-48 muestran la alta tendencia de esta proteína a formar oligómeros solubles a pH neutro de manera reversible (Abriouel et al., 2001). Por otra parte, también se ha demostrado mediante experimentos de ultracentrifugación analítica que la proteína se encuentra en estado monomérico a pH ácido (González et al., 2000). De acuerdo con todo esto, los experimentos de CDB realizados en esta memoria muestran que a pH 7.0 el desplegamiento inducido por temperatura produce agregación irreversible de la proteína, mientras que a pH 2.5 y baja fuerza iónica (10 mM en tampón fosfato) tiene lugar una transición reversible a altas temperaturas como se observa en la Figura 4.2.1. Con el propósito de desestabilizar la estructura sin alterar la reversibilidad del proceso de desplegamiento realizamos estos experimentos en otras condiciones tales como tampón fosfato 10 mM, pH 11.5, tampón fosfato 50 mM, pH 11.0 y tampón glicina 20 mM, pH 11.0, aunque el resultado fue en todos los casos una transición irreversible acompañada de la agregación exotérmica de la proteína (Figura 4.2.1).

Otro intento de alterar la estabilidad fue llevado en colaboración con el Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada. Tal propósito se ha realizado a través de la ruptura de la cadena circular, usando bromuro de cianógeno (BrCN), como agente inductor de la hidrólisis del enlace peptídico en la posición Tyr-70–Met-1, obteniéndose un polipéptido lineal (sección 3.4.4). Los termogramas obtenidos por CDB con esta forma a varias condiciones de pH y fuerza iónica no presentaron transición alguna, como se observa en el caso que se presenta en la Figura 4.2.2, indicando en todos estos casos que la forma lineal se encuentra desplegada a cualquier temperatura, debido probablemente a que el corte de la cadena se produce en el centro de la hélice  $\alpha_5$  y no en una zona más desorganizada, evitando así la destrucción de elementos estructurales importantes.

En definitiva, debido a que la proteína se encuentra en estado monomérico y presenta reversibilidad frente a la desnaturalización, el intervalo de pH de estos experimentos se restringió a valores ácidos. Se comprobó que la posición de la transición del proceso de desplegamiento no depende del pH para valores de éste inferiores a 4.0. El termograma obtenido en tampón fosfato 10 mM, pH 2.5 que se muestra en la Figura 4.2.3 presenta una

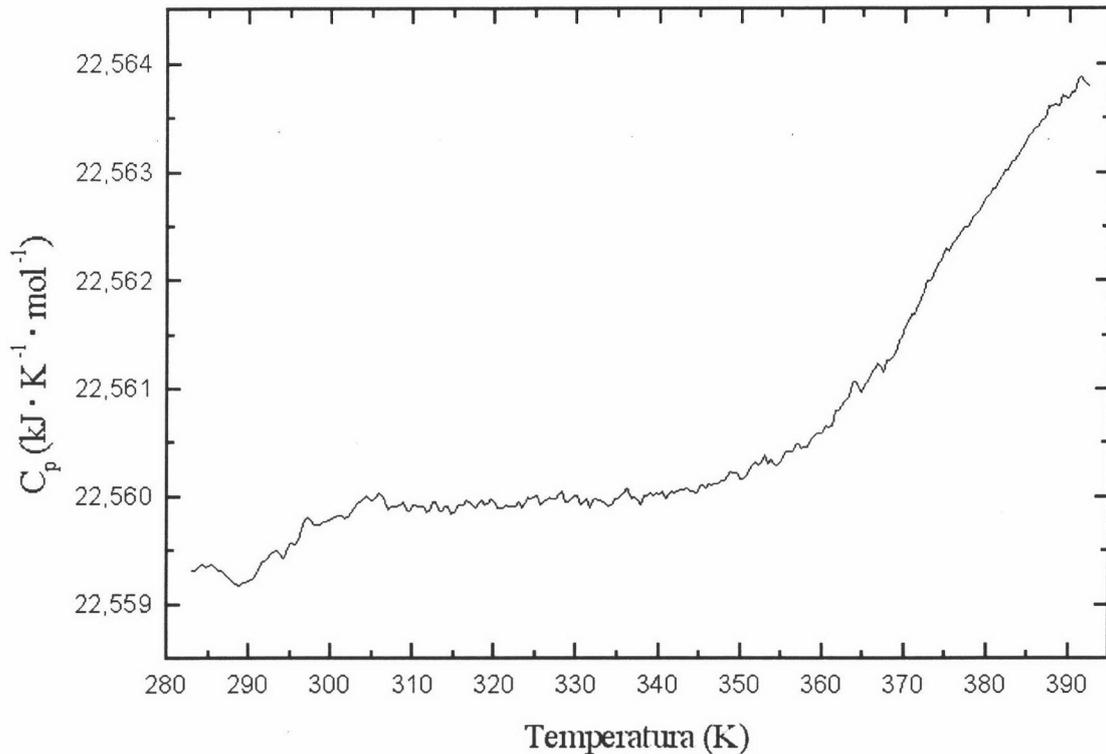


**Figura 4.2.1:** Dependencias de la capacidad calorífica molar parcial con la temperatura, realizadas entre 3 y 120 °C a una velocidad de barrido de 1.5 K/min. Los diferentes símbolos empleados se corresponden con las siguientes condiciones experimentales: -●-: tampón fosfato 10 mM, pH 2.5; -∇-: tampón fosfato 10 mM, pH 11.5; -■-: tampón fosfato 50 mM, pH 11.0; -▽-: tampón glicina 20 mM, pH 11.0. Las líneas discontinua y punteada representan las funciones de  $C_{p,D}$ , calculadas mediante los métodos PM y HHH respectivamente, antes de realizar el análisis de la curva a pH 2.5. Las líneas sólidas trazadas a través de los puntos experimentales sirven solo para visualizar fácilmente el curso de cada transición.

única transición endotérmica y simétrica que no se completa incluso a temperaturas tan altas como 393 K (120 °C), de forma idéntica a la encontrada para otros valores de pH ácido estudiados.

#### 4.2.2 ANÁLISIS DE LOS DATOS DE CDB OBTENIDOS A pH 2.5

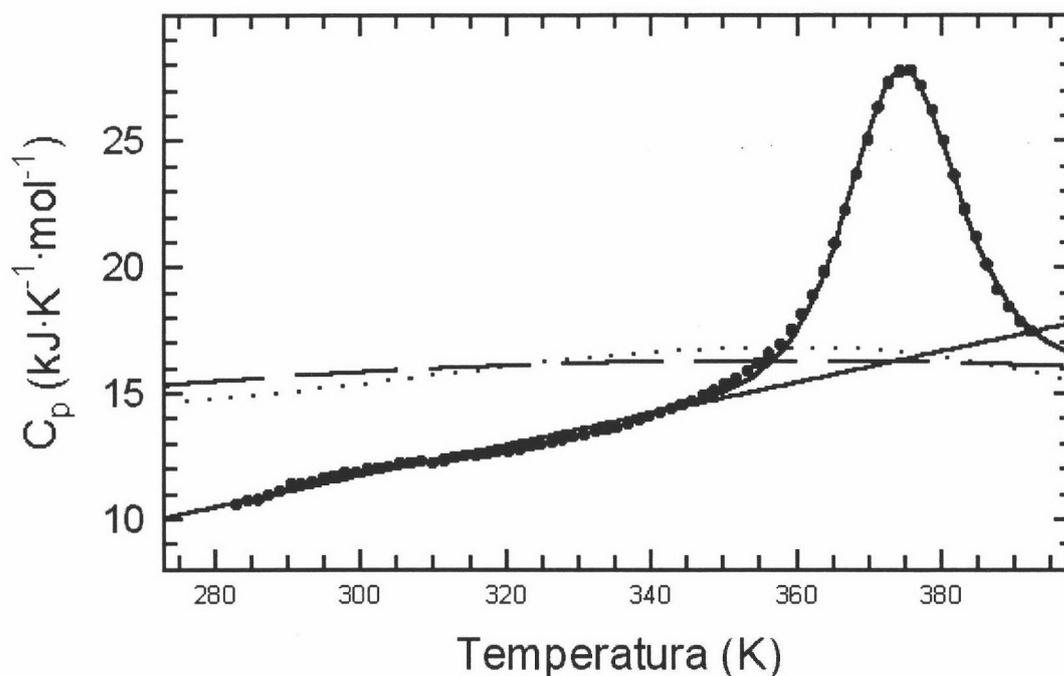
Para obtener los parámetros termodinámicos del desplegamiento de AS-48 a partir de la curva experimental obtenida por CDB se ha utilizado el modelo de dos estados descrito en la sección 3.6.5.



**Figura 4.2.2:** Termograma obtenido por CDB de la versión lineal de AS-48 obtenida por tratamiento del antibiótico con BrCN, en tampón fosfato 10 mM pH 2.5 y a una concentración de AS-48 en torno a 1 mg/mL.

Como se observa en la curva a pH 2.5 representada en la Figura 4.2.3, la línea base del estado nativo se define perfectamente ya que la proteína se mantiene en dicho estado en un amplio intervalo de temperatura. Sin embargo, la línea base del estado desnaturalizado no está definida, debido a que el desplegamiento tiene lugar a alta temperatura y no es posible obtener la curva de desnaturalización completa. Por esta razón, la aplicación de dicho modelo a este sistema ha supuesto tener que realizar algunas aproximaciones que se detallan a continuación.

Como se ha descrito en la sección 3.6.5, en la literatura se han propuesto diversas aproximaciones que permiten describir la dependencia de la función  $C_{p,D}$  con la temperatura en forma polinómica. La propuesta por Privalov y Makhatadze (Makhatadze & Privalov, 1990; Privalov & Makhatadze, 1990), el método PM, permite representar la dependencia de la función  $C_{p,D}$  con la temperatura mediante un polinomio de segundo orden como el que se representa en la ecuación 3.6.16). La segunda aproximación propuesta recientemente por



**Figura 4.2.3:** Dependencia de  $C_p$  medida experimentalmente para AS-48 en tampón fosfato 10 mM, pH 2.5 (●) y el resultado del análisis (—) aplicando el modelo de dos estados, asumiendo que  $\Delta C_p$  varía con la temperatura. La línea sólida bajo la transición representa la función  $C_{p,N}$ , mientras que las los trazos discontinuo y punteado muestran las funciones  $C_{p,D}$  calculadas mediante los métodos PM y HHH respectivamente, una vez ajustadas sus posiciones después de realizar el análisis de la curva.

Häckel et al., (1999) emplea un polinomio de tercer orden para calcular el valor de la función  $C_{p,D}$  (método HHH):

$$C_{p,D} = a_D + b_D \cdot t_r + c_D \cdot t_r^2 + d_D \cdot t_r^3 \quad (4.2.1)$$

La aplicación del método PM genera funciones más suavizadas que las obtenidas mediante la aplicación del método HHH.

Por otra parte, aunque la capacidad calorífica del estado nativo se describe de forma general como una función lineal de la temperatura (Privalov et al., 1989; Viguera et al., 1994b) como se muestra en la ecuación 3.6.15 en algún caso se ha descrito mediante una función cuadrática (Padmanabhan et al., 1999; Martínez et al., 1999), con la siguiente ecuación:

$$C_{p,N} = a_N + b_N \cdot t_r + c_N \cdot t_r^2 \quad (4.2.2)$$

En el caso de la curva obtenida a pH 2.5 para AS-48, (Figura 4.2.3) se han aplicado los dos métodos de aproximación, PM y HHH, como se explica a continuación:

En primer lugar, para aplicar el método PM se ha supuesto que la dependencia de  $C_{p,N}$  con la temperatura es de tipo lineal. Esto da lugar a la siguiente función de  $\Delta C_p$ :

$$\Delta C_p = \Delta a + \Delta b \cdot t_r + \Delta c \cdot t_r^2 \quad (4.2.3)$$

donde  $\Delta a = (a_D - a_N)$ ,  $\Delta b = (b_D - b_N)$  y  $\Delta c = c_D$ , en este último caso, debido a la dependencia lineal de la función  $C_{p,N}$ .

Antes de comenzar el análisis hay que calcular el polinomio de segundo orden que describe la función  $C_{p,D}$ , como se describe en la sección 3.6.5, para obtener los valores de  $a_D$ ,  $b_D$  y  $c_D$ . Una vez calculados estos valores y teniendo en cuenta la función de la ecuación 4.2.3, se aplican las ecuaciones del modelo de dos estados, tal como se ha descrito para el caso general, y se realiza el proceso de regresión no lineal por mínimos cuadrados de la ecuación 3.6.13 a los datos experimentales. Este análisis incluye nuevos parámetros que aumentan el número de variables. En consecuencia, junto con  $T_m$  y  $\Delta H_m$ , se incluyen los parámetros  $a_D$ ,  $\Delta a$  y  $\Delta b$  y  $b_D$  y  $c_D$ . Debido a que se desconoce el valor experimental de la función de  $C_{p,D}$  a cualquier temperatura, durante el análisis se han mantenido variables  $a_D$ ,  $\Delta a$  y  $\Delta b$  (posición de la función) y se han fijado  $b_D$  y  $c_D$  (forma de la función) a los valores calculados a partir de la función  $C_{p,D}$  obtenida mediante la aproximación PM.

En segundo lugar, la aplicación del método HHH de aproximación supone emplear polinomios de segundo y tercer grado para describir las dependencias con la temperatura de las funciones  $C_{p,N}$  y  $C_{p,D}$  respectivamente (ecuaciones 4.2.2 y 4.2.1). Esto da lugar a la siguiente expresión para  $\Delta C_p$ :

$$\Delta C_p = \Delta a + \Delta b \cdot t_r + \Delta c \cdot t_r^2 + \Delta d \cdot t_r^3 \quad (4.2.4)$$

donde  $\Delta a$ ,  $\Delta b$  de igual manera que los correspondientes a la ecuación 4.2.3 del método PM, mientras que  $\Delta c = (c_D - c_N)$  y  $\Delta d = d_D$ .

Al igual que en el método de aproximación de PM, en el caso de la aproximación usando el método HHH es necesario fijar algunas de estas variables con objeto de hacer posible el proceso de análisis de los datos experimentales, al desconocer la función  $C_{p,D}$ . En este caso, se definen como variables  $a_D$ ,  $\Delta a$ ,  $\Delta b$  y  $\Delta c$ , mientras que  $b_D$ ,  $c_D$  y  $d_D$  se mantienen fijos durante dicho proceso, por las mismas razones que se han explicado para el uso de la aproximación PM.

El análisis descrito anteriormente sobre la curva de CDB obtenida a pH 2.5, ha permitido obtener un valor de  $T_m$  de 374.9 K (101.8 °C). El resto de los parámetros utilizados en el análisis, incluyendo las aproximaciones según los métodos PM y HHH se muestran en la

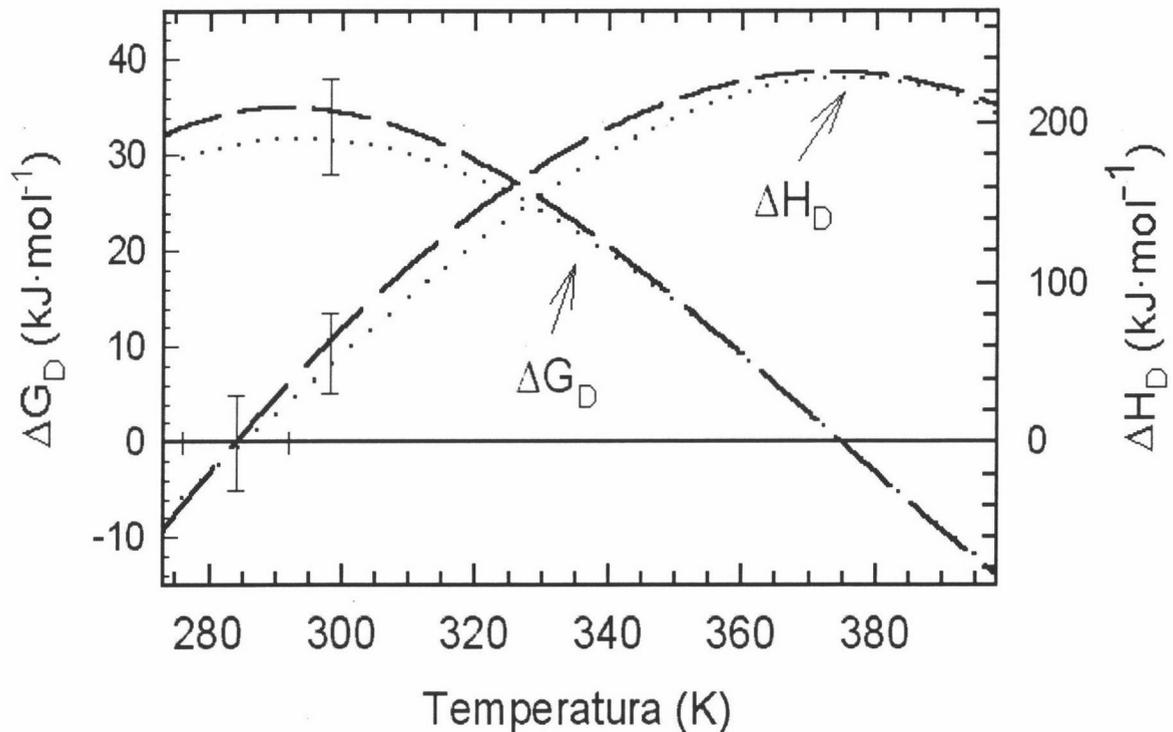
TABLA 4.2.1  
 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LOS DATOS DE CDB DE AS-48 EN TAMPÓN FOSFATO 10 mM, A pH 2.5,  
 UTILIZANDO LAS APROXIMACIONES DE PM Y HHH.

	COEFICIENTES DE LA FUNCIÓN $C_{p,D}$				COEFICIENTES DE LA FUNCIÓN $\Delta C_p$			$\Delta H_m$ kJ·mol <sup>-1</sup>	$T_m$ K	$\Delta G(298)$ kJ·mol <sup>-1</sup>
	$a_D$ kJ·K <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup>	$b_D$ kJ·K <sup>-2</sup> ·mol <sup>-1</sup>	$c_D \cdot 10^4$ kJ·K <sup>-3</sup> ·mol <sup>-1</sup>	$d_D \cdot 10^6$ kJ·K <sup>-4</sup> ·mol <sup>-1</sup>	$\Delta a$ kJ·K <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup>	$\Delta b \cdot 10^3$ kJ·K <sup>-2</sup> ·mol <sup>-1</sup>	$\Delta c \cdot 10^4$ kJ·K <sup>-3</sup> ·mol <sup>-1</sup>			
PM	<i>(17.7)</i> <b>15.9 ± 0.5</b>	0.018	1.38	-	4.45	-44.4	1.38	<b>231.6 ± 10</b>	<b>374.9 ± 0.5</b>	<b>34.6 ± 5</b>
HHH	<i>(19.1)</i> <b>15.2 ± 0.5</b>	0.032	2.09	-4.64	3.74	-5.66	-4.79	<b>228.6 ± 10</b>	<b>374.9 ± 0.5</b>	<b>31.6 ± 5</b>

*Los parámetros en negrita corresponden a los coeficientes del polinomio que describe la función de  $C_{p,D}$  y  $\Delta C_p$  al modelo de dos estado (Figura 4.2.3). El resto de los parámetros corresponden a las aproximaciones de PM y HHH, de los cuales, los que se representan en cursiva fueron fijados durante el proceso de análisis de los datos.*

Tabla 4.2.1, de la que puede obtenerse además  $\Delta C_{p,m}$ , a partir de la ecuación 3.6.17 aplicada a la temperatura  $T = T_m$  y utilizando una  $T_r = 293.15$  K (20 °C). El valor que resulta, próximo a cero, se justifica teniendo en cuenta que  $\Delta C_p$  disminuye con la temperatura y que el valor de  $T_m$  es muy elevado.

Del análisis de datos y según se observa en la Figura 4.2.3 se deduce que la función  $C_{p,N}$  que describe la línea base del estado nativo puede aproximarse a una función lineal. La función  $C_{p,D}$ , que describe la línea base del estado desnaturalizado utilizando las aproximaciones de PM y HHH, presenta un valor bien definido para la posición de la misma,  $a_D$ , como se observa en dicha figura. Sin embargo, los términos que muestran la dependencia con la temperatura, en ambos casos (PM y HHH),  $b_D$ ,  $c_D$  y  $d_D$  presentan cierto grado de ambigüedad, ya que la curva de capacidad calorífica obtenida no presenta información acerca de la función  $C_{p,D}$ . El valor de  $C_{p,D}$  estimado a partir de la aproximación PM es alrededor del 10 % mayor que el valor experimental a 390 K (117 °C) (Figura 4.2.3). Esta desviación observada es similar a la que se ha encontrado en el caso de otras proteínas pequeñas (Padmanabhan et al., 1999; Ruiz-Sanz et al., 1999; Martínez et al., 1999; Viguera et al., 1994b). El método de HHH presenta desviaciones mayores, del orden del 20 %. Esta sobreestimación podría explicarse por el hecho de que la cadena desnaturalizada de estas proteínas no es idéntica a la supuesta en el caso de los pequeños péptidos modelo utilizados para establecer las capacidades caloríficas de los aminoácidos y grupos peptídicos en el desarrollo de estas dos aproximaciones, en cuyos casos el estado desnaturalizado “ideal”



**Figura 4.2.4:** Dependencias del cambio de energía de Gibbs del desplegamiento (izquierda) y de la entalpía (derecha) respecto a la temperatura encontradas a partir del análisis de la curva obtenida a pH 2.5. Las líneas discontinuas corresponden a las funciones obtenidas mediante el método PM, y las líneas punteadas al método HHH. Las funciones  $\Delta C_p(T)$ , en ambos casos, son funciones cuadráticas de la temperatura (ver texto). Los errores de extrapolación se han representado mediante barras.

corresponde a la conformación de “ovillo al azar”, menos compacto que el que se supone para una proteína desnaturalizada por temperatura.

La dependencia con la temperatura de los parámetros termodinámicos obtenidos del análisis de la curva experimental a pH 2.5 se muestra en la Figura 4.2.4. En ella, la función cuadrática de  $\Delta C_p$  correspondiente a cada una de las aproximaciones utilizadas (PM y HHH) se obtiene a partir de los valores de los parámetros que se muestran en la tabla 4.2.1 y que describen las funciones  $C_{p,N}$  y  $C_{p,D}$ . Como se observa en la Figura 4.2.4, ambas funciones coinciden en el intervalo de temperaturas cercanas al valor de  $T_m$ , aunque a temperatura ambiente la diferencia entre ambos puede alcanzar el 20 %. Por esta razón, las dependencias con la temperatura del cambio de entalpía debida al desplegamiento,  $\Delta H_D$ , también coinciden a temperaturas cercanas a  $T_m$ , aunque sus formas varían a valores bajos de temperatura. Sin embargo, las entalpías de desplegamiento se anulan a la misma temperatura, lo que explicaría

las pequeñas diferencias encontradas entre las correspondientes energías de Gibbs a 298 K (25 °C). Dicha diferencia es menor que la incertidumbre en la extrapolación debida a una propagación del error cometido, con lo que puede decirse que los dos métodos utilizados para la estimación de las funciones que describen  $C_{p,D}$  permiten obtener un valor promedio de  $\Delta G_D(298) = 32.8 \pm 5$  kJ / mol.

#### 4.2.3 CÁLCULO DE ÁREAS ACCESIBLES AL SOLVENTE

En el caso de AS-48, la aplicación de la CDB nos ha permitido obtener información del  $\Delta C_p$  a partir de una única curva calorimétrica en la que además, como se indica en el apartado anterior, ha sido necesario emplear algunos métodos de aproximación para obtener información acerca de la capacidad calorífica del estado desnaturalizado,  $C_{p,D}$ . Para comprobar la validez del valor de  $\Delta C_p$  calculado, puede establecerse una correlación entre dicho parámetro termodinámico y parámetros estructurales, como los cambios en las áreas expuestas al solvente a través del desplegamiento, calculados como se describe a continuación.

Según Lee y Richards (1971), el área accesible al solvente (ASA) se define como la trayectoria que describe una esfera utilizada para sondear la superficie de diferentes “rodajas” de una anchura determinada realizadas sobre la proteína, recorriéndolas haciendo máximo contacto, sin llegar a superponerse a ellas. En el caso más común, la esfera es una molécula de agua de radio igual a 1.4 Å. Para calcular este área es necesario también disponer de las coordenadas atómicas de la estructura, así como los radios de van der Waals asignados para las esferas que representan cada uno de estos átomos de la proteína. Actualmente se han publicado varias tablas correspondientes a diferentes valores propuestos para estos radios. Lo más apropiado para comparar las áreas calculadas de dos estructuras es utilizar una misma lista de radios atómicos. Generalmente se utilizan los radios propuestos por Chothia (1976). Con estos datos, podemos suponer que durante el sondeo sobre la superficie de la proteína, la esfera es capaz de detectar variaciones en la misma, distinguiendo si es polar ( $ASA_{pol}$ ) ó no ( $ASA_{np}$ ). En este sentido, hay que definir estos dos tipos de superficies en función de los grupos de los residuos presentes. Como no polares se consideran los carbonos alifáticos (-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-, >CH-) y los carbonos aromáticos, mientras que los grupos hidroxilo, amidas y aminas, carbonos y oxígenos carbonílicos y carboxílicos, y sulfuros se incluyen dentro de los grupos polares (Khechinashvili et al. 1995).

Para calcular el cambio en el área accesible al solvente en el proceso de desplegamiento,  $\Delta ASA$ , es necesario calcular previamente las áreas accesibles al solvente (ASA) en los estado nativo y desnaturalizado, distinguiendo entre residuos polares y no polares. Esto se realiza mediante el algoritmo que emplea el programa NACCESS, desarrollado por el Dr. S. Hubbard (EMBL), basado en el método descrito por Lee y Richards (1971) que utiliza un radio de la “molécula de sondeo” igual a 1.4 Å. En el caso de AS-48 el tamaño de corte de las rodajas utilizado ha sido de 0.05 Å y los radios de van der Waals los sugeridos por Chothia (1976). En el caso de las áreas accesibles al solvente calculadas para los restos polares y no polares del estado nativo utilizamos las coordenadas atómicas de la estructura, depositadas en el banco de datos de proteínas (PDB) (para AS-48, el fichero tiene el código 1e68.pdb). Para calcular las áreas accesibles de los restos polares y no polares en el estado desnaturalizado se considera que dicho estado se encuentra en una estructura tipo  $\beta$  extendida, debido a que los cálculos realizados suponiendo una conformación de cadena extendida conducen a valores menores de ASA (Khechinashvili et al. 1995; Livingstone et al., 1991), ya que se cree que en el estado desnaturalizado no existe un grado tan alto de extensión de los ángulos de la cadena polipeptídica. La simulación de la estructura extendida tipo  $\beta$  para el estado desnaturalizado se realizó con el programa INSIGHTII (Biosym, California, USA) en una estación INDIGO (Silicon Graphics, USA). Posteriormente, el cálculo de ASA para este estado de los restos polares y no polares se realizó utilizando el fichero generado con estas coordenadas en el programa NACCESS.

Los cálculos de los valores de  $\Delta ASA_{pol}$  y  $\Delta ASA_{np}$  aplicados a nuestro caso se resumen en la Tabla 4.2.2.

Como se ha mencionado al comienzo de este apartado, los valores experimentales de las funciones termodinámicas para el desplegamiento de las proteínas obtenidas mediante CDB pueden interpretarse como la suma de varias contribuciones debidas a cambios en las interacciones entre los átomos de la cadena polipeptídica, o en los grados de libertad conformacional ó en los modos de vibración de la misma, así como en la hidratación de diferentes residuos. De todas ellas, se considera que la contribución más importante es la debida a la hidratación que es aditiva (Murphy & Gill, 1990) y puede expresarse como una función lineal de los cambios en las áreas accesibles al solvente de los restos polares ( $\Delta ASA_{pol}$ ) y no polares ( $\Delta ASA_{np}$ ) debidos al desplegamiento (Murphy & Freire, 1992; Murphy et al., 1992; Spolar et al., 1992). Algunos autores han propuesto algoritmos empíricos que relacionan las superficies accesibles al solvente de las proteínas con el valor de  $\Delta C_p$

**TABLA 4.2.2**

**CAMBIO DE LAS ÁREAS ACCESIBLES AL SOLVENTE DEBIDO AL DESPLEGAMIENTO,  $\Delta ASA$ , PARA AS-48 A 25 °C**

Estado	ASA ( $\text{\AA}^2$ )					
		Todos los átomos	Cadenas laterales totales	Cadena principal	No polar	Polar
Nativo	$ASA_N$	3702.0	3198.3	503.7	2629.7	1072.3
Desplegado (Tipo lámina $\beta$ extendida)	$ASA_D$	9269.5	7411.5	1858.0	6656.0	2613.5
	$\Delta ASA$ ( $ASA_D - ASA_N$ )	5567.5	4213.2	1354.3	4026.3	1541.2

(Murphy & Freire, 1992; Myers et al., 1995; Khechinashvili et al., 1995), el cual, como se ha mencionado anteriormente, se considera independiente de la temperatura en la mayoría de los estudios termodinámicos descritos en la literatura. En nuestro caso se han utilizado varias de esas ecuaciones empíricas que describen el cambio de la capacidad calorífica debido al desplegamiento.

En primer lugar, Gómez y Freire (1995) proponen que, en general, el cambio de capacidad calorífica (su contribución debida a la hidratación de los grupos polares y no polares e interacciones no covalentes) viene descrito por la siguiente relación:

$$\Delta C_p = a(t_r) \cdot \Delta ASA_{np} + b(t_r) \Delta ASA_{pol} \quad (4.2.5)$$

donde  $t_r = (T - T_r)$ , siendo  $T_r = 298 \text{ K}$  (25 °C); los coeficientes  $a(t_r)$  y  $b(t_r)$  son las contribuciones por  $\text{\AA}^2$  del área no polar que llega a ser expuesta al solvente y de área polar expuesta al solvente respectivamente, descritos como:

$$a(t_r) = 0.45 + 2.63 \cdot 10^{-4} (t_r) - 4.2 \cdot 10^{-5} (t_r)^2 \text{ (cal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}) \quad (4.2.6)$$

$$b(t_r) = -0.26 + 2.85 \cdot 10^{-4} (t_r) - 4.31 \cdot 10^{-5} (t_r)^2 \text{ (cal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}) \quad (4.2.7)$$

Los valores de los parámetros anteriores, fueron calculados como una extensión de los propuestos inicialmente por Murphy y Freire (1992) para incluir la dependencia con la temperatura de la función  $\Delta C_p$ . Si se realizan los cálculos a 25 °C, se obtiene la expresión:

$$\Delta C_p = 0.45 \cdot \Delta ASA_{np} - 0.26 \cdot \Delta ASA_{pol} \quad (4.2.8)$$

De las expresiones anteriores se observa que la contribución de la capacidad calorífica de hidratación de los grupos no polares es positiva, aunque disminuye desde  $0.45 \text{ cal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^2$  a 25 °C hasta aproximadamente  $0.23 \text{ cal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^2$  a 100 °C. Por el contrario,

contribución de la capacidad calorífica de hidratación de los grupos polares es negativa con un valor de  $-0.26 \text{ cal}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^2$  a  $25^\circ\text{C}$ , llegando a ser despreciable en torno a los  $100^\circ\text{C}$ . Esto apoya el hecho de que se considere que los cambios en la exposición de la superficie de los grupos no polares en proteínas globulares constituyen la mayor contribución al cambio de la capacidad calorífica del desplegamiento,  $\Delta C_p$  (Sturtevant, 1977).

En segundo lugar, Khechinashvili et al. (1995) proponen una ecuación basada en la relación del cambio de la capacidad calorífica de desplegamiento debida a los residuos no polares y calculada a  $25^\circ\text{C}$ , con el peso molecular de la proteína (la contribución del cambio de capacidad calorífica de desplegamiento de la hidratación de los residuos polares se compensa con la correspondiente contribución al  $\Delta C_p$  debida a la vibración a esa temperatura):

$$\Delta C_p = 1 + 2.1 \cdot 10^{-4} (\text{Pm}) + 1.9 \cdot 10^{-8} (\text{Pm})^2 \quad (4.2.9)$$

Myers et al. (1995) proponen dos ecuaciones, la primera de ellas basada en cálculos de  $\Delta \text{ASA}_{\text{pol}}$  y  $\Delta \text{ASA}_{\text{np}}$  previos (Spolar et al., 1992) sobre la transferencia desde el estado líquido hasta agua de compuestos modelo, y la segunda como resultado del análisis no lineal de sus propios datos:

$$\Delta C_p = (0.32 \pm 0.04) \cdot \Delta \text{ASA}_{\text{np}} - (0.14 \pm 0.04) \cdot \Delta \text{ASA}_{\text{pol}} \quad (4.2.10)$$

$$\Delta C_p = (0.28 \pm 0.12) \cdot \Delta \text{ASA}_{\text{np}} - (0.09 \pm 0.30) \cdot \Delta \text{ASA}_{\text{pol}} \quad (4.2.11)$$

A pesar de que la mayoría de los trabajos descritos en la literatura realizan los cálculos de  $\Delta \text{ASA}$  de las superficies polares y no polares utilizando el mismo programa, existen diferencias en los valores encontrados para ambos parámetros. Por ejemplo, Spolar et al. (1992) encuentran para ribonucleasa A unos valores de 5815 y 4475  $\text{\AA}^2$  de  $\Delta \text{ASA}_{\text{pol}}$  y  $\Delta \text{ASA}_{\text{np}}$  respectivamente, mientras que para Myers et al. (1995) estos valores corresponden a 6819 y 3638  $\text{\AA}^2$  respectivamente, y recientemente Makhatadze y Privalov (1995) proponen los valores de 5273 y 4141  $\text{\AA}^2$  respectivamente. Myers et al (1995) apuntan que las diferencias pueden llegar a ser del 25 % entre diferentes valores propuestos. Las razones de estas discrepancias no están claras, ya que en la mayoría de los casos descritos en la literatura se utiliza el mismo programa, así como el mismo modelo para calcular la conformación extendida del estado desnaturalizado de las proteínas. Puede ser que las discrepancias encontradas en los resultados se deban a incertidumbre en la definición del estado desnaturalizado y a la cantidad de estructura residual en el mismo (Shortle et al., 1988; Dill & Shortle, 1991), a la utilización de diferentes valores del radio de la esfera de sondeo y de la

anchura de las rodajas, ó incluso al uso de diferentes valores de los radios de van der Waals utilizados para los átomos.

Los valores del  $\Delta C_p$  para AS-48 obtenidos con cada una de las aproximaciones empleadas son los siguientes:  $5.9 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ , para la estimación de Gómez y Freire (1995);  $3.5 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$  para la fórmula de Khechinashvili et al. (1995) y, por último,  $4.5 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$  y  $4.1 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$  para las ecuaciones 4.2.10 y 4.2.11 de Myers et al. (1995).

Al igual que el valor de  $\Delta C_p$ , el parámetro  $m_{\text{den}}$  (donde el subíndice “den” representa el agente desnaturizante, urea o guanidina) descrito en el modelo de extrapolación lineal (MEL) (sección 3.7.8) guarda una estrecha relación con el cambio de área accesibles al solvente, según describe Myers et al. (1995), muy importante para determinar mediante información estructural el valor de dicho parámetro, y compararlo con el obtenido mediante los datos experimentales de DC que se presentan con detalle en la sección 4.3.2. Así, las ecuaciones que propone Myers para el caso de urea y guanidina son respectivamente:

$$m_u = (0.15 \pm 0.12) \cdot \Delta \text{ASA}_{\text{np}} + (0.08 \pm 0.29) \cdot \Delta \text{ASA}_{\text{pol}} \quad (4.2.12)$$

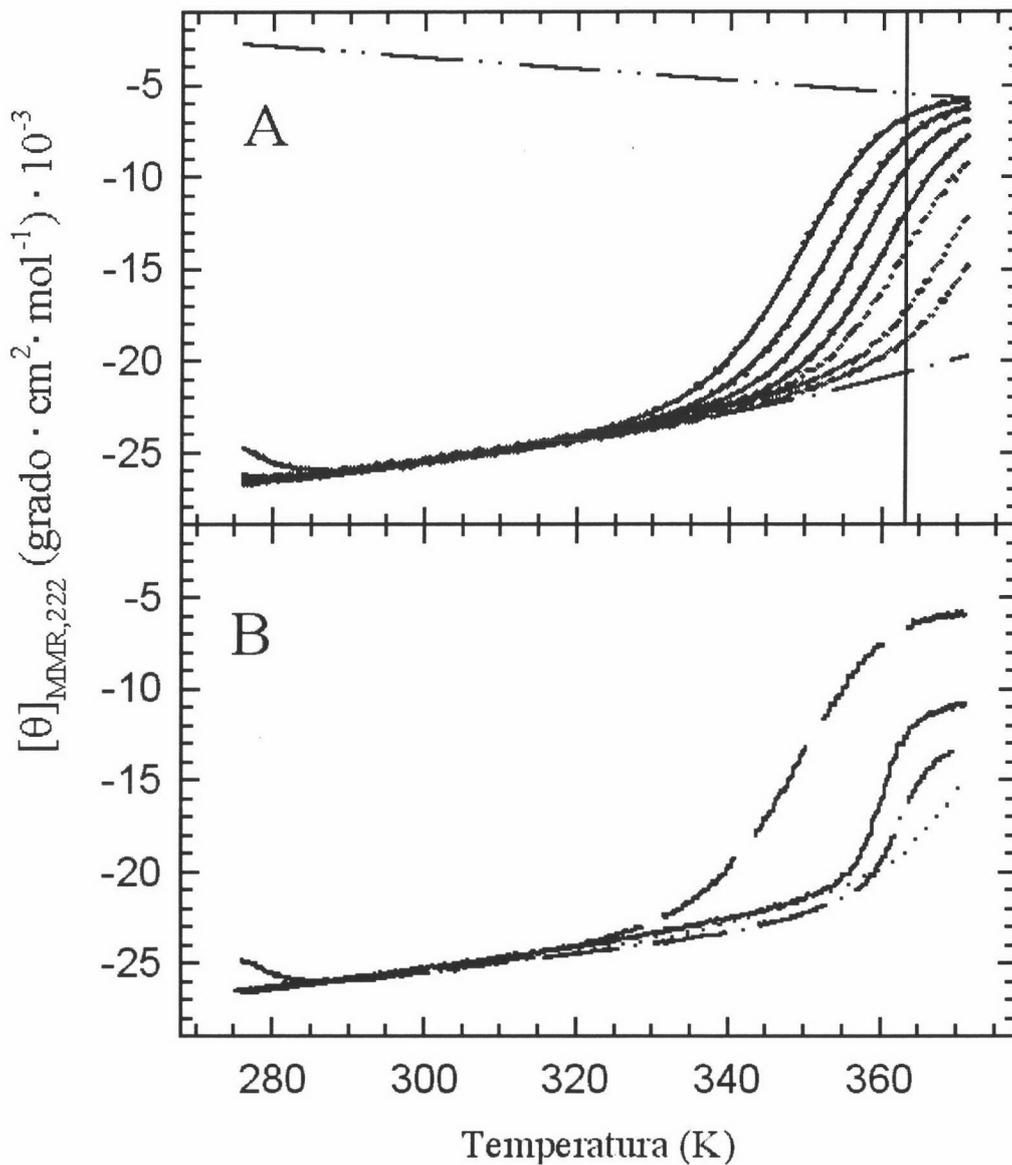
$$m_{\text{gu}} = (0.18 \pm 0.35) \cdot \Delta \text{ASA}_{\text{np}} + (0.500 \pm 0.87) \cdot \Delta \text{ASA}_{\text{pol}} \quad (4.2.13)$$

donde los valores de  $m_u$  y  $m_{\text{gu}}$  vienen expresados en  $\text{cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ .

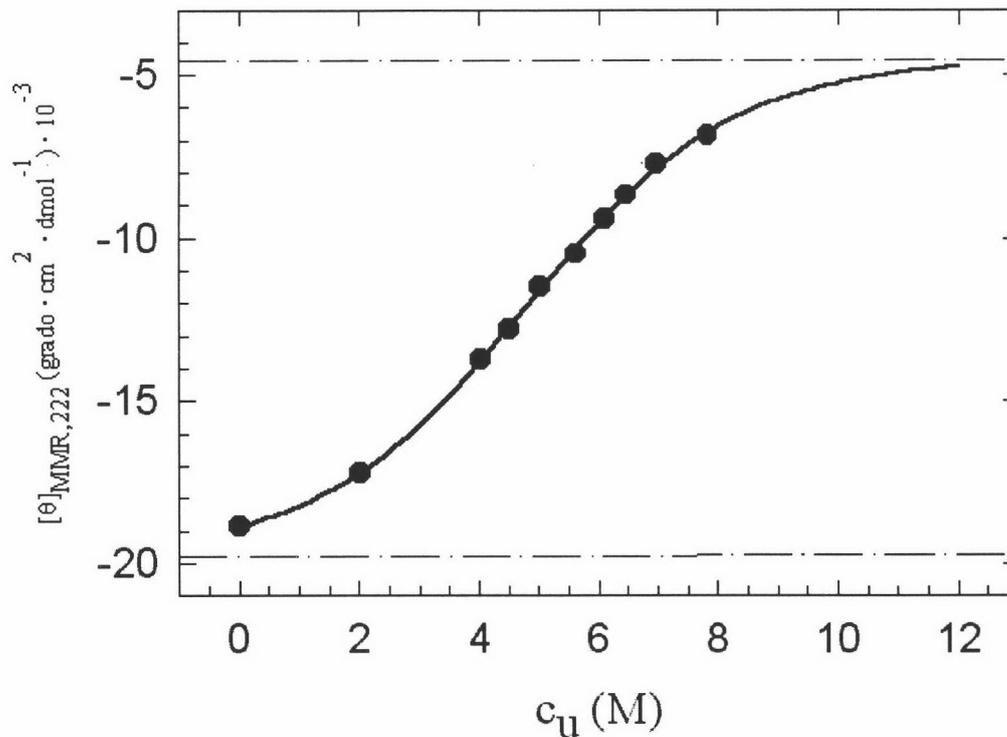
Para AS-48,  $m_u = 3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$  y  $m_{\text{gu}} = 6.3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ .

#### 4.2.4 ESTUDIO DEL DESPLEGAMIENTO EN PRESENCIA DE UREA MEDIANTE DICROÍSMO CIRCULAR

El estudio del desplegamiento mediante DC, en presencia de urea, de la proteína AS-48 se ha realizado a partir de las curvas de desplegamiento térmico obtenidas a diferentes concentraciones de desnaturizante (Figura 4.2.5), como se ha descrito en la sección 3.7. En el caso general, el análisis de los datos de la desnaturalización en presencia de urea permite calcular los parámetros termodinámicos del desplegamiento y de unión a este desnaturizante. Sin embargo, la alta estabilidad de AS-48 no ha hecho posible obtener las curvas completas de desnaturalización, incluso a alta concentración de urea, con lo que ha sido necesario utilizar algunas estrategias en el procedimiento de análisis para lograr la completa caracterización termodinámica.



**Figura 4.2.5:** Curvas de desplegamiento inducidas por la temperatura seguidas por DC a 222 nm de la proteína AS-48 en tampón fosfato 10 mM, pH 2.5 conteniendo diferentes concentraciones de urea. **PANEL A.** De derecha a izquierda las curvas corresponden a las concentraciones de urea: 0, 2.01, 4.04, 5.01, 6.10, 6.96 y 7.82. Los datos experimentales corresponden a los símbolos (●), mientras que las líneas sólidas representan los resultados del análisis múltiple de las curvas de concentraciones de urea comprendidas entre 5.01 y 7.82 M utilizando el modelo de dos estados, como se describe en el texto. Las líneas discontinuas representan las líneas base de los estados nativo y desnaturalizado,  $\theta_{222,N}$  y  $\theta_{222,D}$  respectivamente. La línea vertical corresponde a los valores de  $\theta_{222}$  de las distintas curvas a 363 K. **PANEL B.** Las curvas de trazo discontinuo (—) y punteada (· · ·) representan las desnaturalizaciones a concentraciones de urea 7.82 M y 0 M respectivamente, que figuran en el panel A. La curva representada con trazo continuo se realizó en tampón fosfato 10 mM, ClK 1.7 M, pH 2.5 en presencia de urea 7.82 M. Para comparar estas curvas con las correspondientes a las realizadas en presencia de guanidina en las mismas condiciones experimentales, se muestra la curva (— · —) realizada en tampón fosfato 10 mM, pH 2.5, 1 M guanidina.



**Figura 4.2.6:** El mejor análisis realizado aplicando la aproximación al MEL, de la curva de titulación en presencia de urea de AS-48 a 363 K, construida a partir de las dependencias de la temperatura que se muestran en la Figura 4.2.5). Los datos experimentales se representan por •, y el resultado del análisis mediante la línea continua (—). Las líneas base obtenidas del análisis equivalen a los trazos discontinuos. Los parámetros que resultan de dicho análisis con los siguientes:  $\Delta G_D(363)=8.4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ;  $m_u(363)=1.75 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ ;  $C_{m,u}(363)=4.78 \text{ M}$ .

Como se observa en la Figura 4.2.5, en el intervalo comprendido entre 298 (25 °C) y 330 K (55 °C) la estructura de AS-48 no desnaturaliza, incluso en presencia de urea a concentración 8 M. Por eso, para este desnaturalizante no se han realizado las curvas de titulación dentro de dicho intervalo de temperatura, aunque es posible obtener una curva de este tipo a partir de la dependencia de  $\theta_{222}$  con la temperatura de las curvas de desnaturalización térmica de la Figura 4.2.5. Para ello, se ha seleccionado una temperatura suficientemente alta, 363 K (90 °C) a la que se obtienen los valores de  $\theta_{222}(363)$  a diferentes concentraciones de urea, dando lugar a una curva completa de titulación (Figura 4.2.6) sin necesidad de exponer la proteína experimentalmente a temperaturas tan altas como ésta, lo que originaría fenómenos de agregación de la proteína y de descomposición de la urea que harían irreproducibles dichos datos experimentales. El análisis de la curva de titulación de la Figura 4.2.6 utilizando los métodos de extrapolación lineal (MEL) y de unión al

TABLA 4.2.3

DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD DE LA UREA EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LA DISOLUCIÓN A DIFERENTES TEMPERATURAS SEGÚN LOS DATOS DE STOKES (1967) UTILIZADOS POR MAKHATADZE & PRIVALOV (1992). <sup>(1)</sup> Medida a 25°C

$c_u$ (M) <sup>(1)</sup>	$a_u$		
	10 °C	25 °C	40 °C
1	0.946	0.964	0.984
2	1.823	1.880	1.931
3	2.656	2.772	2.868
4	3.469	3.661	3.818
5	4.281	4.564	4.796
6	5.113	5.495	5.809
7	5.98	6.467	6.859
8	6.899	7.488	7.940

desnaturalizante (MUD) (sección 3.7.8), permitirá estimar de forma adecuada el valor de  $\Delta G_D$  como se detalla a continuación:

En primer lugar, la aplicación de la aproximación MEL a esta curva de titulación empleando las ecuaciones descritas en la sección 3.7.8, permite obtener los valores de 8.4 kJ·mol<sup>-1</sup> y 1.75 kJ·mol<sup>-1</sup>·M<sup>-1</sup> para  $\Delta G_D$  y  $m_u$  respectivamente a 363 K.

En segundo lugar, como se menciona en la sección 3.7.8, para aplicar la aproximación MUD hay que calcular actividades en lugar de concentraciones molares. En el caso de utilizar urea como agente desnaturalizante, las actividades a 25 °C que se encuentran descritas en la literatura se han estimado mediante la siguiente fórmula empírica (Pace, 1986), en la que  $a_u$  y  $c_u$  representan respectivamente la actividad y la concentración molar de la urea:

$$a_u = 0.9815 \cdot c_u - 0.02978 \cdot c_u^2 + 0.00308 \cdot c_u^3 \quad (4.2.14)$$

Por otra parte, Makhatadze et al., (1993) realizaron una estimación de los coeficientes de la actividad de la urea en un intervalo de temperatura entre 10 y 40 °C. En el caso de los estudios mediante DC de la proteína AS-48 esto nos ha permitido deducir los valores de  $a_u$  en función de la temperatura. Suponiendo una dependencia de tipo lineal para la variación de los coeficientes de actividad de urea con la temperatura, ha sido posible deducir la siguiente ecuación empírica a partir de los datos que se muestran en la Tabla 4.2.3:

$$a_u = (0.958 + 1.307 \cdot 10^{-4} \cdot t_r) \cdot c_u - (0.0277 - 8.9 \cdot 10^{-4} \cdot t_r) \cdot c_u^2 + (2.725 \cdot 10^{-3} - 4.52 \cdot 10^{-5} \cdot t_r) \cdot c_u^3 \quad (4.2.15)$$

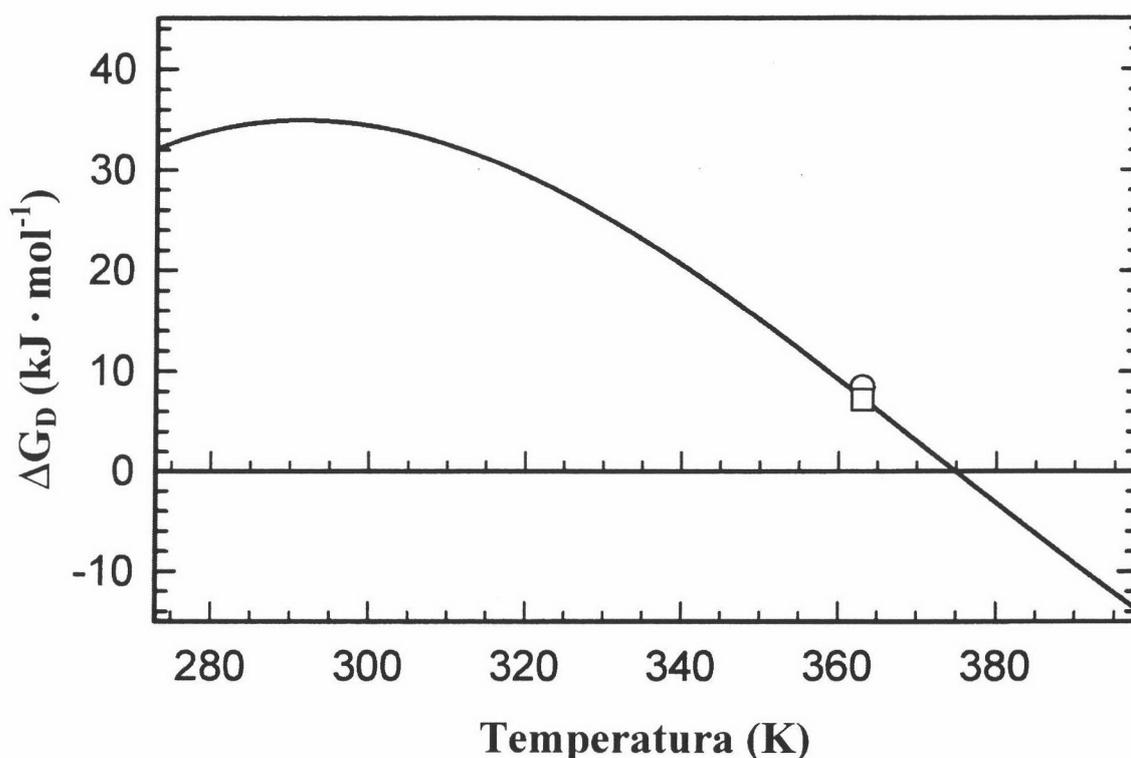
donde  $t_r = T - 298.15$ . Con esta ecuación se obtienen los datos de  $a_u$  que se representan en la Tabla 4.2.4.

Para poder aplicar el modelo MUD a cualquier temperatura diferente de la estándar ha sido necesario encontrar del mismo modo la dependencia de la constante  $K_b$  con la temperatura. Esto ha sido posible aplicando la ecuación de van't Hoff (ecuación 3.6.26 de la sección 3.6) a este caso, asumiendo que el valor de la entalpía de unión a la urea a la proteína,  $\Delta H_b$ , es independiente de la temperatura y presenta el valor de  $-9$  kJ/mol (Makhatadze & Privalov, 1992).

La aplicación del modelo MUD con las ecuaciones correspondientes descritas en la sección 3.7.8 ha permitido calcular un valor de  $\Delta G_D = 8.1$  kJ·mol<sup>-1</sup>. Dicho valor, junto con el obtenido mediante MEL, está de acuerdo con el correspondiente estimado mediante CDB como se observa en la Figura 4.2.7, en la que se comparan estos tres valores a través de la extrapolación de la función  $\Delta G_D(T)$  calculada para CDB a 363 K (90 °C), ya que no es posible extrapolar los valores de  $\Delta G_D$  calculados mediante MEL y MUD al no conocer el valor de  $\Delta C_p$ .

Por otra parte, de las curvas experimentales de desnaturalización térmica en presencia de urea se calculan los parámetros termodinámicos del desplegamiento y de unión al desnaturalizante. Sin embargo, como se ha mencionado al comienzo de esta sección, la alta estabilidad que presenta AS-48 hace que las curvas experimentales obtenidas a concentraciones de urea menores de 4 M (Figura 4.2.5) no lleguen a completarse. Por esta razón, el análisis realizado sobre todas estas curvas se ha llevado a cabo de forma múltiple, abarcando el conjunto comprendido entre las de concentración 4.04 y 7.82 M de urea, tal como se describe en la sección 3.7.9, suponiendo una dependencia de  $\Delta C_{p,den}$  ( $\Delta C_{p,u}$  en este caso) independiente de la temperatura y partiendo de la curva de mayor concentración de desnaturalizante (Figura 4.2.5). Esta curva presenta evidencia de desnaturalización por frío, que puede calcularse, junto a la temperatura de la transición, mediante el análisis individual de la misma. A partir de aquí es posible calcular el valor del  $\Delta C_{p,u}$  correspondiente que se utilizará posteriormente para el análisis múltiple de las curvas restantes. De esta manera se obtienen los valores de  $\Delta H_{m,u}$  y  $T_{m,u}$ , este último con una precisión relativamente alta.

El número total de sitios de unión al desnaturalizante se ha calculado aplicando al desplegamiento térmico de AS-48 en presencia de urea, por una parte, la ecuación 3.7.21, en



**Figura 4.2.7:** Comparación entre la dependencia del cambio de energía de Gibbs con la temperatura en el desplegamiento de AS-48 en tampón fosfato 10 mM, pH 2.5 (línea continua) medido por CDB y en presencia de urea (símbolos). Los datos representados por los símbolos  $\square$  y  $\circ$  representan las estimaciones de la energía de Gibbs realizadas aplicando las aproximaciones MEL y MUD respectivamente a los datos de desplegamiento en presencia de urea a 363 K.

la que se ha utilizado el valor de  $\Delta S_D(T_{m,u})$  obtenido a partir de los datos de CDB, y por otra, la ecuación 3.7.23 de la sección 3.7.9. Dichos resultados se representan en la Tabla 4.2.4. Los valores son muy similares y están próximos a 15.4, valor encontrado para  $\Delta n_{b,u}$  aplicando directamente la aproximación del MUD. Hay que destacar que el valor promedio que indica aproximadamente 17 sitios de unión se ha obtenido a partir de largas extrapolaciones y corresponde solo al intervalo de temperatura comprendido entre 349 y 374 K, con lo que no debe de ser referido a 298 K.

Los valores de  $\Delta H_{m,u}$  y  $T_{m,u}$  que aparecen en la Tabla 4.2.4 obtenidos del análisis de las curvas de la Figura 4.2.5 se correlacionan muy bien con los correspondientes calculados mediante CDB. Generalmente, el valor de  $\Delta C_{p,u}$  no puede ser calculado con la suficiente precisión partiendo de una sola curva no calorimétrica a menos que en ella se observe la

TABLA 4.2.4

PARÁMETROS TERMODINÁMICOS DE LAS CURVAS DE DESPLEGAMIENTO DE AS-48 OBTENIDAS POR DC EN PRESENCIA DE UREA A pH 2.5

$C_{urea}$ mol·L <sup>-1</sup>	$T_{m,u}$ K	$\Delta H_{m,u}$ kJ·mol <sup>-1</sup>	$a_u$ M	$K_{b,m} \cdot 10^3$ M <sup>-1</sup>	$\Delta n_{b,u}^{(2)}$	$\Delta S_D(T_{m,u})^{(1)}$ kJ·K <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup>	$\Delta n_{b,u}^{(3)}$	$\Delta H_{b,u}$ kJ·mol <sup>-1</sup>	$\Delta H_{m,u,cal}$ kJ·mol <sup>-1</sup>
0	374.9 <sup>(1)</sup>	231.6*	0	31.0	-	0.618	-	0	231.6
4.04	364.6	218.6	4.72	33.5	17.4	0.617	17.0	-20.9	221.0
4.52	362.8	212.5	5.30	34.0	17.1	0.614	17.0	-23.4	207.0
5.01	361.4	208.3	5.92	34.4	17.0	0.613	17.0	-25.9	204.5
5.61	359.5	206.0	6.66	35.0	17.2	0.609	16.9	-28.8	200.9
6.10	357.8	203.6	7.27	35.5	17.2	0.605	16.9	-31.1	197.4
6.47	362.2	200.6	7.72	36.0	17.2	0.602	16.9	-32.8	193.0
6.96	354.1	192.3	8.31	36.6	16.7	0.596	16.9	-34.9	188.9
7.82	349.8	176.5	9.32	38.0	15.7	0.582	16.6	-38.1	180.6
Valor medio					16.9		16.9		

<sup>(1)</sup> Datos tomados del análisis de CDB utilizando la aproximación de Privalov y Makhatadze (PM).

<sup>(2)</sup> Datos calculados a partir de la ecuación 3.7.22. Representando  $T_{m,u}$  vs  $a_u(T_{m,u})$  se obtiene una línea recta cuya pendiente corresponde a:  $d(T_{m,u})/da_u = -2.54 \text{ K} \cdot \text{M}^{-1}$ .

<sup>(3)</sup> Datos calculados usando la ecuación 3.7.21. La representación lineal de  $\ln(T_{m,ur})$  vs  $\ln[1+K_b(T_{m,u}) \cdot a_u(T_{m,u})]$  permite obtener una pendiente que viene dada por  $d\ln[1+K_b(T_{m,u}) \cdot a_u(T_{m,u})]/d\ln(T_{m,u}) = -4.52$ .

desnaturalización “por frío”. Esto se debe, por una parte, a que las poblaciones del estado nativo y desnaturalizado que son las que definen la forma sigmoïdal de las curvas de desnaturalización térmica dependen del valor de  $\Delta H_{m,u}$  pero no de  $\Delta C_{p,u}$ . Además, la distancia entre las temperaturas correspondientes a las desnaturalizaciones por calor y frío en estas curvas está directamente relacionada con el cambio de capacidad calorífica independientemente de que este se considere dependiente o no de la temperatura. De hecho, a estos dos valores de temperatura se cumple la condición  $\Delta S_{m,u} = \Delta H_{m,u} / T_{m,u}$  que para el caso de disponer de una sola curva y considerar que el cambio de capacidad calorífica varía con la

temperatura, puede corresponderse con varias funciones de capacidad calorífica. Sin embargo, en caso de asumir que el cambio de capacidad calorífica no varía con la temperatura existe un único valor promedio del mismo obtenido a partir de la condición anterior. Dicho valor promedio, además, contiene información acerca de las regiones de desplegamiento “por frío” y por “calor” presentes en la curva. En nuestro caso solo es posible obtener ambas ramas de desplegamiento en la curva de desplegamiento térmico a concentración 7.82 M de urea. Los resultados del análisis de esta curva que se muestran en la Figura 4.2.8 indican un valor de  $\Delta C_{p,u} = 3.75 \pm 0.2 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ . La buena calidad los resultados de este análisis no implica, sin embargo, que el valor de  $\Delta C_{p,u}$  sea realmente independiente de la temperatura.

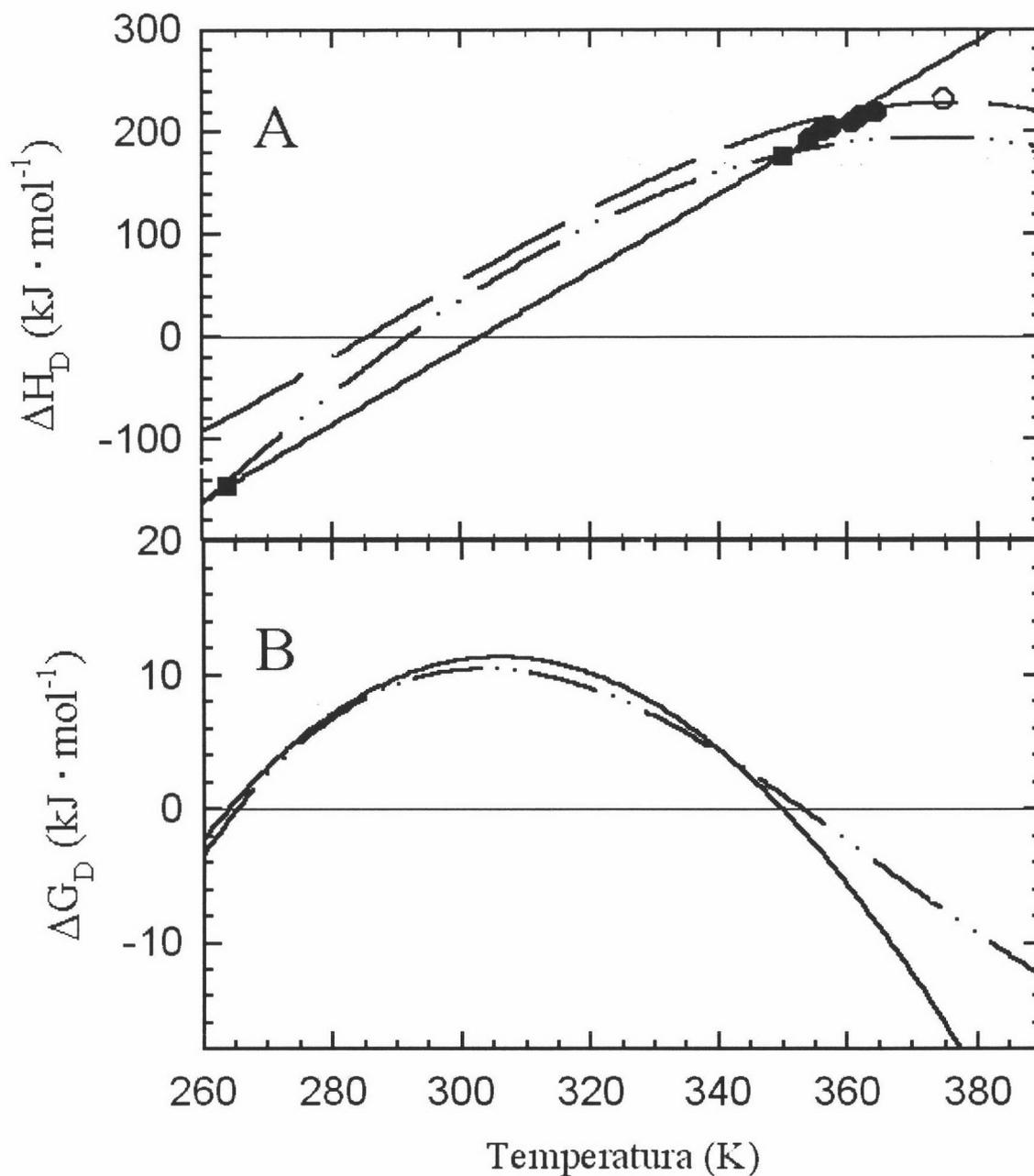
La función descrita por la siguiente ecuación:

$$\Delta H_u(T) = \Delta H_D(T) + \Delta H_{b,u}(T) \quad (4.2.16)$$

se muestra en la Figura 4.2.8. En ella  $\Delta H_D(T)$  se ha calculado usando una aproximación para la línea base del estado desnaturalizado  $C_{p,D}$  de tipo polinomial, como se ha descrito en el caso de las curvas obtenidas por CDB y el valor de  $\Delta H_{b,u} = -38.1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  calculado para la curva a concentración 7.82 M de urea por el MUD (Tabla 4.2.4). El cambio de energía de Gibbs en presencia de desnaturalizante,  $\Delta G_u$ , correspondiente a esta función curvada de entalpía y a las temperaturas de las desnaturalizaciones por “frío” y “calor”, están de acuerdo con el valor de  $\Delta G_u$  obtenido suponiendo un  $\Delta C_{p,u}$  constante dentro del límite marcado por estas dos temperaturas.

#### 4.2.5 ESTUDIO DEL DESPLEGAMIENTO INDUCIDO POR GUANIDINA MEDIANTE DICROÍSMO CIRCULAR

Debido al fuerte efecto desnaturalizante que presenta la guanidina, AS-48 despliega en presencia de altas concentraciones de este agente a temperatura ambiente, a diferencia de lo que sucede en presencia de urea. Las curvas de titulación realizadas a cuatro temperaturas distintas (25, 35, 45 y 55 °C) se muestran en la Figura 4.2.9 y presentan una forma típica en “S”, aunque el pequeño desplazamiento de unas respecto a otras manifiesta la resistencia de la proteína frente a la desnaturalización inducida por la guanidina. Además se observa una transición muy aguda en comparación a las curvas de titulación inducidas por guanidina obtenidas para otras proteínas globulares de tamaño parecido (Filimonov et al., 1999).



**Figura 4.2.8:** Dependencia de las funciones termodinámicas para el desplegamiento de AS-48 a pH 2.5 con la temperatura en presencia de urea. **PANEL A:** cambio de entalpía de desplegamiento  $\Delta H_m$  vs  $T_m$  (○); los símbolos rellenos describen la dependencia  $\Delta H_{m,u}$  vs  $T_{m,u}$  encontrada partir del análisis múltiple de las curvas de  $\theta_{222}(T)$  obtenidas en el intervalo de concentración de urea comprendido entre 4.0 y 7.82 M, considerando un valor constante para  $\Delta C_{p,u}$ ; los símbolos ■ representan la desnaturalización por frío y calor de AS-48 a una concentración 7.82 M de urea, mientras que la línea continua muestra la dependencia de  $\Delta H_{m,u}$  con la temperatura con un valor de  $\Delta C_{p,u}(7.82 \text{ M}) = 3.75 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ . Para comparar, también se incluye la función de la entalpía que se muestra en la Figura 4.2.7 (línea discontinua). La línea discontinua punteada corresponde a la función  $\Delta H_D$  desplazada en 38.1 kJ · mol<sup>-1</sup> (ver texto). **PANEL B:** cambios de energía de Gibbs. Los diferentes tipos de líneas corresponden a los descritos para el panel anterior.

Estas curvas se han analizado empleando los métodos de aproximación MEL y DBM como se explica a continuación.

En primer lugar, el análisis de estas curvas siguiendo el modelo MEL, descrito en la sección 3.7.8, mediante la ecuación 3.7.12, se ha realizado, tal como se describe en aquella sección, suponiendo que las variaciones de la elipticidad con la concentración de desnaturalizante en los estados nativo y desnaturalizado son funciones lineales. Los resultados de dicho análisis se muestra en la Figura 4.2.9 y se resumen en la Tabla 4.2.5. Estos resultados muestran que el valor de  $\Delta G_D(298)$  obtenido de esta manera es aproximadamente el doble a cualquier temperatura respecto al valor encontrado de los datos de CDB y de los experimentos de desplegamiento en presencia de urea seguidos por DC, como se ha descrito en la sección anterior.

El método MEL es un método bastante simple (sección 3.7.8) para calcular de forma aproximada el valor de  $\Delta G_D$ . Con objeto de mejorar dicho modelo se han descrito en la literatura otras aproximaciones como la que presentan Clarke y colaboradores (Parker et al., 1995), que nosotros hemos utilizado para comprobar la validez del MEL sobre nuestros resultados experimentales. Parker et al., (1995) han sugerido una aproximación a la que llamaremos MEL-C en la que se utiliza una actividad efectiva del desnaturalizante en lugar de su concentración molar. Para el caso de la guanidina la relación entre dicha actividad efectiva,  $D_{gu}$ , y la concentración molar de la misma,  $c_{gu}$ , se describe por la ecuación:

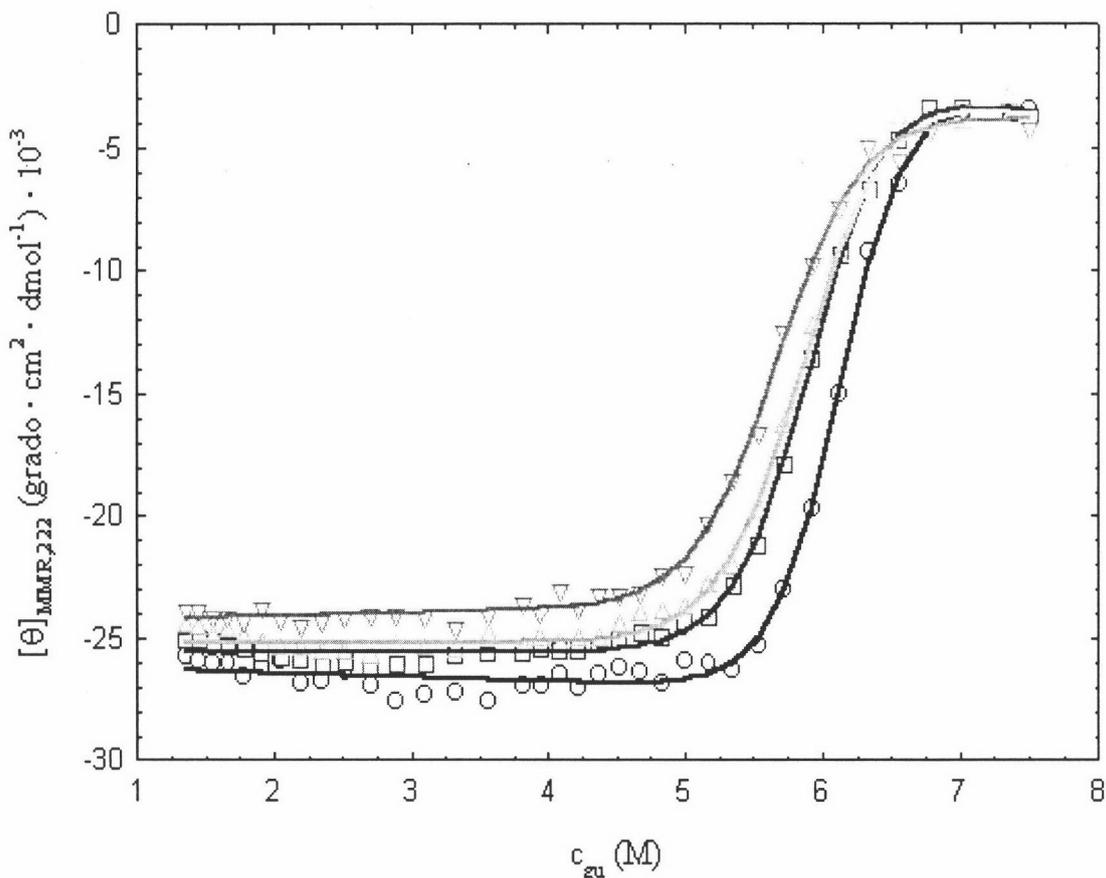
$$D_{gu} = 7.5 \cdot c_{gu} / (7.5 + c_{gu}) \quad (M) \quad (4.2.17)$$

La ecuación que estos autores proponen para el cambio de energía de Gibbs del desplegamiento, puede compararse a la descrita para MEL en la sección 3.7.8 (ecuación 3.7.12) y es la siguiente:

$$\Delta G(T, D) = \Delta G_D(T) + RT \cdot m_{D,gu} \cdot D_{gu} \quad (4.2.18)$$

Comparando el factor  $m_{D,gu}$  de esta ecuación con el correspondiente al que se presenta en la ecuación 3.7.12,  $m_{den}$  ( $m_{gu}$  en el caso de guanidina),  $m_{D,gu}$  debe ser negativo y se expresa en  $M^{-1}$  en lugar de  $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot M^{-1}$ . Por estas razones no es fácil comparar los valores de  $m_{gu}$  y  $m_{D,gu}$  obtenidos en la literatura para diversas proteínas.

El análisis de los datos con la aproximación de Clarke ha supuesto, en primer lugar, calcular las actividades  $D_{gu}$  a partir de las concentraciones molares de guanidina, mediante la ecuación 4.2.17 y obtener la relación entre dichos valores y los valores experimentales de  $\theta_{222}$ .



**Figura 4.2.9:** Curvas de titulación inducidas por la presencia de guanidina de AS-48 en tampón fosfato 10 mM, pH 2.5 a varias temperaturas: 25 °C (○), 35 °C (□), 45 °C (Δ) y 55 °C (▽). Las líneas continuas representan el análisis mediante la aproximación del MEL.

Para realizar el análisis de estas curvas según la ecuación 4.2.18 se han supuesto, igual que para el caso del análisis según MEL, funciones lineales para las líneas base de los estados nativo (N) y desnaturalizado (D). Los resultados de dicho análisis se muestran en la Tabla 4.2.5.

Por otra parte, la aplicación del MUD mediante la ecuación 3.7.15 a los datos obtenidos de las titulaciones realizadas con guanidina ha requerido, de la misma forma que en el caso de urea, realizar el cálculo de las actividades. Así, se han utilizado dos ecuaciones para calcular las actividades a partir de los valores de concentración correspondientes: la ecuación empírica sugerida por Pace (Pace, 1986), aplicada a 25 °C y la calculada a partir de los datos de actividades de Makhatadze y Privalov (Makhatadze et al., 1993) de forma análoga a la descrita en la sección 4.2.5 para la urea. Estas ecuaciones son respectivamente:

$$a_{\text{gu}} = 0.6761 \cdot c_{\text{gu}} - 0.1468 \cdot c_{\text{gu}}^2 + 0.02475 \cdot c_{\text{gu}}^3 - 0.00132 \cdot c_{\text{gu}}^4 \quad (4.2.19)$$

TABLA 4.2.5

PARÁMETROS TERMODINÁMICOS DEL ANÁLISIS DE LAS CURVAS DE TITULACIÓN OBTENIDAS POR DC EN PRESENCIA DE GUANIDINA, MEDIANTE VARIOS MODELOS: MEL (ECUACIÓN 3.7.12); MEL-C (ECUACIÓN 4.2.18); MUD (ECUACIÓN 3.7.15) UTILIZANDO EN ÉSTOS DOS LAS DEPENDENCIAS DE LA ACTIVIDAD DE GUANIDINA CON LA TEMPERATURA SUGERIDAS POR PACE (1996) Y MAKHATADZE ET AL. (1993) (ECUACIONES 4.2.20 Y 4.2.21 RESPECTIVAMENTE) Y LOS VALORES DE  $K_{b,gu}(298) = 0.6 \text{ M}^{-1}$  y  $\Delta H_{b,gu} = -11 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . LOS ERRORES CALCULADOS ESTÁN EN TORNO AL 5 %. PARA COMPARAR, SE PRESENTAN LOS DATOS OBTENIDOS POR CDB.

MODELO	PARÁMETRO	25 °C	35 °C	45 °C	55 °C
MEL	$\Delta G_D (\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	63.5	52.9	47.9	46.8
	$m_{gu} (\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1})$	10.0	8.9	8.1	8.2
MEL-C	$\Delta G_D (\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	117.4	103.7 <sup>(1)</sup>	95.0 <sup>(1)</sup>	89.0 <sup>(1)</sup>
	$m_{D,gu} (\text{M}^{-1})$	-14.1	-12.3	-10.9	-10.1
MUD	$\Delta G_D (\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	87.6	75.3	66.3	62.4
	$\Delta n_{b,gu}$	38.9	35.3	32.2	31.9
CDB	$\Delta G_D (\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	34.6	33.0	30.1	26.2

<sup>(1)</sup>Debido a que no se conoce la dependencia del parámetro  $D_{gu}$  con la temperatura en la aproximación MEL-C, en todos los casos se ha utilizado el valor calculado a 298 K.

$$a_{gu} = [0.6737 + 1.702 \cdot 10^{-4} \cdot t_r] c_{gu} - [0.1449 - 5.0 \cdot 10^{-4} \cdot t_r] c_{gu}^2 + [0.02437 - 4.7 \cdot 10^{-5} \cdot t_r] c_{gu}^3 - [1.299 \cdot 10^{-3} - 2.5 \cdot 10^{-6} \cdot t_r] c_{gu}^4 \quad (4.2.20)$$

donde  $t_r = (T - T_r)$  siendo  $T_r = 298.15 \text{ K}$ . Los datos utilizados para calcular esta ecuación se resumen en la Tabla 4.2.6.

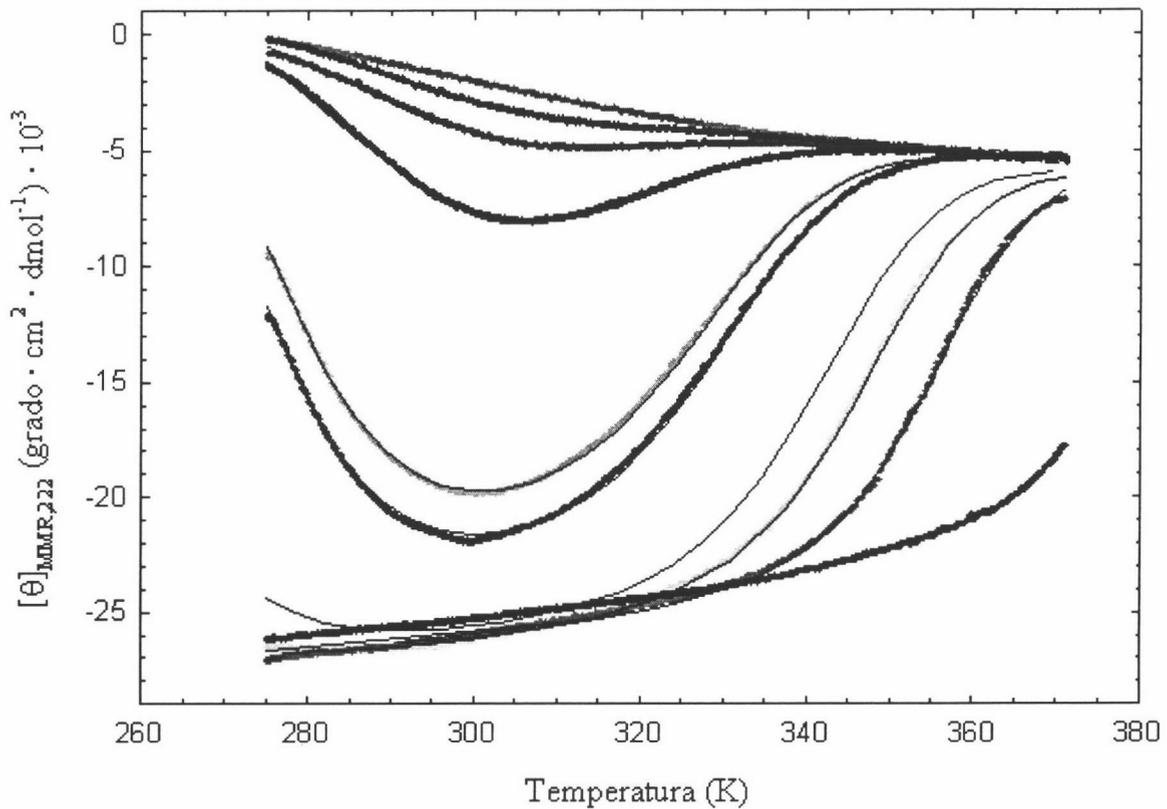
**TABLA 4.2.6**

**COEFICIENTES DE ACTIVIDAD DE GUANIDINA EN DISOLUCIÓN ACUOSA A DIFERENTES TEMPERATURAS Y CONCENTRACIONES MOLARES (MEDIDAS ÉSTAS A 298.15 K) (DATOS TOMADOS DE MAKHATADZE ET AL., 1993)**

$c_{gu}$ (mol/L)	TEMPERATURA (K)						
	283.15	288.15	293.15	298.15	303.15	308.15	313.15
1.0	0.541	0.546	0.550	0.552	0.556	0.558	0.559
2.0	0.452	0.459	0.466	0.471	0.475	0.480	0.483
3.0	0.400	0.408	0.415	0.423	0.429	0.434	0.439
4.0	0.373	0.383	0.393	0.401	0.408	0.415	0.421
5.0	0.365	0.376	0.387	0.396	0.404	0.412	0.420
6.0	0.366	0.379	0.391	0.401	0.410	0.419	0.428
7.0	0.370	0.384	0.396	0.408	0.419	0.429	0.437

Para concentraciones inferiores a 4 M de guanidina, para las que la mayoría de las proteínas globulares despliegan, la aplicación de MUD a las curvas de titulación utilizando las fórmulas de Pace y la de Makhatadze y Privalov para el cálculo de la actividad de guanidina (a las que llamaremos MUD y MUD-PM respectivamente) conducen a resultados similares; sin embargo, a concentraciones mayores surgen discrepancias crecientes en dichos resultados. En el caso concreto de la proteína AS-48, cuando la actividad se calcula mediante la fórmula sugerida por Pace (Pace, 1986), el valor del número de sitios de unión a guanidina consecuencia del desplegamiento,  $\Delta n_{b,gu}(298)$ , es aproximadamente de 34 a 298 K, valor demasiado alto para el caso de una proteína globular como AS-48, con un valor para el cambio de energía de Gibbs debido al desplegamiento,  $\Delta G_D(298)$ , en torno a 75 kJ/mol. Sin embargo, la aplicación de la formulación sugerida por Privalov y Makhatadze a MUD (MUD-PM), proporciona unas estimaciones más razonables para estos parámetros:  $\Delta n_{b,gu}(298) = 12.6$  y  $\Delta G_D(298) = 49$  kJ/mol. Este último valor es superior a los correspondientes valores encontrados por CDB en torno a 25-30 kJ·mol<sup>-1</sup>.

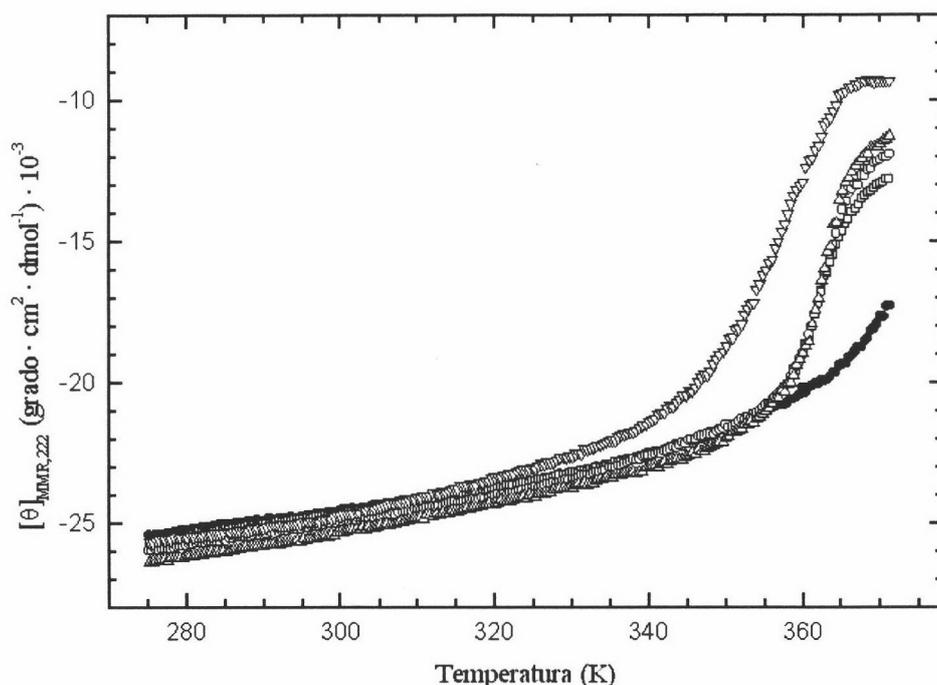
Por otra parte, las curvas de desnaturalización térmica en presencia de guanidina de la Figura 4.2.10 muestran claramente la desnaturalización por frío de AS-48. Los parámetros relacionados, en particular los cambios de entalpía debida a la desnaturalización y de capacidad calorífica, pueden deducirse mediante el análisis de las mismas aplicando el modelo de dos estados.



**Figura 4.2.10:** Curvas de desplegamiento de DC inducidas por la temperatura para AS-48 en tampón fosfato 10 mM, pH 2.5 en presencia de guanidina, a las concentraciones (de izquierda a derecha): 0, 4.53, 5.08, 5.48, 6.13, 6.32, 6.60, 6.90, 7.10 y 7.63 M. Las curvas coloreadas representan los datos experimentales y las líneas continuas (en negro) el resultado del análisis múltiple sobre las mismas aplicando el modelo de dos estados mediante las ecuaciones descritas en el texto.

Las curvas correspondientes a concentraciones entre 0 y 4 M de guanidina presentan transiciones completamente irreversibles debido probablemente a la agregación de la proteína a altas temperaturas (Figura 4.2.11). Por eso en el análisis solo se han considerado aquellas cuyas concentraciones de guanidina están comprendidas entre 4.5 y 7.6 M.

El análisis múltiple de las curvas experimentales de desplegamiento térmico de AS-48 en presencia de guanidina se ha realizado como se describe en la sección 3.7.9 utilizando un proceso de ajuste no lineal de mínimos cuadrados de las ecuaciones del modelo de dos estados, asumiendo que el valor de  $\Delta C_{p,den}$  ( $\Delta C_{p,gu}$  en este caso) es independiente del cambio de temperatura. Dicho análisis se ha realizado suponiendo que la línea base del estado desplegado,  $\theta_{222,D}$ , para todas ellas es la que presenta la curva a concentración 7.6 M de guanidina, como se observa en la Figura 4.2.10, para la que se ha encontrado una dependencia cuadrática con la temperatura que viene dada por la ecuación:



**Figura 4.2.11:** Curvas de desnaturalización térmica irreversible de AS-48 en tampón fosfato 10 mM, pH 2.5 obtenidas por DC en el intervalo de bajas concentraciones de guanidina. De izquierda a derecha: 4.10 M ( $\nabla$ ), 3.06 M ( $\Delta$ ), 2.04 M ( $\circ$ ); 0.98 M ( $\square$ ). La curva a concentración 0 M de guanidina ( $\bullet$ ) se incluye para compararla con las curvas restantes.

$$\theta_{222,D} = -1.58 - 0.07776 \cdot t_r + 3.66 \cdot 10^{-4} \cdot t_r^2 \quad (4.2.21)$$

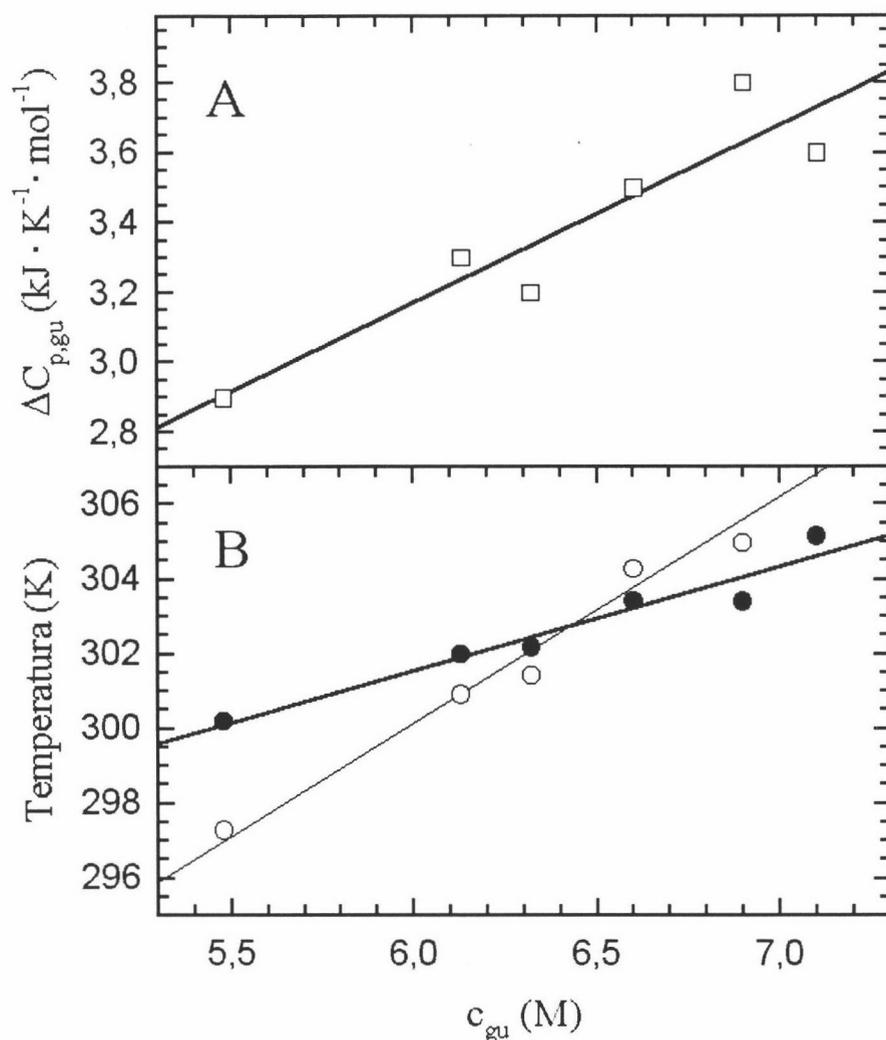
A la vista de las curvas experimentales de la Figura 4.2.10 se observa que, al igual que ocurre con  $\theta_{222,D}$ ,  $\theta_{222,N}$ , también sigue una dependencia cuadrática de la temperatura. En este caso, la forma de esta función se ha evaluado aproximando la línea base de la curva obtenida en ausencia de guanidina, en el intervalo de temperatura comprendido entre 276 y 340 K (3 y 67 °C) (de forma que la temperatura a la que tiene lugar la transición quede muy por encima del mismo), al siguiente polinomio de segundo grado:

$$\theta_{222,N} = -25.7 + 0.0362 \cdot t_r + 2.69 \cdot 10^{-4} \cdot t_r^2 \quad (4.2.22)$$

Siguiendo el procedimiento general de análisis de estas curvas en presencia de un desnaturalizante descrito en la sección 3.7.9, y con el fin de disminuir el número de parámetros ajustables en el análisis correspondiente a este conjunto de curvas, sólo los términos independientes de las dos ecuaciones anteriores se han considerado como variables ajustables, suponiendo así que solo la posición y no la forma de la línea base es función de la concentración de desnaturalizante.

Con estas consideraciones sobre las líneas base se procedió al ajuste no lineal de las curvas experimentales según se describe en la sección 3.7.9. De las dos formas en las que puede expresarse la ecuación 3.7.18 se considera más correcta aquella que emplea las temperaturas  $T_{H,den}$  y  $T_{S,den}$ . Esta representación puede aplicarse a cualquiera de las curvas representadas en la Figura 4.2.10 mientras que la representación correspondiente a  $\Delta H_{m,den}$  y  $T_{m,den}$  solo puede emplearse en aquellos casos en que la población del estado nativo supere el 50 % a algún valor de temperatura de la curva correspondiente. Esta ecuación se ha aplicado a cada una de las curvas reversibles de la Figura 4.2.10 individualmente. Para simplificar, se ha supuesto que el valor de  $\Delta C_{p,gu}$  es independiente de la temperatura. Sin embargo, como se observa en la Figura 4.2.12 estos valores muestran una tendencia a aumentar con la concentración de guanidina. Cuando se realizó el ajuste múltiple de dichas curvas se consideró esta variación proporcional de  $\Delta C_{p,gu}$  con la concentración de desnaturizante. Esto simplificó el análisis múltiple y aumentó la calidad de los resultados del mismo. Por otra parte, el análisis múltiple de las curvas llevado a cabo suponiendo la variación de  $\Delta C_{p,gu}$  independiente de la concentración de desnaturizante también proporcionó buenos resultados. De hecho, el valor de  $\Delta C_{p,gu}$  obtenido de esta última forma para todas las transiciones inducidas por temperatura está en torno a  $3.2 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Sin embargo, como se ha demostrado en el caso de la urea, el hecho de obtener una buena calidad en los resultados del análisis múltiple no implica que el valor de  $\Delta C_{p,gu}$  sea realmente independiente de la temperatura o de la concentración de desnaturizante; por el contrario, esto solo implica que el valor promedio obtenido para  $\Delta C_{p,gu}$  puede ser empleado para introducir de forma adecuada (dentro de los límites del error experimental) el cambio de la energía de Gibbs, aunque esto no puede extenderse a la dependencia de los valores de la entropía o de la entalpía con la temperatura.

Los valores de  $T_{H,gu}$  y  $T_{S,gu}$  obtenidos del correspondiente análisis que se muestran en la Figura 4.2.12 muestran una dependencia con la concentración de guanidina, debido al proceso de unión de ésta a la proteína, lo que implica a su vez cambios en la entropía y entalpía. Como se observa en esta figura, la dependencia con la temperatura encontrada para los valores de  $T_{H,gu}$  es mayor que la correspondiente a  $T_{S,gu}$ , haciendo que ambas se crucen en torno a una concentración de guanidina de 6.4 M, valor en el cual se cumple que  $T_{H,gu} = T_{S,gu} = 302.5 \text{ K}$  (29.5 °C). Por otra parte, se sabe que la posibilidad de observar desnaturización por frío a temperaturas muy por debajo de los 273 K está favorecida cuando



**Figura 4.2.12:** Correlaciones entre algunos parámetros termodinámicos obtenidos de las curvas de la figura 2.7.8, y la concentración de guanidina. **PANEL A:** valores de  $\Delta C_{p,gu}$  y regresión lineal a través de ellos (línea continua). **PANEL B:** valores de  $T_{H,gu}$  ( $\circ$ ) y  $T_{S,gu}$  ( $\bullet$ ) y sus correspondientes regresiones lineales (líneas continuas).

los valores de  $T_H$  y  $T_S$  son altos y están relacionados con un alto valor de  $\Delta C_p$ . Para el caso de AS-48, los valores encontrados para ambas temperaturas,  $T_H$  y  $T_S$ , no son excepcionalmente elevados, aunque con el fin de compensar su alta estabilidad la proteína se une a una cantidad mayor de moléculas de desnaturizante que las encontradas para el valor promedio. Esto produce un aumento en el efecto exotérmico, lo que provoca el desplazamiento de las temperaturas de inversión  $T_H$  y  $T_S$ , haciendo posible que se observen claramente ambas ramas de la curva de desplegamiento correspondiente.

#### 4.2.6 ESTUDIO CINÉTICO DEL PLEGAMIENTO DE AS-48

Con el fin de completar el estudio del plegamiento y desplegamiento de AS-48 se siguieron, usando la técnica de flujo detenido, como se describe en la sección 3.5, las cinéticas de plegamiento y desplegamiento en presencia de guanidina a 25 °C preparada, al igual que la proteína, en tampón fosfato 10 mM a pH 2.5. En ambos casos la concentración de proteína fue del orden de 25  $\mu$ M (0.18 mg/mL). Las cinéticas medidas en los dos tipos de experimentos son muy rápidas, del orden del ms, intervalo del tiempo muerto del instrumento, y no llegaron a observarse en ningún caso.

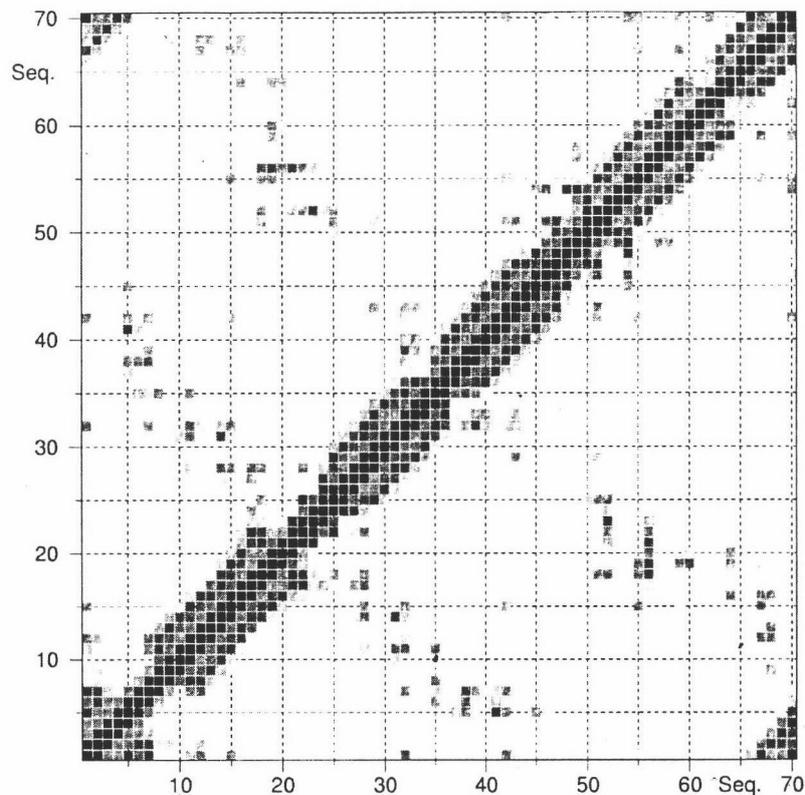
Aún así, es posible obtener una estimación de la constante cinética de plegamiento aplicando otros métodos empíricos. Recientemente, Plaxco et al. (1998b) ha determinado la correlación existente entre las constantes de plegamiento determinadas para un conjunto de proteínas y el orden de contacto (OC). Este parámetro refleja la importancia que presentan los contactos a nivel local y no local que tienen lugar en la estructura nativa de las proteínas y se define como la distancia promedio en la secuencia entre todos los pares de residuos que contactan entre sí, normalizada por el tamaño de la proteína, según la siguiente ecuación:

$$(\text{OC}) = 100 \cdot \frac{1}{L \cdot n} \sum_n \Delta Z_{i,j} \quad (4.2.23)$$

donde  $n$  es el número total de contactos en el estado nativo,  $\Delta Z_{i,j}$  el número de residuos que separan los contactos  $i$  y  $j$ , y  $L$  es el número total de residuos en la proteína.

Un valor del OC pequeño indica que los residuos presentan, en promedio, interacciones con otros restos próximos en la secuencia. Por el contrario, valores altos del OC implican que existe un gran número de interacciones entre residuos que están separados en la secuencia. Existe una correlación lineal entre el valor del  $\log k_{\ddagger-D}$  y el OC, en la que la constante de plegamiento disminuye con el aumento del OC (Fersht, 2000; Plaxco et al., 1998b), a partir de la cual es posible determinar el valor de la constante de velocidad una vez calculado el OC. Así, las proteínas con un gran número de contactos entre residuos próximos en la secuencia (valor del OC pequeño) tienden a plegar más rápidamente que aquellas con un mayor número de contactos no locales (valores altos del OC). Es decir, que las diferencias en la geometría de la estructura parecen explicar las diferencias entre las constantes de velocidad del plegamiento de diferentes proteínas.

El método de calcular este parámetro es sencillo si se dispone de la estructura de la proteína. En el caso de AS-48, a partir de sus estructuras primaria y secundaria (González et



**Figura 4.2.13:** Mapa de contactos de la proteína AS-48, calculado a partir de los datos estructurales depositados en el Banco de Datos de Proteínas (código 1e68.pdb) (González et al., 2000). Este mapa se construye alineando la secuencia de la proteína a lo largo de los ejes horizontal (residuos  $i$ ) y vertical (residuos  $j$ ). Se ha considerado que la distancia máxima para que se de el contacto entre residuos es de  $6 \text{ \AA}$  (Plaxco et al., 1998b). La distancia de cada aminoácido a sí mismo es nula (inferior a la distancia mínima considerada) y se representa por los puntos de la diagonal principal (símbolos negros). Los contactos entre residuos distintos forman una imagen simétrica a ambos lados de dicha diagonal. Si la distancia más pequeña entre dos residuos es superior a la distancia máxima considerada, no se muestra ningún contacto en el gráfico. Los contactos que se dan a distancias dentro de los límites establecidos se representan en la escala de grises (más oscuro cuanto más se acerca al límite inferior). En este caso se han tenido en cuenta los contactos entre los carbonos  $\alpha$  de la cadena principal y de las cadenas laterales de los aminoácidos. Dada la estructura de hélice a de AS-48, los contactos dentro de las hélices tienen lugar entre los residuos  $j = i + 3$  y  $j = i + 4$ .

al., 2000) puede obtenerse el mapa de contactos con ayuda del programa MolMol (Figura 4.2.13). Se considera que existe un contacto entre dos residuos,  $i$  y  $j$ , si la distancia entre sus carbonos  $\alpha$  es menor de  $6 \text{ \AA}$  (Plaxco et al., 1998b). Dado que su estructura es circular, de las dos posibles distancias existentes para la interacción entre dos residuos sólo se ha tenido en cuenta la más corta. Del mapa de contactos se deduce un número total de ellos,  $n$ , igual a 334 y un valor de  $\Delta Z_{ij} = 3499$ . Teniendo en cuenta que para AS-48  $L = 70$ , el OC que resulta

aplicando la ecuación 4.2.23 es del 15 %. Este valor indica que los pares de residuos entre los que existe un contacto en la estructura nativa se encuentran separados en un 15 % de la longitud promedio total de la secuencia. A partir de este valor y del ajuste lineal que presenta Fersht (2000) entre el  $\log k_{\ddagger-D}$  y el OC, descrito por la ecuación:  $\log k_{\ddagger-D} = 9.0694 - 0.43196 \cdot (\text{OC})$ , se obtiene un valor para  $\log k_{\ddagger-D} = 2.6$ , con lo que el valor de la constante de velocidad del plegamiento  $k_{\ddagger-D}$  del orden de  $400 \text{ s}^{-1}$ , valor muy superior al encontrado experimentalmente para otras proteínas de tamaño similar como el dominio SH3 de Fyn, para el que  $k_{\ddagger-D}$  está en torno a  $90 \text{ s}^{-1}$  (Plaxco et al., 1998a) ó el del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina y el mutante Best5I25V del mismo, descrito en esta memoria que presentan valores de  $k_{\ddagger-D}$  del orden de 4 y  $15 \text{ s}^{-1}$  respectivamente.

A partir de este pequeño valor del OC calculado y de su relación con la constante de velocidad de plegamiento determinada, se deduce que el importante papel que juega la topología del estado nativo de las proteínas puede entenderse considerando el coste entrópico de la formación de interacciones no locales durante el plegamiento. La formación de contactos entre residuos que se encuentran alejados entre sí en la secuencia (valor alto del OC) supone un gran coste entrópico, ya que esto restringe el número de conformaciones posibles en dicho segmento de la secuencia. Así, para una topología dada, las interacciones que tienen lugar entre residuos próximos en la secuencia se forman más fácilmente durante el plegamiento, es decir, aquellas topologías que presentan preferentemente interacciones locales se forman más fácilmente. De forma más general, puede decirse que la cantidad de la entropía conformacional perdida antes de que se forme la mayoría de las interacciones nativas durante el plegamiento depende de la topología del estado nativo. En este sentido, en el caso de AS-48, el rápido plegamiento parece ser una clara consecuencia de la circularización de la cadena polipeptídica lo que sugiere una notable y favorable contribución de carácter entrópico debida a este proceso de circularización de la proteína.

### 4.3 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

#### 4.3.1 ANÁLISIS TERMODINÁMICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE CDB

Según se ha explicado en la sección anterior, el estudio termodinámico de la proteína circular AS-48 no resulta una tarea sencilla, debido a las limitaciones encontradas a la hora de intentar variar la estabilidad de dicha proteína. Por esta razón, el análisis termodinámico que explique la estabilidad de esta proteína hay que basarlo en la comparación de los parámetros obtenidos del mismo con los de otros estudios existentes realizados sobre otras proteínas globulares que, al igual que AS-48, desnaturalicen siguiendo el modelo sencillo de dos estados.

De acuerdo con Privalov (1982) en el caso de muchas proteínas globulares el valor de  $\Delta H_D$  es una función lineal de la temperatura en el intervalo comprendido entre 30 y 80 °C, aunque en cada caso concreto la pendiente de dicha recta toma un valor determinado. Sin embargo, si se comparan los valores del calor específico promedio, de desplegamiento,  $\Delta h_D = \Delta H_D / P_m$ , para estas proteínas globulares, se observa que este valor converge para todas ellas a un valor aproximado a 50 J/g a 110 °C. Algo similar ocurre con la función  $\Delta S_D(T)$ , aunque en este caso dicha función no es lineal, aún suponiendo que el valor de  $\Delta C_p$  sea una función independiente de la temperatura. En este caso,  $\Delta s_D = \Delta S_D / P_m$  también converge a 110 °C para muchas proteínas globulares. Murphy et al. (1990) determinaron, por otra parte, que existe una correlación lineal entre los valores de  $\Delta H_D$  y  $\Delta C_p$  calculados por mol de residuo a 25 °C. Más tarde, esta correlación fue extendida a muchas más proteínas por Murphy et al. (1992) y Spolar et al. (1992). Estos últimos encontraron una desviación de la linealidad para el caso de la ribonucleasa T1, debido principalmente al elevado valor de  $\Delta C_p$  calculado mediante CDB (Hu et al., 1992) Posteriormente, Plaza del Pino et al. (1992) realizaron el análisis de las curvas de CDB para esta proteína encontrando un valor mucho menor para  $\Delta C_p$  que se correlacionaba bien con las convergencias anteriores. Actualmente, el único valor de éste parámetro que no se corresponde con dichas correlaciones es el de Barnasa (Martínez et al., 1994), con un  $\Delta C_p$  igual a  $6.8 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$  y un  $\Delta h_D = 75 \text{ J/g}$  a 100 °C, un 40 % mayor del valor universal de Privalov. Esta desviación se debe fundamentalmente al elevado valor de  $\Delta H_D$  obtenido para esta proteína.

La convergencia a 110 °C de las funciones  $\Delta h_D$  y  $\Delta s_D$  refleja que este efecto se debe a la estructura de la proteína y no a su tamaño. Sin embargo, por una parte hay que tener en cuenta que el proceso de extrapolación a tan alta temperatura se realiza generalmente a partir de datos experimentales obtenidos a valores de temperatura mucho más pequeños, y por otra que el valor del  $\Delta C_p$  no es una función lineal de la temperatura por encima de 110 °C. De hecho, la diferencia entre las funciones  $C_{p,N}$  lineal y  $C_{p,D}$  curvada disminuye con la temperatura anulándose entre 130 y 150 °C. Esto indica que las funciones  $\Delta h_D$  y  $\Delta s_D$  no son funciones lineales de la temperatura y que tienden a un límite asintótico entre 130 y 150 °C que, calculado por mol de residuo, corresponde a unos 5 kJ/mol de residuo y 17 J/K·mol de residuo respectivamente a 110 °C. La existencia de este límite puede justificarse si se relaciona con la densidad de las proteínas globulares, que se supone similar para todas ellas, considerando que los contactos de van der Waals presentan puentes de hidrógeno del orden de  $(0.75 \pm 0.07)$  uniones/residuo (Privalov, 1979). A temperaturas menores de 110 °C el valor de las funciones anteriores varía para cada proteína, debido a que los valores de las pendientes, determinadas por el  $\Delta C_p$ , son diferentes.

En general, el valor de  $\Delta h_D$  a 110 °C para AS-48 es un poco más bajo que el encontrado para el caso de otras proteínas con tamaño similar al de esta proteína circular (Filimonov et al., 1999; Martínez et al., 1999; Padmanabhan et al., 1999; Ruiz-Sanz et al., 1999; Martínez et al., 1995; O'Neil et al., 1995; Viguera et al., 1994b; Wintrode et al., 1994). Debido a la alta termoestabilidad que presenta la estructura de AS-48, desnaturalizando en torno a los 100 °C, incluso bajo condiciones extremas de pH, no es necesario realizar una larga extrapolación de  $\Delta h_D$  hasta 110 °C. Más aún, este valor a 102 °C resulta ser del orden de 32.2 J/g, mucho menor que el valor propuesto por Privalov.

Como se ha descrito en Resultados, los parámetros termodinámicos del desplegamiento de las proteínas pueden relacionarse con la estructura de la proteínas a través de los cálculos de los cambios de áreas expuestas al solvente debidos al desplegamiento ( $\Delta ASA$ ). El cálculo de este parámetro para AS-48 ( $\Delta ASA_{pol} = 1541 \text{ \AA}^2$ ,  $\Delta ASA_{np} = 4026 \text{ \AA}^2$ ,  $\Delta ASA_{tot} = 5567 \text{ \AA}^2$ ) (Tabla 4.2.2) junto con los valores de  $\Delta C_p$  determinados utilizando diferentes estimaciones, indican que si se emplea la ecuación empírica de Gómez y Freire (1995) este parámetro es igual a  $5.9 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ , valor que excede considerablemente de las estimaciones obtenidas para  $\Delta C_p$  del estudio calorimétrico (4.2 y  $3.7 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$  para las aproximaciones PM y HHH respectivamente); concretamente supera el 40 %, quizás debido a

que no se han tenido en cuenta los efectos de carga. Por el contrario, la estimación basada en la fórmula de Khechinashvili et al. (1995) alcanza un valor ligeramente inferior, aunque más próximo, a los calculados experimentalmente, igual a  $3.5 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Por último, las estimaciones sugeridas por las dos fórmulas que proponen Myers et al. (1995) coinciden con nuestros datos experimentales, debido a que dichas ecuaciones están basadas en el análisis estadístico de más de 40 proteínas globulares. Esta coincidencia no solo hace válidas las aproximaciones planteadas para estimar la capacidad calorífica (PM y HHH), sino que demuestra también que AS-48 se comporta como una proteína globular típica en cuanto al valor de su  $\Delta C_p$  calculado a 298 K.

Por último, el valor promedio del cambio de la energía de Gibbs debido al desplegamiento obtenido utilizando los métodos de PM y HHH para el cálculo de la función  $C_{p,D}$  es alto en comparación al obtenido mediante CDB para otras proteínas globulares de tamaño similar, como es el caso del mutante Best5I25V del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina estudiado en esta memoria (sección 5.2.2). Existen dos factores que podrían disminuir el valor del cambio de energía de Gibbs del desplegamiento: por una parte, el pequeño calor específico mencionado anteriormente y, por otra, a una distribución asimétrica de las cargas sobre la superficie de la proteína (González et al., 2000). De hecho, una parte de la estructura presenta una agrupación de cargas positivas, mientras que la región opuesta a ésta se compone principalmente de restos hidrofóbicos. Esta distribución parece jugar un papel importante durante la interacción de esta proteína con la superficie de la membrana celular. Las desventajas termodinámicas que presentan ambos factores pueden ser disminuidas por la interacción con otras moléculas y/o proteínas o aumentando la fuerza iónica. Por otra parte, el carácter desestabilizante de ambos factores no supera la ganancia entrópica debida a la circularización de la cadena polipeptídica. Los intentos llevados a cabo en esta memoria para medir la magnitud de este efecto, observando el desplegamiento de la proteína mediante la ruptura de la cadena, (utilizando bromuro de cianógeno) no han conducido a la obtención de ningún resultado válido. En estas condiciones la estructura se encuentra desplegada debido a que la metionina en la posición 1 de la secuencia está situada en la mitad de una hélice  $\alpha$ . Para evitar esta situación, lo más conveniente sería diseñar la ruptura de la cadena en las regiones comprendidas en el interior de los giros.

#### 4.3.2 ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA PRESENCIA DE AGENTES DESNATURALIZANTES SOBRE LA ESTABILIDAD DE AS-48

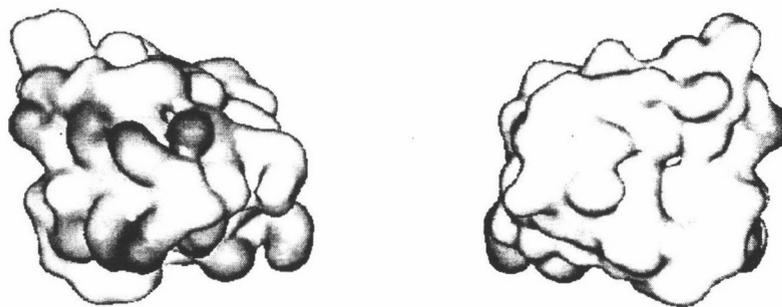
Los estudios llevados a cabo en presencia de urea y guanidina han permitido completar el análisis termodinámico descrito en la sección anterior.

En primer lugar, los valores de  $\Delta G_D$  comparados a una temperatura de 363 K, obtenidos a partir del desplegamiento de AS-48 realizado en presencia de urea, están de acuerdo con los presentados por CDB a esa misma temperatura según se muestra en la Figura 4.2.7. A pesar de ello, no ha sido posible determinar el parámetro  $m$  a 298 K del desplegamiento en presencia de este desnaturizante  $m_u(298)$ . Su valor calculado a 363 K corresponde a  $1.75 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ , mucho menor de los  $3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$  estimados usando la fórmula de Myers et al. (1995), como se describe en la sección 4.2.3. Sin embargo, de acuerdo con las observaciones experimentales de Fersht y colaboradores (Johnson & Fersht, 1995) en el estudio de la proteína barnasa tiene lugar un decrecimiento similar que puede ser atribuido a la dependencia del parámetro  $m_u$  con la concentración de urea. Aunque esta estimación llega a ser solo una aproximación, debido a que no considera ninguna dependencia del parámetro  $m$  con la temperatura, podría decirse como conclusión que los parámetros globales estimados a partir de información de tipo estructural se correlacionan en buen grado con los obtenidos de forma experimental; así, el análisis llevado a cabo con los datos de AS-48 en presencia de urea parece corresponder al de una proteína globular típica. Además, el número de sitios de unión de urea calculados,  $\Delta n_{b,u} = 15.4$ , parece ser normal, teniendo en cuenta que para algunos dominios SH3 el valor de  $\Delta n_{b,u}$  encontrado es de  $18 \pm 1$  a  $25^\circ\text{C}$  (Filimonov et al., 1999). Esta cifra se correlaciona muy bien con el número total de grupos polares expuestos al solvente, lo que indica que AS-48 se comporta como una proteína globular respecto a la exposición al solvente y distribución de los grupos polares y no polares en su estructura tridimensional.

En el caso del desplegamiento inducido por la presencia de guanidina, las estimaciones de  $\Delta G_D$  a 298 K a partir de las curvas de titulación experimentales independientemente del método de análisis empleado (Tabla 4.2.5), resultan ser el doble de los valores calculados mediante los estudios de desplegamiento llevados a cabo por CDB y en presencia de urea. En trabajos previos descritos en la literatura ya se han observado estas discrepancias entre los parámetros termodinámicos calculados de las curvas de titulación en presencia de urea y guanidina (Makhatadze, 1999; Smith & Scholtz, 1996; Yao & Bolen,

1995; Hagiara et al., 1993; Mayr & Schmid, 1993; Santoro & Bolen, 1992). Para explicar los valores superiores de  $\Delta G_D(298)$  encontrados en presencia de guanidina hay que tener en cuenta su doble acción: en primer lugar como desnaturizante, cuyo efecto desestabilizante es muy pequeño a bajas concentraciones (inferiores a 1 M), y en segundo lugar como sal, ejerciendo una acción estabilizante cuya fortaleza depende de la estructura de la proteína. Este efecto salino puede no ser específico debido al apantallamiento de las cargas repulsivas sobre la superficie de la estructura nativa, o ser específico a causa de la unión de los iones  $\text{Cl}^-$  a través de una constante de unión relativamente alta, como ocurre en el caso de ubiquitina. Esta proteína de 76 residuos tiene un tamaño similar al de AS-48 y a pH neutro presenta una alta estabilidad, con una  $T_m$  igual a 90 °C. Sin embargo, en condiciones parecidas a las utilizadas con AS-48 (tampón glicina 10 mM, pH 2.5) la temperatura de la transición disminuye hasta 57 °C con un valor de  $\Delta G_D(298) = 14 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  (Makhatadze, 1999; Wintrode et al., 1994). La adición de guanidina a esta proteína hace que la energía de Gibbs del desplegamiento se incremente desde este valor de 14  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  hasta 23  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  a una concentración 0.3 M de desnaturizante. A partir de aquí, un aumento mayor en la concentración del desnaturizante implica una disminución lineal de la energía de Gibbs. La extrapolación de dicha dependencia lineal hasta la concentración cero de desnaturizante resulta en un valor de  $\Delta G_D(298) = 27 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Dicho valor equivale al doble del encontrado a este pH y baja fuerza iónica, y próximo al calculado a pH 4.0 (Ibarra-Molero et al., 1999a; 1999b). Así, podría parecer que la presencia de los iones  $\text{Cl}^-$  a concentraciones relativamente bajas compensa la pérdida de estabilidad provocada por una repulsión electrostática entre cargas positivas, la cual no es compensada por las cadenas laterales cargadas negativamente que se encuentran neutralizadas a pH 2.5.

En el caso de la estructura nativa de AS-48 parece tener lugar un apantallamiento similar inducido por la presencia de los iones  $\text{Cl}^-$  de las cargas positivas que se encuentran agrupadas sobre la superficie (Figura 4.3.1). Para separar este efecto de la acción desestabilizante de la guanidina, podría plantearse la realización de los experimentos de titulación en DC en presencia de sal y a alta concentración de urea, a pH neutro. Desafortunadamente, cuando con esta proteína se incrementa la fuerza iónica entre 0.01 y 2 M, se produce la oligomerización o agregación del estado nativo y / o del desnaturizado, incluso a condiciones extremas, a pH 2.5 (al igual que ocurre en presencia de guanidina). Por esta razón todos los experimentos, incluidos los de CDB, se han realizado a pH 2.5 y muy baja fuerza iónica. De hecho, se intentaron varios experimentos de desnaturización térmica



**Figura 4.3.1:** Representación de la superficie de AS-48 a partir de su estructura tridimensional (archivo PDB 1e68.pdb (González et al., 2000)). Las cargas positivas y negativas se representan en color azul y rojo respectivamente.

por DC empleando varias concentraciones de KCl a este bajo valor de pH, y en presencia de urea (añadida simplemente para disminuir en la medida de lo posible la estabilidad de la proteína), obteniendo siempre curvas de desplegamiento irreversibles. En la Figura 4.2.5 se muestra la curva obtenida en presencia de cloruro potásico 1.7 M y 7.82 M de urea, a pH 2.5. En ella se observa el fuerte efecto estabilizador producido por el KCl y la recuperación del valor de  $T_m$ . Sin embargo, no ha sido posible determinar si el efecto de la sal es o no específico, por la tendencia a la agregación en el estado desnaturalizado incluso en presencia de la alta concentración de urea empleada (resultando en una curva más aguda y desplazada hacia la izquierda). Si esta estabilización se debe al apantallamiento de la repulsión electrostática, podría plantearse un aumento de la estabilidad de AS-48 más aún, mediante el diseño de mutantes en la zona de agrupación de las cargas positivas (Figura 4.3.1). Dicha región no altera la distribución de los residuos polares y no polares presentes a lo largo de la estructura, ya que el número de sitios de unión para la urea calculado es bastante normal.

El valor efectivo para el factor  $m_{gu}$  encontrado del análisis de las curvas de titulación de guanidina que se muestran en la Figura 4.2.9 según la aproximación del MEL ( $10 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ ) es mucho mayor que el estimado para la desnaturalización inducida en presencia de urea ( $3.3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ ) y que los basados en áreas protegidas del solvente obteniendo, como se ha descrito en la sección 4.2.3 y bajo la suposición de que AS-48 es una proteína “típica”, los valores de 6.3 y  $3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$  para  $m_{gu}$  y  $m_u$  respectivamente. Hay que destacar que  $m_{gu}$  depende directamente de la forma de la curva, es decir, de la cooperatividad del proceso de desplegamiento observado en la curva de titulación. Esto da a entender de nuevo que el

proceso de titulación de AS-48 en presencia de guanidina presenta una mayor complejidad que la que cabe suponer en un principio a partir de los modelos simples, debido principalmente a que la unión de los iones  $\text{Cl}^-$  contribuye de manera notable al proceso global.

#### 4.3.3 EFECTO DE LA CIRCULARIZACIÓN EN LA ESTABILIDAD DE AS-48

Hasta donde se conoce por el momento este es el primer estudio de desnaturalización que se ha realizado con una proteína circular silvestre. Debido a las dificultades experimentales encontradas, no ha sido posible por el momento obtener formas abiertas a partir de la estructura nativa para estimar las consecuencias termodinámicas que explican el fenómeno de la circularización. En general, podría considerarse que la forma circular presenta ventajas de tipo entrópico durante el plegamiento de la proteína. Una posible aproximación a este problema puede surgir a partir de realizar uniones cruzadas covalentes (principalmente uniones S-S) entre residuos adyacentes en la estructura nativa, aunque estos queden lejanos dentro de la secuencia aminoacídica (a modo de ejemplo, las uniones cruzadas pueden conectar las regiones N- y C- terminales). En algunos casos estudiados se ha comprobado que estas uniones artificiales pueden estabilizar la conformación nativa hasta en  $20 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  (Scheraga et al., 1984; Yamada et al., 1983; Johnson et al., 1978). Dicha estabilización ha sido atribuida a una disminución de la entropía, y la desestabilización resultante del estado desnaturalizado es una consecuencia de la pérdida de libertad en el movimiento de la cadena polipeptídica debido a la circularización. Algunos autores han intentado predecir la magnitud de este efecto considerando solamente el estado desnaturalizado (Scheraga et al., 1984; Johnson et al., 1978; Schellman, 1955; Flory, 1956).

Según esto, y tal como se menciona en la sección 4.2.6, existe una importante relación entre la topología del estado nativo de las proteínas y el proceso del plegamiento de las mismas, determinada a partir de los estudios realizados sobre los estados de transición de las proteínas (sección 3.5) y que será discutida con detalle a lo largo de la sección 5. En este sentido, el estudio del estado de transición de la proteína AS-48 podría aportar una valiosa información acerca de su plegamiento. La imposibilidad para obtener experimentalmente las cinéticas en las direcciones del plegamiento y desplegamiento, así como el no disponer por el momento de mutantes de AS-48 no ha hecho posible realizar este tipo de estudios. De todas maneras, la estimación de la constante cinética de plegamiento a partir de correlaciones

experimentales corrobora que la circularización de la cadena polipeptídica acelera significativamente el plegamiento de la estructura con las implicaciones que esto conlleva a la hora de evitar trampas cinéticas y efectos de agregación de posibles estructuras intermedias durante el plegamiento.

Un ejemplo de interés es la construcción de una forma circular del Inhibidor de Tripsina Pancreática Bovina (C-BPTI), en el que los aminoácidos N- y C- terminales han sido unidos a través de una unión peptídica, después de tratar la proteína con carbodiimida soluble en agua. (Goldenberg & Creighton, 1983). Esta forma circular es activa en su papel de inhibidor de tripsina, indicando que la circularización no altera la conformación de la estructura. Más aun, se ha comprobado que el camino y la energética del proceso de plegamiento tampoco han sufrido alteración alguna (Goldenberg & Creighton, 1984). Por lo tanto, a modo de conclusión puede decirse que en algunos casos la circularización no aumenta la energía de Gibbs del desplegamiento, debido a que el aumento en la energía del estado desnaturalizado se compensa por otro aumento en la energía del estado nativo, resultado de las tensiones estéricas introducidas por las uniones cruzadas llevadas a cabo. La validez de este argumento ha sido corroborada mediante el análisis realizado por Goldenberg (1985) a partir de la comparación de estos dos efectos: circularización y presencia de las uniones cruzadas, sobre la estabilidad de BPTI. Por otra parte, un estudio reciente llevado a cabo con dominios SH3 de Crk se centra en el mismo problema (Camarero et al., 2001). La única vía para solucionar este problema podría consistir en el estudio comparativo de una proteína circularizada de forma natural con sus propias formas linealizadas. En este sentido, queda claro que la distribución de residuos, así como las funciones de capacidad calorífica que presenta AS-48 pueden ser comparadas con las correspondientes a otras proteínas de tamaño similar, aunque la estabilidad sea diferente. Incluyendo la contribución desfavorable del pequeño cambio de entalpía encontrado por los estudios realizados en esta memoria mediante CDB, debe quedar claro que la circularización introduce una contribución entrópica favorable a la estructura, que a su vez compensa la contribución entálpicamente desfavorable, y produce el incremento de la energía de Gibbs, haciendo que ésta adquiera un valor anormal que duplica la cantidad que cabe esperar para una proteína de este tamaño. El empleo de AS-48 como un modelo para este tipo de estudios, y para la determinación del efecto que ejerce la fuerza iónica se ve impedido por su baja solubilidad y su gran tendencia a oligomerizar a pH neutro y valores moderados de fuerza iónica. Por esta razón, es necesario intentar abrir de la

forma más apropiada la cadena polipeptídica de AS-48 procurando mantener su conformación globular y construir mutantes de la forma circular que aumenten a la vez su solubilidad.

# DOMINIO SH3 DE $\alpha$ -ESPECTRINA

## 5.1 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

### 5.1.1 INTRODUCCIÓN

En general, un factor de crecimiento puede dar lugar a la dimerización y autofosforilación de los restos de tirosina de su receptor, situado en la membrana celular, mediante reacciones intermoleculares en las que se transfiere el grupo fosfato terminal del ATP al grupo hidroxilo de la cadena lateral de la tirosina de la proteína (Pawson & Berstein, 1990; Ullrich & Schlessinger, 1990). Durante este estado de fosforilación, el receptor activado se asocia físicamente con proteínas del citoplasma celular, capaces de controlar las rutas específicas de transducción de señales (Cantley et al., 1991; Koch et al., 1991). Dichas proteínas presentan entre sí actividades enzimáticas diferentes, aunque todas ellas contienen los dominios conocidos como “dominios homólogos Src de tipo 2 y 3” o SH2 y SH3 respectivamente (Koch et al., 1991).

Aproximadamente un tercio de los oncogenes conocidos hasta el momento pueden codificar las proteínas capaces de fosforilar tirosinas de otras proteínas diferentes. Esto produce la modificación de muchos de los procesos que tienen lugar normalmente en la célula, dando lugar a procesos cancerosos. Algunas proteínas quinasas específicas para restos de tirosina son las del Sarcoma Aviar de Rous (Src) y de otros relacionados como Lck, Hck, Fyn, Fgr, Yes, Blk, Lyn ó Yrk (Bown & Cooper, 1996) o también la del virus de Abelson (Abl), también de naturaleza oncogénica.

En este sentido, los dominios SH3 son pequeños módulos estructurales de naturaleza proteica que constan de unos 60 a 80 aminoácidos empaquetados en dos láminas beta orientadas ortogonalmente entre sí y que poseen varios residuos aromáticos favorablemente conservados. Los dominios SH3 son más universales que los SH2 y se encuentran no solo en las proteínas modulares intracelulares, sino también en organismos unicelulares (donde no se han encontrado los dominios SH2) tales como levaduras, amebas, invertebrados y vertebrados (Musacchio et al, 1992a, 1994b). Posiblemente esto se deba a que es posible encontrar

dominios SH3 en proteínas que funcionalmente no están relacionadas y solo tienen en común el hecho de asociarse a la membrana plasmática por su parte interna.

Los dominios SH3 se han relacionado no solo con las proteínas que participan en las rutas específicas de transducción de señales, interacciones proteína-proteína y otros procesos biológicos importantes (Kuriyan & Cowburn, 1993; Viguera et al., 1994a; Morton & Campbell, 1994; Pawson, 1995; Xu et al., 1997), sino que están también presentes en proteínas del citoesqueleto celular, que intervienen a modo de enlace entre los procesos de transducción de señales y el cambio morfológico de la célula (Lehto et al., 1988; Musacchio et al., 1992b). Hasta el momento se conoce la existencia de más de 50 dominios SH3, pertenecientes a quinasas, lipasas, GTPasas, proteínas adaptadoras, estructurales, de regulación viral y otras. Según los estudios realizados hasta el momento, muchas de las proteínas que contienen dominios SH3 podrían participar en el proceso de polarización celular que tiene lugar durante la división (Chenevert et al., 1992; Chant et al., 1991; Drubin et al., 1990; 1988). Además, cuando actúan interaccionando con factores de crecimiento, algunas estructuras presentan en común de forma exclusiva sus dominios SH2 y SH3, lo que indica que ambos dominios parecen mediar en estas asociaciones (Bar-Sagi et al., 1993).

Actualmente se considera que los dominios SH3 actúan, en parte, como módulos de unión a proteínas y que están implicados en la transmisión de señales desde la superficie celular hacia proteínas efectoras del interior de la célula. En un principio, dichos dominios fueron identificados a partir de la comparación de regiones homólogas no catalíticas en tirosina-quinasas citoplasmáticas que tienen un papel regulador, como la del Sarcoma Aviar de Rous (Src), la de Yamguchi (Yes) o la CT10 (Crk), o por comparación entre éstas con regiones análogas de otras proteínas como fosfolipasa C o  $\alpha$ -espectrina (Mayer et al., 1988; Lehto et al., 1988; Stahl et al., 1988).

Los dominios SH3 no presentan una posición topológica definida dentro de las proteínas que los contienen y se encuentran presentes en una gran variedad de proteínas funcionalmente distintas (Koch et al., 1991; Musacchio et al., 1992a; 1992b; Pawson, 1992; Pawson & Gish, 1992; Pawson & Schlessinger, 1993; Schelessinger, 1994). Por esta razón se cree que estos dominios pueden representar un importante papel en las interacciones proteína-proteína (como en el caso de los dominios SH1 y SH2), esenciales no sólo en el desarrollo de muchas funciones celulares, sino para la localización y el anclaje de los diferentes componentes dentro de la estructura celular.

A partir del uso de las bibliotecas de expresión del ADN se han identificado dos proteínas capaces de unirse de forma específica al dominio SH3 de la tirosina-quinasa Abl (Cichetti et al., 1992). Éstas son las llamadas 3BP1 y 3BP2. La proteína 3BP1 contiene una región homóloga al dominio de activación de guanosina trifosfato (GAP) de algunas proteínas. La proteína 3BP2 no está relacionada funcionalmente con la anterior, aunque ambas poseen en su secuencia un gran número de prolinas. Aún no se conoce su función, aunque parece clara su participación en algunas rutas de transducción de señales en la célula. Los estudios de unión de fragmentos de estas proteínas y especies mutantes de las mismas al dominio SH3 de Abl han permitido identificar secuencias cortas, de 9 ó 10 aminoácidos, con un alto porcentaje de prolinas que forman parte de los sitios de unión específicos para dicho dominio. Posteriormente se ha demostrado que también es posible la interacción de secuencias de este tipo con otros dominios SH3 procedentes de otras fuentes, como Src ó Fyn, obteniéndose constantes de disociación con valores comprendidos entre 5 y 100  $\mu$ M (Feng et al., 1994; Lim et al., 1994; Viguera et al., 1994a; Musacchio et al., 1994a; 1994b; Wittekind et al., 1994; Yu et al., 1994). A pesar de que los dominios SH3 presentan entre sí una gran diversidad en la composición aminoacídica, los estudios estructurales realizados muestran en todos los casos que el sitio de unión se encuentra en una zona de la superficie expuesta al medio y rica en aminoácidos aromáticos, originando una región de carácter hidrofóbico muy conservada (Yu et al., 1994; Booker et al., 1993).

Los estudios más recientes llevados a cabo sobre la interacción de los dominios SH3 con otras proteínas y ligandos, se han centrado en la búsqueda de otras secuencias con características distintas a las expuestas anteriormente. De esta manera se han encontrado otras proteínas que a pesar de no presentar regiones ricas en prolinas, actúan de ligandos potenciales de estos dominios (Gorina & Pavletich, 1996). Además, se ha comprobado a partir de las estructuras cristalinas completas de la tirosina quinasa de Src y de la quinasa hematopéyica (Hck) (Sicheri et al., 1997; Xu et al., 1997) que el dominio SH3 que contienen interacciona con el lóbulo superior de la estructura, por medio de una secuencia que conecta un dominio SH2 con el resto de la quinasa. En general, aquellos ligandos que afecten a la interacción del dominio SH3 con su secuencia natural en la quinasa, positiva o negativamente, afectarán a la actividad de aquella de manera contraria (Barilá & Superti-Furga, 1998). Por esta razón es importante conocer a nivel molecular las bases de la unión de ligandos a estos dominios.

Según esto, los estudios más recientes en este campo se centran en el diseño de ligandos de alta afinidad para los dominios SH3, empleando diversas metodologías, como el uso de compuestos péptido-miméticos que utilizan derivados sintéticos de la prolina que estabilizan la conformación del péptido y mejoran su interacción con determinados grupos del dominio SH3 (Nguyen et al., 1998), o la modificación racional de los péptidos de poliprolina, haciendo uso de programas informáticos de modelado molecular. Serrano y colaboradores (Pisabarro et al., 1998; Pisabarro & Serrano, 1996; Pisabarro et al., 1994a; Pisabarro et al., 1994b) han conseguido de esta forma aumentar la afinidad por el dominio Abl-SH3 de secuencias ricas en prolina en más de 100 veces, incrementando también su especificidad por este dominio.

El enorme interés que presenta el estudio de los dominios SH3 se debe, tanto a su función, por intervenir en procesos celulares relacionados con el cáncer, como a sus características estructurales y energéticas, por lo que son modelos apropiados debido a su pequeño tamaño (inferior a los 10 kDa de peso molecular). Por otra parte, las ventajas que presenta su estudio se basan en que estos dominios pueden ser expresados utilizando las técnicas de ADN recombinante y purificados y cristalizados independientemente del resto de la proteína que los contienen.

### 5.1.2 ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL

Las estructuras tridimensionales de algunos de los dominios SH3, como el de  $\alpha$ -espectrina, se han resuelto haciendo uso de la cristalografía de rayos X (Musacchio et al., 1992b) y de la espectroscopia de RMN en disolución (Blanco et al., 1997). En todos los casos se observa el mismo tipo de plegamiento consistente en un empaquetamiento formado por cinco o seis hebras  $\beta$  antiparalelas, de forma globular, con un diámetro de unos 30 Å, y con sus extremos amino (N-) y carboxilo (C-) terminales próximos en el espacio.

A continuación se prestará mayor atención al dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina, punto de partida de los estudios realizados en esta memoria.

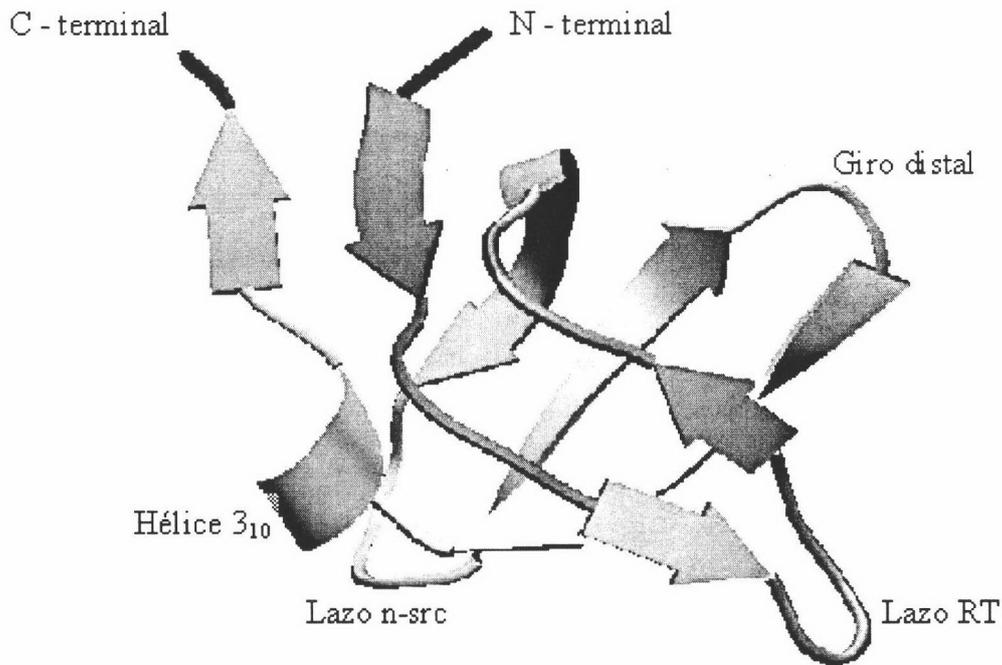
La  $\alpha$ -espectrina es la proteína que constituye mayoritariamente el citoesqueleto que sostiene la membrana citoplasmática (Speicher, 1986; Marchesi, 1985). Dicha proteína es un heterodímero compuesto por estructuras  $\alpha$  y  $\beta$  dispuestas cara a cara de forma antiparalela y con varios giros. El dominio SH3 contenido en esta proteína presenta 62 aminoácidos en su secuencia y, según lo expuesto anteriormente, parece actuar de anclaje de la proteína en el

citoesqueleto. La estructura terciaria del dominio SH3 de la  $\alpha$ -espectrina (*SH3-spc*) se muestra en la Figura 5.1.1, en la que se observan las cinco hebras  $\beta$  antiparalelas denominadas  $\beta_a$  (del aminoácido 8 al 11),  $\beta_b$  (ídem 30 a 35),  $\beta_c$  (ídem 41 a 46),  $\beta_d$  (ídem 49 a 54) y  $\beta_e$  (ídem 58 a 61) descritas por Musacchio et al. 1992b. Estas hebras  $\beta$  en su conjunto forman a su vez dos láminas  $\beta$  denominadas  $\beta_I$  y  $\beta_{II}$ . La lámina  $\beta_I$  es la más pequeña de las dos y está formada por las hebras  $\beta_b$ - $\beta_a$ - $\beta_c$ , mientras que la lámina mayor,  $\beta_{II}$ , está constituida por las hebras  $\beta_b$ - $\beta_c$ - $\beta_d$ . Por otra parte, las hebras se conectan entre sí mediante otro tipo de elementos. En primer lugar, existe un largo lazo de 19 restos denominado “lazo RT” que conecta las hebras  $\beta_a$  y  $\beta_b$  y forma una estructura a modo de horquilla. En segundo lugar, las hebras  $\beta_d$  y  $\beta_e$  se conectan a través de una vuelta de hélice  $3_{10}$  (restos 55 al 57) que comienza en el aminoácido Pro54, muy conservado en las distintas secuencias de la familia SH3. En tercer lugar, entre las hebras  $\beta_c$  y  $\beta_d$  existe una pequeña vuelta llamada “giro distal” consistente en un giro  $\beta$  de tipo II'. Por otra parte, los restos Val46 y Arg49 forman un puente de hidrógeno mediante átomos de la cadena principal. Este giro  $\beta$  mantiene una cierta tensión en la estructura, debido a que la Asn47 ocupa una posición no permitida en el diagrama de Ramachandran (Blanco et al., 1997). Por último, las hebras  $\beta_b$  y  $\beta_c$  se conectan a través del lazo “n-*Src*” (*Src* neuronal).

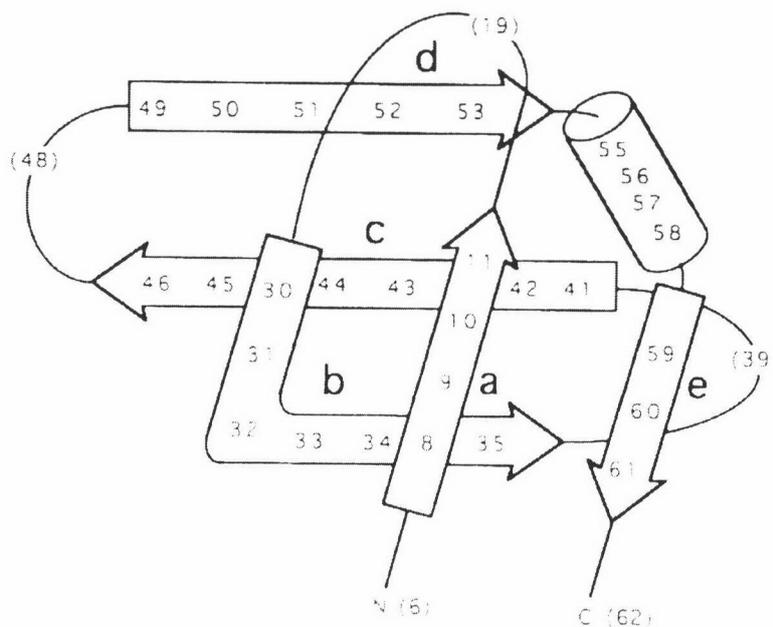
En resumen, el plegamiento del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina consiste básicamente en un sandwich de dos láminas  $\beta$ , ortogonales entre sí, en el que cada lámina se forma de tres cadenas. La topología del dominio, así como su organización espacial se muestran en las Figuras 5.1.1 y 5.1.2, en las que además se indica la nomenclatura de las hebras  $\beta$  y de los tres giros descritos.

Los restos conservados en la secuencia se encuentran próximos entre sí en el espacio y dan lugar a una suave hendidura con los restos aromáticos de la superficie, constituyendo el sitio de unión para los ligandos o las interacciones proteína-proteína (Argos, 1988). La única excepción es el Trp42 que está en una cavidad hidrofóbica en el interior de la molécula. La superficie es muy rica en aminoácidos aromáticos como la Tyr13, Tyr15, Trp41, Phe42 y Tyr57. También tiene tres grupos carboxílicos correspondientes al Asp14, Glu22 y Asp29. El Glu22 forma a su vez un puente de hidrógeno con el OH- fenólico de la Tyr15. Los restos Gly28, Gly51 y Pro54 también se localizan en la superficie.

Ya que no todos los restos se conservan en todas las secuencias de la familia SH3, podría decirse que estos dominios reconocen secuencias parecidas pero no idénticas. Este



**Figura. 5.1.1:** Representación esquemática de la estructura terciaria del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina, realizado con el programa MolScript (Kraulis, 1991) a partir de las coordenadas atómicas obtenidas del Banco de Datos de Proteínas (código 1SHG.pdb). Se indican las posiciones del N- y C-terminal y algunos elementos de la estructura.



**Figura. 5.1.2:** Diagrama topológico de la estructura secundaria del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina (tomado de Musacchio et al., 1992b), donde la hélice  $3_{10}$  se representa por un cilindro y las hebras  $\beta$  (a, b, c, d y e) por flechas. Los números entre paréntesis dan la longitud aproximada de los elementos de conexión de estructuras secundarias.

hecho les proporciona un grado de especialización para cada estructura particular, según indican Ren et al. (1993).

A lo largo de los últimos años se han estudiado las estructuras de otros dominios SH3 aparte del de  $\alpha$ -espectrina, dada su gran importancia biológica. Hay que destacar que los dominios SH3 presentan más homologías entre sí en su estructura tridimensional que en su secuencia. Por ejemplo, en el caso de  $\alpha$ -espectrina y Fyn-SH3 la identidad de las secuencias es del 33 % y en el de  $\alpha$ -espectrina y PI3K-SH3 del 18 %. Sin embargo, para Src-SH3 y Fyn-SH3 se produce un aumento en la identidad hasta un 77 %.

### 5.1.3 ESTABILIDAD Y PLEGAMIENTO DE DOMINIOS SH3

Al igual que otras proteínas globulares, los dominios SH3 constituyen modelos simples para el estudio del plegamiento de proteínas por ser dominios monoméricos de pequeño tamaño y estructuralmente independientes, como se ha mencionado anteriormente, y que desnaturalizan según el modelo de dos estados. Además no presentan uniones disulfuro, grupos prostéticos ó cis-prolinas en el estado nativo que dificulten la caracterización cinética y termodinámica de las mismas. Por estas razones, los dominios SH3 han sido objeto de numerosos estudios de este tipo en la literatura.

Dentro del estudio del plegamiento del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina hay que destacar en primer lugar el estudio de Viguera et al., (1994b) en el que se realizó la caracterización termodinámica del mismo en función del pH. En comparación con otras proteínas globulares de tamaño parecido, para las que se han encontrado valores en torno a los 50 kJ·mol<sup>-1</sup> (Privalov & Gill, 1988), este dominio presenta una baja estabilidad. Sin embargo, al ser éste un dominio de una proteína y no una proteína aislada, las interacciones que tienen lugar con otros dominios de la misma proteína pueden favorecer la estabilización del mismo.

Los estudios cinéticos llevados a cabo sobre este dominio aplicando la técnica de flujo detenido, han puesto de manifiesto la ausencia de estados intermedios durante los procesos de plegamiento y desplegamiento. De hecho, el análisis de la cinética de estos procesos mediante el método de la ingeniería de proteínas (sección 3.5) muestra que la especie silvestre del dominio presenta un núcleo de plegamiento localizado en la horquilla  $\beta$  que constituye el giro distal y que contiene los restos Val46-Asn47-Asp48-Arg49 (Viguera et al., 1996b). La velocidad de plegamiento de esta especie en comparación con la determinada para otras proteínas del mismo tamaño y de estructura  $\beta$  resulta ser más pequeña (Perl et al., 1998).

Según estos estudios, uno de los factores que limita la velocidad del plegamiento de este dominio es la formación de dicho giro  $\beta$ . Así, la importancia de la topología durante el plegamiento ha sido demostrada mediante los estudios iniciados con permutantes circulares sobre el dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina (Viguera et al., (1995) destacando la importancia que desempeñan en este proceso las horquillas  $\beta$  presentes en la estructura de dicho dominio. Así, se estudió la estabilidad y plegamiento de un conjunto de permutantes circulares, realizados sobre el mismo dominio, en los que se trató de interrumpir la unión covalente entre dos hebras  $\beta$  que se encuentran formando una horquilla en la estructura, de cualquiera de las tres que presenta el dominio silvestre, a la vez que se formaba una nueva horquilla uniendo las hebras antiparalelas de los extremos N y C-terminales, próximas entre sí en la estructura tridimensional (Martínez et al., 1999; Viguera et al., 1996b). La conformación de estos permutantes en el estado nativo resultó ser similar a la del dominio silvestre y aunque todos ellos presentaron estabilidad parecida, se comprobó que sus constantes de plegamiento y desplegamiento diferían notablemente entre los diferentes mutantes. Esto, junto con la aplicación del método de la ingeniería de proteínas (sección 3.5) demostró que el camino de plegamiento cambia en el caso de los mutantes permutados circularmente, indicando que ni el orden de la estructura secundaria (alterado a través de las permutaciones) ni la conservación de cualquiera de las horquillas  $\beta$  presentes en el dominio silvestre juega un papel crucial para conseguir que se produzca el plegamiento, aunque ambos factores podrían influir en las cinéticas del plegamiento y desplegamiento, alterando esta ruta. Estudios posteriores utilizaron estos permutantes conteniendo la horquilla desestructurada, formada de la unión de los extremos C- y N- terminales del dominio silvestre, como modelos para el plegamiento, ya que el grado de formación que presenta ésta en el estado de transición de los mutantes es diferente. Viguera et al., (1996b) demostraron que es posible aumentar considerablemente las velocidades de plegamiento respecto al dominio silvestre en estos permutantes, y cambiar el estado de transición según dónde se localice el sitio de la permutación (en el lazo RT, la velocidad de plegamiento es siete veces mayor que la determinada para el dominio silvestre, mientras que esto no ocurre si el corte se sitúa en el giro distal tipo  $\beta$ ). A partir de aquí, los estudios cinéticos de estos permutantes variando la longitud de esta nueva horquilla añadiendo un número variable de residuos glicina, demostraron que la difusión intramolecular también desempeña un papel importante en el proceso de plegamiento (Viguera & Serrano, 1997), observando que el nivel aparente de la barrera de energía entre los estados plegados y desnaturalizados aumenta de forma lineal con el número de glicinas añadidas, y sugiriendo

que la dificultad para alcanzar el estado de transición aumenta al aumentar la longitud de la horquilla. El hecho de que esta dificultad sea directamente proporcional al número de glicinas añadidas y no a la diferencia de energía de Gibbs existente en el estado plegado indicó que la difusión de las diferentes partes de la molécula entre sí, se produce desde el estado desnaturalizado hacia el estado de transición. Posteriormente, Martínez et al., (1999), demostraron mediante estudios cinéticos y termodinámicos que la longitud de la horquilla estudiada produce un efecto de carácter entrópico en el proceso de plegamiento, y que el estado de transición de SH3 es bastante compacto y ordenado y está desplazado hacia el estado nativo. De estos estudios se deduce que puede lograrse un aumento en la velocidad de plegamiento de las proteínas, disminuyendo la barrera entrópica entre los estados nativo y de transición.

Debido a la importancia del papel que parecen desempeñar las horquillas  $\beta$  en el plegamiento del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina, y con el propósito de identificar los sitios de iniciación de dicho proceso, se han realizado los estudios conformacionales en solución acuosa, mediante DC y RMN, de péptidos diseñados imitando estos elementos aislados, sugiriendo que las interacciones terciarias determinan la estructura secundaria de este dominio (Viguera et al., 1996c).

Por otra parte, y siguiendo este propósito de demostrar que la topología determina el camino del plegamiento, Baker y colaboradores (Grantcharova & Baker, 2001) han conseguido circularizar el dominio SH3 de src mediante la formación de un puente disulfuro entre los extremos C- y N- terminales, sugiriendo que el efecto de dicha circularización consiste en una deslocalización de estructura en el estado de transición que implica un cambio en el mecanismo de plegamiento. Por el contrario, la formación de un puente disulfuro en el giro distal del dominio sin circularizar (esencial en el estado de transición, como se ha descrito en el caso de  $\alpha$ -espectrina) aumenta la velocidad de plegamiento sin variar la distribución de la estructura en el estado de transición.

En los últimos años, la combinación de estudios experimentales y teóricos han dado lugar a un nuevo concepto del proceso del plegamiento, entendido como un conjunto de moléculas que siguen múltiples rutas para alcanzar el estado nativo (Dill & Chan, 1998); así, el estado de transición no consiste en un único paso obligatorio por el que todas las moléculas pasan, sino que constituye un conjunto de conformaciones diferentes (Onuchic et al., 1996). Sin embargo, algunos contactos presentes en el estado nativo se forman más fácilmente debido a la naturaleza de la cadena polipeptídica y a la topología del estado nativo. El estado

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
23 ABR. 2002  
COMISIÓN DE DOCTORADO

de transición, según los estudios con proteínas (López-Hernández & Serrano, 1996; Viguera et al., 1996b; Itzhaki et al., 1995) analizados mediante el método de la ingeniería de proteínas (sección 3.5) consiste en un glóbulo colapsado en el que existe una gran superficie protegida del medio y contactos específicos localizados principalmente en el corazón hidrofóbico (Viguera et al., 1996b; Itzhaki et al., 1995). Estas consideraciones no contradicen el modelo de condensación-nucleación en el que el plegamiento se inicia a través de la búsqueda de conformaciones hasta formar un número suficiente de interacciones terciarias específicas que actúan como soporte de nuevos contactos (Abkevich et al., 1994). A partir de este núcleo formado, la proteína pasa por el estado de transición, seguido de una rápida formación cooperativa de la estructura plegada. La principal discrepancia encontrada entre las diferentes teorías de plegamiento descritas (Dill & Chan, 1998; Onuchic et al., 1996; Abkevich et al., 1994) considerando este nuevo concepto del plegamiento se relacionan con la extensión del conjunto del estado de transición y con la existencia de pasos obligatorios en el proceso de plegamiento. Los estudios de Martínez et al. (1998a), basados en el análisis de mutantes en el giro distal del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina, sugieren la existencia de pasos obligatorios que no participan obligatoriamente en la formación del núcleo de plegamiento, así como que el conjunto del estado de transición en proteínas de estructura tipo  $\beta$  podría estar bastante definido y conformacionalmente restringido, y la posible conservación del mismo en algunas proteínas. Estos estudios se han centrado en el análisis comparativo de las proteínas de la familia del dominio SH3 (fundamentalmente entre Src-SH3 y  $\alpha$ -espectrina SH3) que, como se ha mencionado anteriormente, mantienen formas de plegamiento idénticas y diferentes secuencias (Martínez & Serrano, 1999; Martínez et al., 1998a). Los resultados corroboran de nuevo que el proceso de plegamiento está dirigido entrópicamente y determinado por la topología del estado nativo. Sin embargo, en contraste a la estabilidad de las proteínas, la reacción de plegamiento apenas se ve afectada por interacciones específicas entre residuos. De acuerdo con estas ideas se encuentra el hecho de que las velocidades de dicha reacción se relacionan con el orden de contacto, es decir, con la distancia promedio de los contactos en la secuencia dentro del estado nativo (Baker, 2000). Este hecho apoya la idea de que el plegamiento es un proceso dirigido entrópicamente.

Según esto, actualmente se considera que la secuencia de los eventos que tienen lugar durante el plegamiento comienza con la formación de algunos contactos entre residuos en el estado desnaturalizado, capaces de superar la barrera entrópica configuracional del estado de transición, dando lugar a un núcleo de plegamiento, el cual, salvo algunas excepciones

(Burton et al., 1998; Huang & Oas, 1995), se considera homogéneo y robusto de acuerdo con la naturaleza entrópica de la barrera energética del plegamiento (Oliveverg, 2001).

Por otra parte, el rápido avance logrado en el campo del diseño de pequeñas proteínas y péptidos con estructuras tridimensionales y funciones concretas (Regan, 1999), se debe a estrategias basadas en la observación de detalles conformacionales desfavorables de la estructura (Martínez et al., 1998a), así como en el uso de sofisticados algoritmos (Gordon et al., 1999). Sin embargo, no ha tenido lugar un desarrollo paralelo de los estudios cinéticos y termodinámicos correspondientes que permitan explicar las razones energéticas de la estabilidad de estas moléculas diseñadas. De hecho, algunos trabajos muestran cómo es posible utilizar el diseño de proteínas para obtener proteínas termoestables (Loladze et al., 1999; Malakauskas & Mayo, 1998; Morrissey & Sakhnovich, 1996; Villegas et al., 1996; Shoichet et al., 1995; Grutter et al., 1979), aunque ninguno de ellos presenta medidas de funciones termodinámicas y aspectos estructurales de sus rutas de plegamiento. En este sentido, solo se encuentran algunos ejemplos en los que se muestran este tipo de resultados, como por ejemplo, en el caso de la comparación entre proteínas naturales de organismos termófilos y mesófilos (Catanzano et al., 1998; Knapp et al., 1996; McCrary et al., 1996).

También se ha realizado la caracterización termodinámica del plegamiento de otros dominios SH3, como Fyn y Abl (Filimonov et al., 1999; Plaxco et al., 1998a) haciendo uso de CDB y agentes desnaturalizantes como la urea. Igualmente, estos dos dominios despliegan siguiendo el modelo de dos estados y presentan parámetros termodinámicos similares a los encontrados para el dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina. Los estudios cinéticos del dominio SH3 de Fyn muestran que en comparación con otros dominios SH3 homólogos su estado de transición presenta un grado de organización similar.

Los estudios de estabilidad y en general de los procesos de plegamiento y desplegamiento llevados a cabo con el dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina incluyen técnicas diversas, tales como la calorimetría diferencial de barrido (CDB), el dicroísmo circular (DC), la fluorescencia, o la resonancia magnética nuclear (RMN). Dichos estudios se han realizado en función del pH, temperatura y la concentración de agentes desnaturalizantes como la urea o guanidina. En adición, los estudios por RMN, junto con los datos de CDB han demostrado que en el estado nativo tienen lugar múltiples eventos de desplegamiento independientes, planteando como consecuencia una redefinición del concepto de cooperatividad en dicho estado (Sadqi et al., 1999).

#### 5.1.4 DISEÑO DE MUTANTES DEL NÚCLEO HIDROFÓBICO DEL DOMINIO SH3

Con el fin de llegar a entender las reglas que determinan la evolución del núcleo hidrofóbico de las proteínas y, en general, el diseño de proteínas, se ha desarrollado el algoritmo de diseño Perla (Fisinger et al., 2001; Ventura et al., 2001a; Lacroix, 1999). Dicho algoritmo ha sido aplicado al diseño de nuevas secuencias en el núcleo hidrofóbico de los dominios SH3 que no se han encontrado en la naturaleza (Ventura et al., 2001a). Una serie de secuencias “artificiales” del núcleo, resultantes de la aplicación de Perla, se han introducido en el dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina para estudiar los cambios en estabilidad que presentan frente a su forma silvestre. Así, tres grupos de ellos, llamados C8A, Best4 y Best5, conteniendo a un número significativo de mutaciones, presentan una estabilidad mayor al desplegar a una temperatura más alta (Ventura et al., 2001a). Del análisis de la estabilidad inducida por la presencia de urea se deduce que aunque sus estabilidades son similares a las del dominio silvestre, las constantes de las reacciones de plegamiento y desplegamiento son mayores, sugiriendo una estabilización del estado de transición del plegamiento debida probablemente a la tensión que se produce por un mayor empaquetamiento del núcleo hidrofóbico (Ventura et al., 2001b). De hecho, la eliminación, en tres localizaciones diferentes de estos tres grupos de mutantes, del grupo metilo de la isoleucina (mutación de Ile por Val) parece aumentar su estabilidad. Según lo anterior, la estabilización del estado de transición podría dar lugar a un cambio general en la reacción de plegamiento de una proteína. Así, si para alcanzar el estado de transición se necesita una energía de interacción suficiente para compensar la barrera entrópica, según el Postulado de Hammond (Hammond, 1955; Matouschek & Fersht, 1993) aplicado a estos mutantes, cabría esperar un movimiento en el estado de transición desplazado hacia conformaciones más desplegadas.

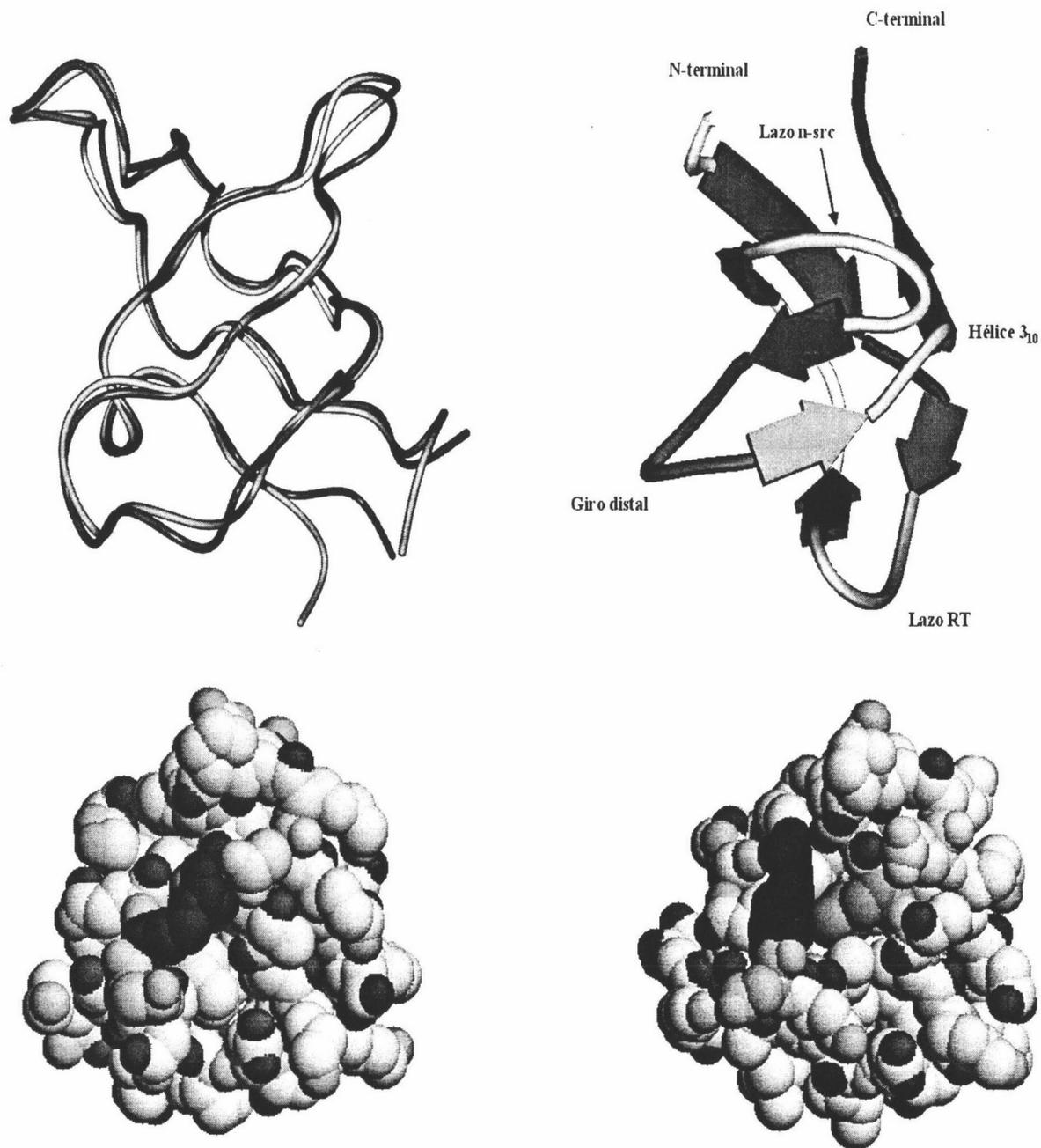
## 5.2 RESULTADOS EXPERIMENTALES

### 5.2.1 EL MUTANTE Best5I25V

Para estudiar si realmente existen desplazamientos en el estado de transición, como se ha mencionado anteriormente, y para intentar entender las razones termodinámicas y cinéticas de la estabilidad de los mutantes del núcleo hidrofóbico, se ha seleccionado un mutante, el Best5I25V, que contiene las siguientes mutaciones en el núcleo hidrofóbico respecto a la especie silvestre del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina: A11V, V23L, M25V, V44I y V58L.

Este mutante del núcleo hidrofóbico se ha analizado por CDB a diferentes valores de pH para obtener los parámetros termodinámicos del desplegamiento, y compararlos con los descritos en la literatura para la especie silvestre (Viguera et al., 1994b) y el mutante estabilizado D48G (Martínez et al., 1998a). Además, se han estudiado las cinéticas de las reacciones de plegamiento y desplegamiento mediante la técnica de flujo detenido, descrita en la sección 3.5, de un número de mutantes realizados en diferentes posiciones sobre Best5I25V para determinar la estructura de su estado de transición.

La estructura de Best5I25V ha sido resuelta recientemente mediante cristalografía de rayos X por la Dra. Cristina Vega (EMBL, Hamburgo). En la Figura 5.2.1 se muestra dicha estructura superimpuesta con la del dominio salvaje (Figura 5.1.1). El mapa de densidad electrónica de la estructura de Best5I25V se interrumpe en la región de los residuos 17, 19 y 30, mientras que se define perfectamente para el resto del lazo RT. Las posiciones de las cadenas laterales de los restos Val9, Leu31 y Leu33 en ambas proteínas adoptan la misma conformación. Por otra parte, existe un cambio conformacional que afecta al Asp29. Dicho residuo, en la estructura del dominio silvestre presenta un puente de hidrógeno con el grupo amino de la cadena principal de la Lys27. La mutación de la alanina en la posición 11 por valina realizada en Best5I25V produce un levantamiento de la cadena lateral de Asp29 de manera que el puente de hidrógeno mencionado anteriormente se hace ahora más largo (3.9 Å). Además de este pequeño desplazamiento producido en el residuo en posición 29, se ha encontrado un cambio conformacional que podría ser responsable de las diferencias encontradas entre ambas especies, con respecto al pH, en los estudios de DCB que se describen a continuación. Como consecuencia de la introducción de grupos más voluminosos en el corazón hidrofóbico se produce una ruptura del puente salino existente entre los residuos Glu17 y Arg49 que conduce a un cambio en la posición del giro distal.



**Figura 5.2.1:** Representaciones de la estructura tridimensional del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina y del mutante Best5I25V, realizadas con el programa ViewerLite 4.2 (Accelrys Inc.), a partir de las coordenadas atómicas de los datos obtenidos por cristalografía de rayos X y depositadas en el Banco de Datos de Proteínas con los códigos 1SHG.pdb y 1e7o.pdb respectivamente. **PANEL A. Izquierda:** Superimposición de las estructuras estas dos proteínas. **Derecha:** Estructura de Best5I25V en la que se muestran los extremos N- y C-terminales y los diferentes elementos estructurales. **PANEL B:** Cambios conformacionales relativos al puente salino existente entre los residuos 17 (naranja) y 49 (azul). **Izquierda:** Especie salvaje del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina. **Derecha:** Best5I25V. En verde se representa el residuo Asp47 y en magenta la valina en posición 23 (especie salvaje) y la leucina en esa misma posición correspondiente a Best5I25V.

### 5.2.2 ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE Best5I25V MEDIANTE CDB

El desplegamiento térmico del mutante Best5I25V del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina seguido, por CDB en el intervalo de pH ácido (tampón glicina/HCl 50 mM, a pH 2.0, 2.5, 3.0 y 3.5) ha mostrado una familia de curvas reversibles después del segundo calentamiento de las muestras correspondientes a cada pH, de acuerdo con los estudios realizados con la especie silvestre de este dominio (Viguera et al., 1994b).

El análisis de estas cuatro curvas obtenidas se ha realizado de forma múltiple (Figura 5.2.2) usando la aproximación  $T_H$ - $T_S$  como se detalla en el caso del ejemplo descrito en la sección 3.6.5 para ese mismo número de curvas, y suponiendo, como se menciona en dicha sección que la función  $\Delta H_D(T)$  sólo depende de la temperatura y no del pH y que la función  $\Delta C_p$  es única para el conjunto. En estas condiciones, las funciones  $C_{p,N}$  y  $C_{p,D}$  se han calculado como polinomios de primer y segundo orden respectivamente (ecuaciones 3.6.27 y 3.6.28). El cálculo de dichas funciones se ha realizado obteniendo un número total de 13 parámetros ajustables.

El resultado de dicho análisis ha confirmado la validez del modelo de dos estados aplicado a este sistema. Así, la función única obtenida para  $\Delta H_D(T)$ , independiente del pH, se describe mediante la siguiente ecuación empírica:

$$\Delta H_D(T) = 5.13 (T-T_H) - 0.019 (T-T_H)^2 - 6 \cdot 10^{-5} (T-T_H)^3 \quad (5.2.1)$$

Por otra parte, la función que describe el cambio de capacidad calorífica de desplegamiento con la temperatura,  $\Delta C_p(T)$ , viene descrita por la ecuación:

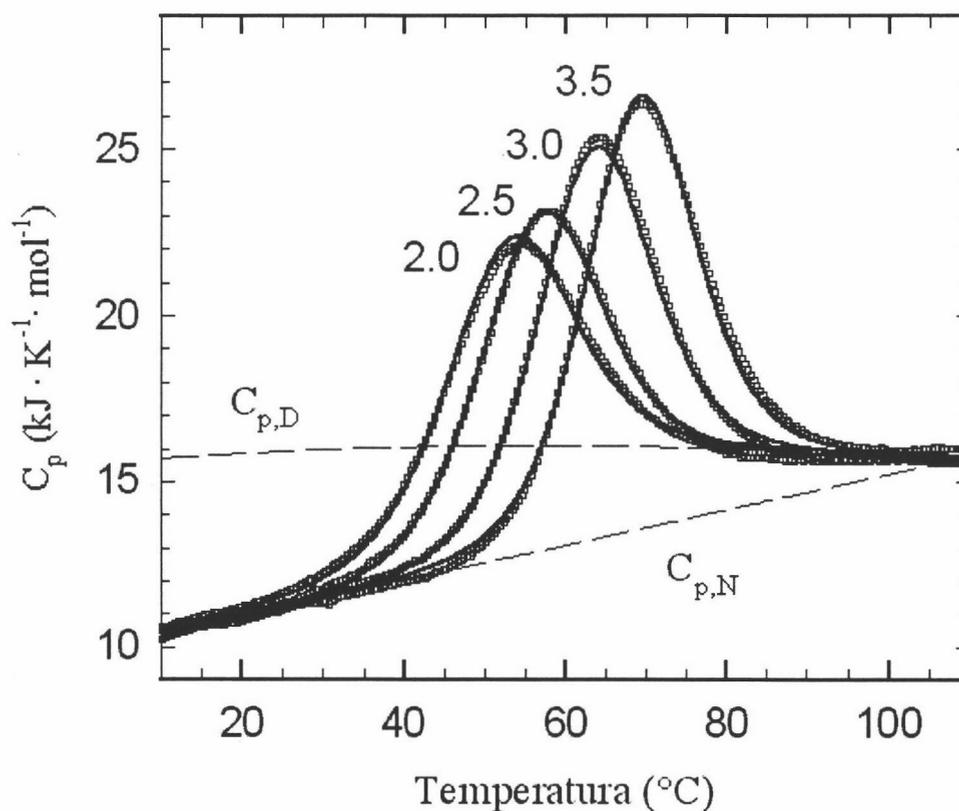
$$\Delta C_p(T) = 5.13 - 0.0383 (T-T_H) - 1.8 \cdot 10^{-4} (T-T_H)^2 \quad (5.2.2)$$

Por último, a partir de la función que describe el cambio de entropía del desplegamiento, se pueden calcular los valores de  $T_S$  correspondientes a cada una de las curvas obtenidas en el intervalo de pH estudiado:

$$\Delta S_D(T, \text{pH}) = 1.25 \ln [T/T_S(\text{pH})] + 0.065 [T-T_S(\text{pH})] - 9 \cdot 10^{-5} [T-T_S(\text{pH})]^2 \quad (5.2.3)$$

De estas tres ecuaciones se obtienen los siguientes valores de  $T_H$  y  $T_S$ :  $T_H = 287.6$  K;  $T_S(\text{pH}=2.0) = 289.39$  K;  $T_S(\text{pH}=2.5) = 289.76$  K;  $T_S(\text{pH}=3.0) = 290.46$  K;  $T_S(\text{pH}=3.5) = 291.08$  K.

El análisis múltiple de las curvas realizado con la aproximación  $T_m$ - $H_m$ , se ha llevado a cabo como se describe al final de la sección 3.6.5. De la misma forma que para el caso de las curvas analizadas con la aproximación  $T_H$ - $T_S$  también se ha considerado una función  $\Delta C_p$



**Figura 5.2.2:** Dependencias de la capacidad calorífica molar parcial con la temperatura de Best5I25V realizadas y en tampón glicina /HCl 50 mM, en el rango de pH comprendido entre 2 y 3.5 (símbolos) y los resultados del análisis múltiple aplicando el modelo de dos estados (línea continua). Las líneas punteadas corresponden a las funciones de capacidad calorífica de los estados nativo y desnaturado. Los termogramas se han realizado a una velocidad de barrido de 1.5 K/min entre 3 y 110 °C.

común para el conjunto de las curvas, así como una dependencia lineal y cuadrática de la temperatura para las funciones  $C_{p,N}$  y  $C_{p,D}$  respectivamente. Los resultados de este análisis, que de nuevo verifican la validez del modelo de dos estados, se presentan en la Tabla 5.2.1.

Como se observa en la Figura 5.2.3, la curva correspondiente a la ecuación 5.2.2 reproduce en una buena aproximación los datos experimentales obtenidos mediante CDB para las especie silvestre, así como los mutantes D48G y Best5I25V del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina. Sin embargo, cuando los datos para cada una de estas especies se analizan por separado (Martínez et al., 1998a; Viguera et al., 1994b) se observan pequeñas diferencias en las funciones para  $\Delta C_p(T)$  obtenidas del análisis (Figura 5.2.3). En el caso de las especies D48G y Best5I25V no es sencillo determinar si estas diferencias son significativas por debajo del intervalo de  $T_m$  obtenido.

TABLA 5.2.1

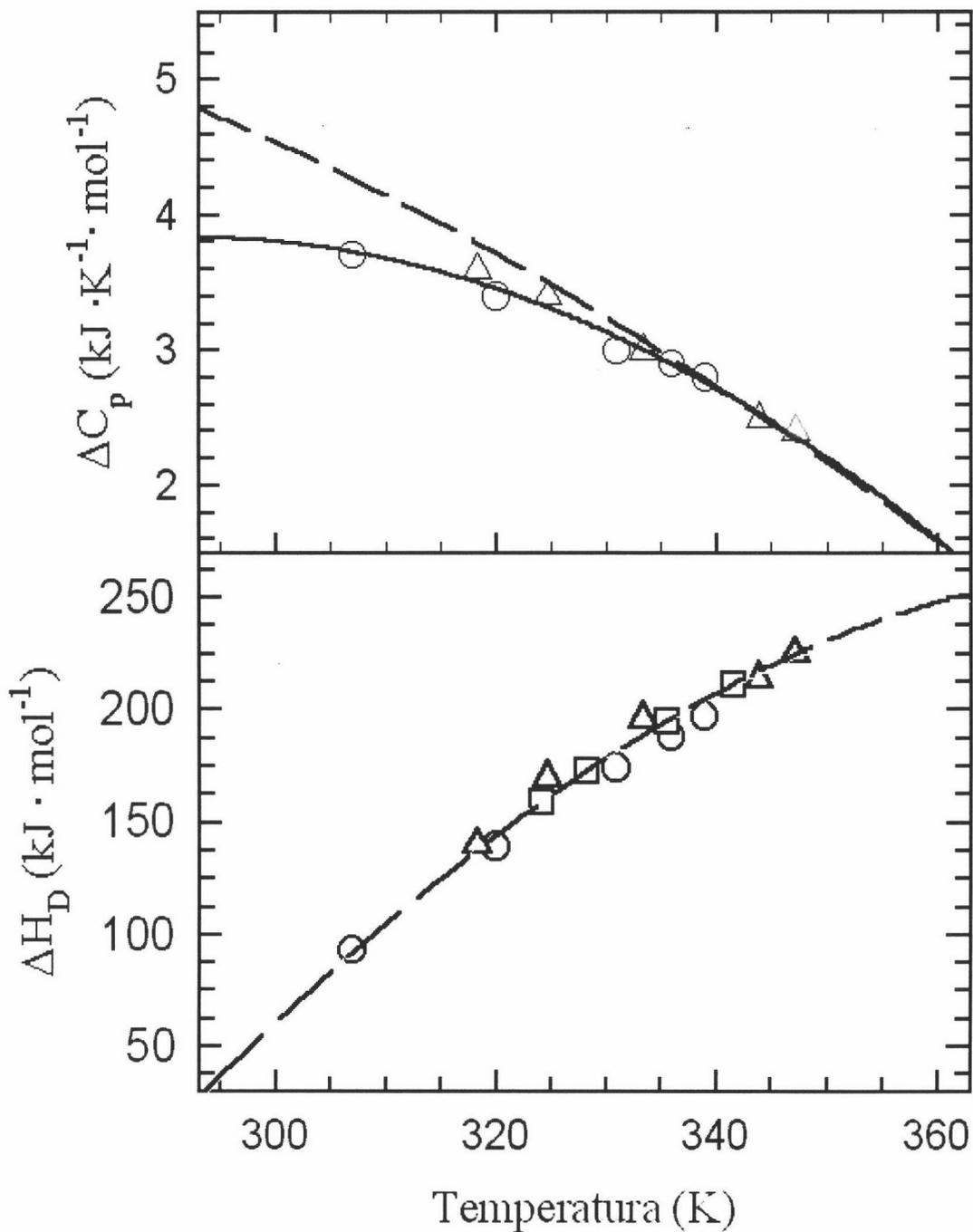
PARÁMETROS TERMODINÁMICOS DEL DESPLEGAMIENTO POR DCB DE Best5I25V Y SU COMPARACIÓN LOS OBTENIDOS PARA LA ESPECIE SILVESTRE (Viguera et al., 1994) Y EL MUTANTE D48G (Martínez et al., 1998a)\*

pH	Especie	$T_m$ (K)	$\Delta C_p(T_m)$ (kJ·K <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_D(T_m)$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_D(298)$ (J·K <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G_D(298)$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )
2.0	Silvestre	307.0	3.7	93	190	2.3
	D48G	318.3	3.6	140	180	6.4
	Best5I25V	324.1	3.5	159	146	8.5
2.5	Silvestre	320.0	3.4	139	175	6.9
	D48G	324.6	3.4	170	165	9.8
	Best5I25V	328.2	3.3	173	139	10.4
3.0	Silvestre	331.0	3.0	174	160	11.6
	D48G	333.4	3.0	196	150	14.0
	Best5I25V	335.5	2.9	195	127	14.1
3.5	Silvestre	336.0	2.9	188	155	13.9
	D48G	343.9	2.5	214	135	18.3
	Best5I25V	341.5	2.5	211	116	17.2

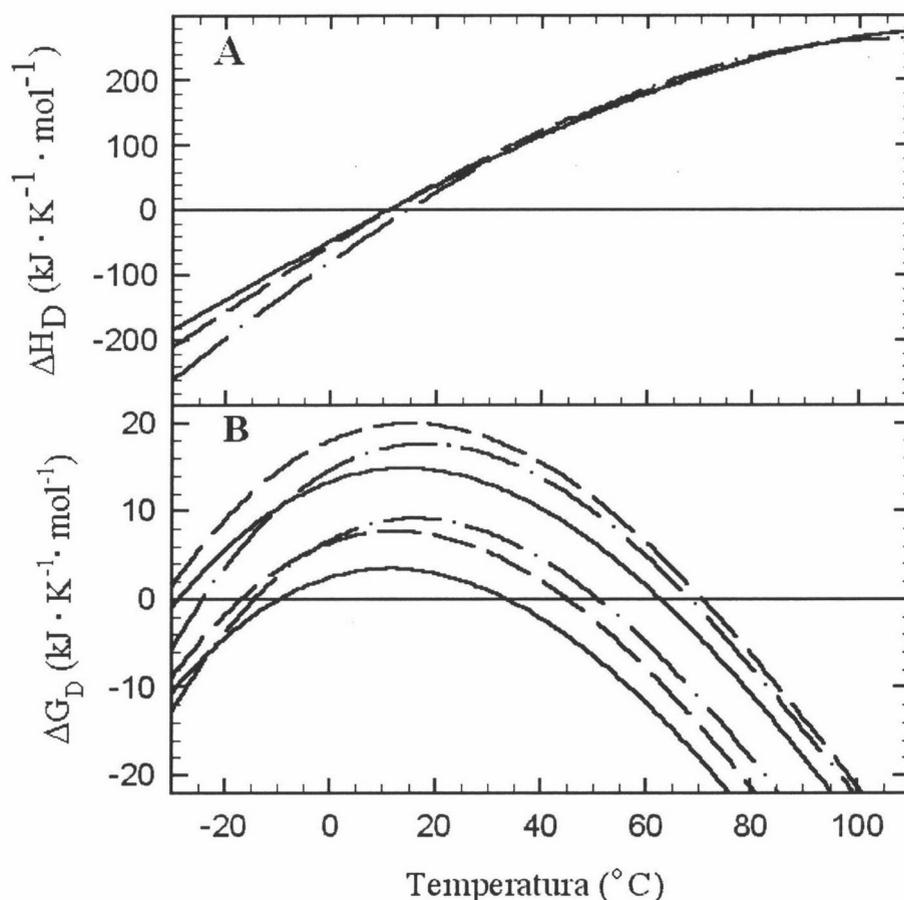
\* Los errores cometidos en el cálculo de los valores experimentales de  $\Delta H_D(T_m)$ ,  $\Delta S_D(298)$  y  $\Delta C_p(T_m)$  son del 8 %, aproximadamente, y en torno a 0.7 K para  $T_m$ .

Debido a la alta estabilidad de las especies D48G y Best5I25V, los valores de esta temperatura de transición en ambos casos se encuentran muy alejados de los correspondientes valores de  $T_H$  incluso a pH 2.0, con lo que el valor de esta temperatura, así como la curvatura de la función  $\Delta H_D(T)$  a bajas temperaturas no puede ser determinado con alta precisión. Por otra parte, los valores de  $\Delta H_m$  obtenidos del análisis de datos y representados en la Figura 5.2.3 se correlacionan muy bien con la ecuación 5.2.1. Por el contrario, los valores de  $T_m$  pueden ser determinados del análisis con una precisión bastante más alta.

Como se observa en la Tabla 5.2.1, en el intervalo de pH estudiado, comprendido entre los valores 2.0 y 3.0, los valores obtenidos de  $\Delta G_D(298)$  para el mutante Best5I25V son menores que para D48G, indicando que el primero es más estable que el segundo. A pH 3.5, sin embargo, se produce la situación contraria, pudiendo deberse a que el efecto estabilizante acumulado por las múltiples mutaciones del corazón hidrofóbico en Best5I25V es menos efectivo que el que se produce realizando una única mutación dentro del giro distal, en D48G. Como resultado de esta diferencia en estabilidades, se produce una pérdida en el cambio de energía de Gibbs de desplegamiento entre los valores extremos de dicho intervalo de pH para



**Figura 5.2.3:** Dependencias de la capacidad calorífica con la temperatura (**PANEL A**) y cambios de entalpía (**PANEL B**) del desplegamiento de las variantes del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina: especie silvestre (círculos) (Viguera et al., 1994b); D48G (triángulos) (Martínez et al., 1998a); Best5I25V (cuadrados). Las líneas discontinuas corresponden al resultado del análisis aplicando las ecuaciones 5.2.1 y 5.2.2 sobre el mutante Best5I25V (ver texto). La línea sólida en el panel superior muestra la regresión cuadrática sobre los datos de la especie silvestre y el mutante D48G.



**Figura 5.2.4:** Dependencias de los cambios de entalpía (**PANEL A**) y energía de Gibbs (**PANEL B**) con la temperatura de las variantes del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina: especie silvestre (líneas continuas) (Viguera et al., 1994b); D48G (líneas discontinuas) (Martínez et al., 1998a) y Best5I25V (líneas discontinuas punteadas). En el **panel B** solo se muestran las curvas correspondientes a pH 2 y 3.5, observándose que la estabilidad aumenta con el pH.

la forma silvestre y el mutante D48G, correspondiente en ambos casos a 12 kJ/mol aproximadamente, mientras que para Best5I25V esta pérdida es menor, del orden de 9 kJ/mol. En la Figura 5.2.4 se representa la dependencia de esta función con la temperatura y el pH, observándose que la estabilidad aumenta con el valor de éste último.

### 5.2.3 ESTUDIO DEL ESTADO DE TRANSICIÓN DE Best5I25V

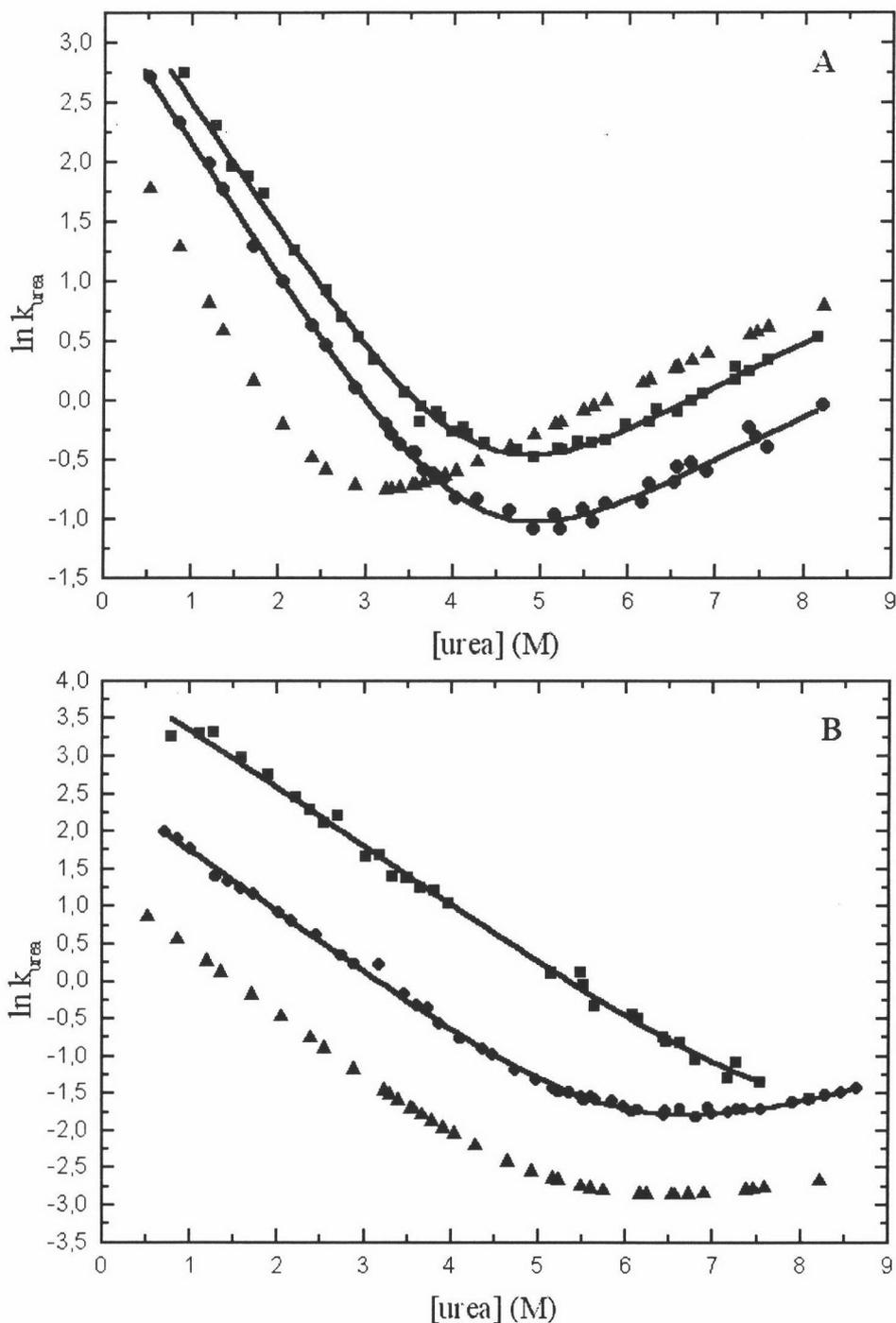
En trabajos previos descritos en la literatura (Martínez & Serrano, 1999; Martínez et al., 1999; 1998a; Viguera et al., 1996b) se han caracterizado los estados de transición del dominio silvestre de SH3 de  $\alpha$ -espectrina y del mutante D48G del mismo, estabilizado frente a dicha forma. Estos estudios se han realizado llevando a cabo en ambas formas una serie de

mutaciones puntuales en posiciones equivalentes a lo largo de la secuencia y siguiendo para cada una de ellas las cinéticas de las reacciones de plegamiento y desplegamiento mediante la técnica de flujo detenido (sección 3.5), en presencia urea, y en diferentes condiciones experimentales. Con los valores de las constantes de velocidad y de las pendientes obtenidas de los gráficos de Chevron, construidos a partir de los datos experimentales, se aplica el método de la ingeniería de proteínas, del que se obtienen los valores de  $\Phi_{\ddagger-D}$  que representa la pérdida de energía en el estado de transición, respecto al estado nativo, inducida por una mutación puntual en la proteína, indicando si en dicho estado de transición la región que rodea la cadena lateral del resto mutado se encuentra plegada, parcialmente plegada o desplegada.

En nuestro caso, hemos llevado a cabo estas mismas mutaciones puntuales en la especie Best5I25V: V9A, T24A, D29A, L31A, K43A, D48G, F52A, V53A y A55G, y otras en nuevas posiciones: L8A, L33A y S36A que han sido analizadas en los mutantes Best5I25V y D48G para poder comparar entre sí los resultados obtenidos. Con cada una de las mutaciones anteriores se pretende obtener una visión general del estado de transición. Así, las mutaciones en las posiciones 8, 36, 43, 52 y 55 informan a cerca de los contactos de van der Waals existentes en la superficie de la estructura, mientras que la de las posiciones 24 y 29 muestran los puentes de hidrógeno entre las cadenas laterales y principal. La mutación en posición 48 da información de la formación del giro  $\beta$  en la región distal. Por último, las mutaciones en las posiciones 9, 31, 33 y 53 se encuentran dentro del núcleo hidrofóbico de la estructura nativa e informan sobre su formación. Los tampones utilizados en estos experimentos, al igual que en el caso de los mutantes realizados sobre la especie D48G, para realizar las cinéticas de plegamiento y desplegamiento han sido las siguientes: Tampón fosfato 50 mM, pH 7.0 y tampón glicina 50 mM, pH 3.5, debido a que la proteína presenta una estabilidad demasiado elevada a pH neutro haciendo que la rama de desplegamiento de los gráficos de Chevron correspondientes no pueda llegar a observarse (Figura 5.2.5).

Por lo tanto, ha sido necesario estimar la pendiente de dicha rama de desplegamiento,  $m_{\ddagger-N}$  a partir de los mutantes más inestables (Martínez et al., 1998a). De cualquier manera, los valores de  $\Phi_{\ddagger-D}$  estimados han sido los mismos dentro de los límites de error a ambos valores de pH, como se observa en la Tabla 5.2.2.

De la misma manera, los valores descritos en la literatura para el parámetro  $\Phi_{\ddagger-D}$  en los mutantes realizados en la especie silvestre, así como los obtenidos para los casos de los mutantes de Best5I25V y D48G se comparan en la Figura 5.2.6.



**Figura 5.2.5:** Gráficos Chevron de los mutantes *Best5I25V* (●) y *D48G* (■) obtenidos de los datos experimentales realizados en tampón glicina 50 mM, pH 3.5 (gráfico A) y en tampón fosfato 50 mM, pH 7.0 (gráfico B). Las líneas representan los resultados del análisis aplicando la ecuación 3.5.11. Para comparar con estos resultados se presentan las curvas simuladas mediante la ecuación anterior (▲) para la especie silvestre del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina a partir de los datos publicados. pH 3.5:  $k_{\ddagger-D}=12.4 \text{ s}^{-1}$ ,  $m_{\ddagger-D}=-1.49 \text{ kcal}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $k_{\ddagger-N}=0.52 \text{ s}^{-1}$  y  $m_{\ddagger-N}=0.52 \text{ kcal}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; pH 7.0:  $k_{\ddagger-D}=3.7 \text{ s}^{-1}$ ,  $m_{\ddagger-D}=-0.88 \text{ kcal}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $k_{\ddagger-N}=0.005 \text{ s}^{-1}$  y  $m_{\ddagger-N}=0.43 \text{ kcal}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$  (Martínez & Serrano, 1999).

TABLA 5.2.2

PARÁMETROS CINÉTICOS DE BEST5I25V, SUS MUTANTES Y DE D48G A pH 7.0 Y 3.5

pH	Proteína	$m_{i-N}$ (kcal/mol·M)	$m_{i-D}$ (kcal/mol·M)	$k_{i-N}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{i-D}$ (s <sup>-1</sup> )	$\Delta G_{N-D}$ (kJ/mol)	$\phi_{i-D}$	$\phi_{i-D}$ (Silvestre)
7.0	<b>Best5I25V</b>	0.58 ± 0.05	- 0.83±0.02	0.004±0.001	14.7±0.6	20.3	-	
	L8A/ Best5I25V	0.44 ± 0.03	- 0.86 ± 0.04	0.063±0.012	9.2±0.6	12.3	0.15±0.01	0.14±0.03 <sup>(4)</sup>
	V9A/ Best5I25V	0.57 ± 0.03	- 0.91 ± 0.03	0.020±0.004	10.6±0.7	15.5	0.17±0.01	
	T24A/ Best5I25V	0.43 ± 0.02	- 0.77 ± 0.03	0.069±0.010	8.2±0.4	11.8	0.17±0.01	0.29±0.02 <sup>(4)</sup>
	D29A/ Best5I25V	0.48 ± 0.02	- 0.88 ± 0.01	0.010±0.001	15.1±0.4	18.1	-0.03±0.00	0.22±0.03 <sup>(4)</sup>
	L33A/ Best5I25V	0.51 ± 0.01	- 1.06 ± 0.04	0.040±0.002	1.8±0.1	9.4	0.48±0.03	0.58±0.03 <sup>(3)</sup>
	S36A/ Best5I25V	0.52 ± 0.03	- 0.91 ± 0.02	0.007±0.002	14.6±0.7	18.9	0.02±0.12	0.00±0.18 <sup>(3)</sup>
	K43A/ Best5I25V	0.55 ± 0.02	- 0.81 ± 0.02	0.016±0.002	9.2 ± 0.3	15.7	0.25±0.04	0.26±0.02 <sup>(4)</sup>
	F52A/ Best5I25V	0.45 ± 0.01	- 0.87 ± 0.04	0.078±0.007	2.3±0.2	8.38	0.38±0.02	0.58±0.02 <sup>(4)</sup>
	V53A/ Best5I25V	0.53 ± 0.02	- 0.99 ± 0.04	0.016±0.002	2.1±0.2	12.1	0.58±0.05	0.61±0.04 <sup>(4)</sup>
	A55G/ Best5I25V	0.52 ± 0.01	- 0.92 ± 0.03	0.033±0.003	3.2±0.2	11.3	0.42±0.03	0.53±0.04 <sup>(4)</sup>
	<b>D48G</b>	0.42 <sup>(2)</sup>	- 0.78 ± 0.02	0.008±0.002	63±3	22.2	-	
	L8A/ D48G	0.42 <sup>(2)</sup>	- 0.78 ± 0.01	0.040±0.001	48.3±1.2	17.6	0.14±0.03	
	L33A/ D48G	0.44 ± 0.01	- 1.02 ± 0.02	0.058±0.002	4.1±0.1	10.5	0.58±0.03	
S36A/ D48G	0.44 ± 0.01	- 0.80 ± 0.01	0.010±0.001	61±2	21.6	0.00±0.18		
3.5	<b>Best5I25V</b>	0.65 ± 0.01	- 1.07 ± 0.01	0.013±0.001	30.0±0.3	19.2	-	
	L31A/ Best5I25V	0.68 ± 0.05	- 1.11 ± 0.04	0.0007±0.0002	3.0±0.3	20.7	-0.5±0.3	
	D48G/ Best5I25V	0.78 ± 0.05	- 0.93 ± 0.02	0.006 ± 0.002	106±6	24.2	1.0±0.1	1.10±0.1 <sup>(4)</sup>
	<b>D48G</b>	0.60 ± 0.02	- 1.07 ± 0.02	0.034 ± 0.006	35.4±1.8	17.2	-	
	L8A/ D48G	0.50 ± 0.01	- 1.32 ± 0.03	0.291 ± 0.013	34 ± 2	11.8	0.17±0.02	
	S36A/ D48G	0.54 ± 0.01	- 1.20 ± 0.02	0.064 ± 0.005	46 ± 3	16.3	0.00±0.19	

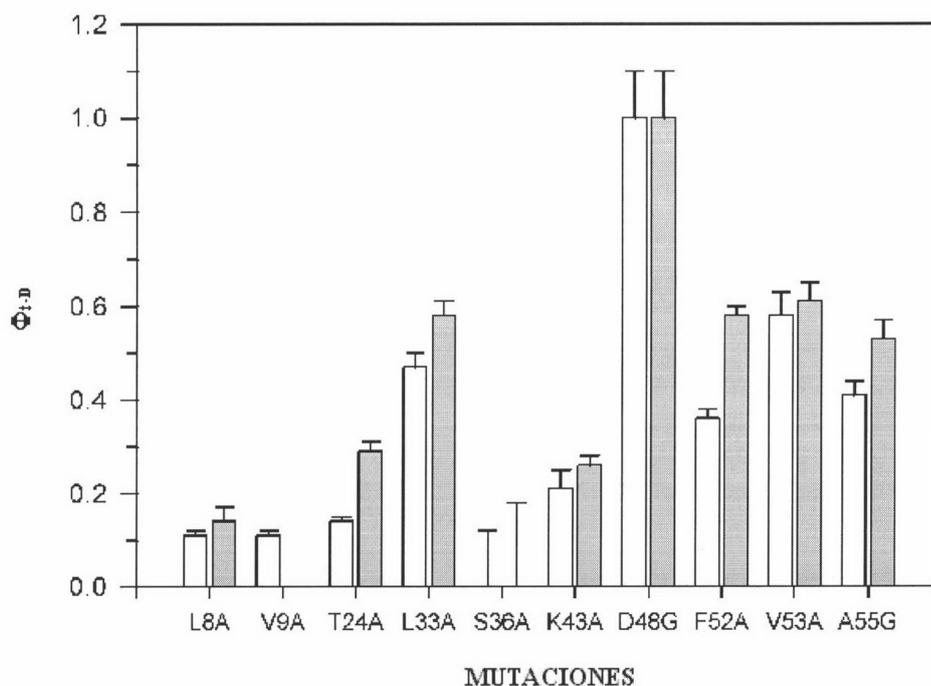
<sup>(1)</sup> Los errores presentados corresponden a los errores obtenidos del análisis de los datos.

<sup>(2)</sup> Valor fijado en el análisis de los datos a un valor promedio para todos los mutantes realizados sobre D48G (Martínez et al., 1998a).

<sup>(3)</sup> Valor correspondiente a este estudio.

<sup>(4)</sup> Valor obtenido en trabajos descritos en la literatura (Martínez & Serrano, 1999; Martínez et al., 1998a).

En nuestro caso, para facilitar el análisis de los datos experimentales, la especie que se ha escogido como referencia en lugar de la forma silvestre del dominio ha sido el mutante



**Figura 5.2.6:** Valores de  $\Phi_{\ddagger-D}$  calculados para los mutantes Best5I25V y D48G (barras grises) resumidos en la Tabla 5.2.2. Las barras que representan los errores han sido calculadas como se describe en el texto. El valor negativo obtenido para el mutante L31A no se muestra en la gráfica.

D48G. La razón se debe a que éste presenta, al igual que los mutantes desestabilizados realizados sobre el mismo, una mayor estabilidad que los equivalentes en la especie silvestre.

Las posiciones y mutaciones estudiadas en la especie Best5I25V son las siguientes (sección 3.5): L8A, V9A, T24A, D29A, L31A, L33A, S36A, K43A, D48G, F52A, V53A y A55G. La mutación L31A presenta valores negativos de  $\Phi_{\ddagger-D}$  indicando que esta mutación estabiliza el estado de transición a la vez que desestabiliza el estado nativo; y más aún, que en esta posición se originan contactos en el estado de transición producidos por la cadena lateral de este residuo que no existen en el estado nativo. Por esta misma razón se descarta también el valor descrito en la literatura para la mutación V46A analizada en la especie D48G (Martínez et al., 1999). Otras mutaciones consideradas previamente en D48G y la especie silvestre en las posiciones 11, 23, 44 y 58 tampoco han sido llevadas a cabo sobre Best5I25V debido a que estas posiciones ya han sido ocupadas por diferentes residuos en este mutante

Los valores obtenidos del análisis de los datos cinéticos representados en la Tabla 5.2.2 y en la Figura 5.2.6 para cada una de las mutaciones realizadas sobre Best5I25V y D48G a los correspondientes valores de pH estudiados, resultan ligeramente más pequeños en general para el primero de ellos, aunque estas diferencias son demasiado pequeñas y entran

dentro de los límites de error en la mayoría de los casos, demostrando que los valores de  $\Phi_{\ddagger-D}$  dentro de la familia SH3 no presentan tendencia a cambiar.

#### 5.2.4 CÁLCULO DE ÁREAS ACCESIBLES AL SOLVENTE

A partir del análisis de las curvas obtenidas por CDB, descrito en la sección 5.2.2, se deduce que el valor de  $\Delta C_p$  no depende de la temperatura al menos dentro del intervalo de  $T_m$  calculado. Para poder explicar mejor estos resultados obtenidos, puede utilizarse la relación existente entre  $\Delta C_p$  y el cambio de las áreas polares y no polares accesibles al solvente que tiene lugar durante el desplegamiento (Myers et al., 1995). Además, los valores de estas áreas calculadas para Best5I25V (Tabla 5.2.3), en comparación con las correspondientes al dominio salvaje permitirán comprobar si se han producido cambios conformacionales en el corazón hidrofóbico de dicho dominio a través de las mutaciones realizadas en el mutante Best5I25V.

**TABLA 5.2.3**

**CAMBIO DE LAS ÁREAS ACCESIBLES AL SOLVENTE DEBIDO AL DESPLEGAMIENTO,  $\Delta ASA$ , PARA EL DOMINIO SH3 DE  $\alpha$ -ESPECTRINA (especie salvaje) Y EL MUTANTE Best5I25V A 25 °C**

Proteína	ESTADO	ASA (Å <sup>2</sup> )					
			Todos los átomos	Cadenas laterales totales	Cadena principal	No polar	Polar
SALVAJE	Desplegado (Tipo lámina $\beta$ extendida)	$ASA_D$	8439.9	6695.3	1744.7	5052.3	3387.6
	Nativo	$ASA_N$	3875.0	3327.7	547.3	2174.5	1700.5
		$\Delta ASA$ ( $ASA_D - ASA_N$ )	4564.9			2877.8	1687.1
Best5I25V	Desplegado (Tipo lámina $\beta$ extendida)	$ASA_D$	8751.4	6938.6	1812.9	5221.3	3530.1
	Nativo	$ASA_N$	4086.1	3559.6	526.5	2270.1	1815.4
		$\Delta ASA$ ( $ASA_D - ASA_N$ )	4665.3			2951.2	1714.7
		$\Delta ASA_{Best5I25V} / \Delta ASA_{salvaje}$	1.022			1.026	1.016

Los cálculos de las áreas accesibles al solvente que se presentan en la Tabla 5.2.3 para las dos especies anteriores se han realizado como se describe en la sección 4.2.3,

considerando que el estado desnaturalizado adquiere una conformación de lámina  $\beta$  extendida.

En los resultados de la Tabla 5.2.3, se observa que los valores de  $\Delta ASA_{pol}$  y  $\Delta ASA_{np}$  obtenidos para Best5I25V resultan ser ligeramente superiores a los del dominio salvaje (del orden del 3 %), dando lugar a que la relación entre estos parámetros, considerando todos los átomos, los residuos polares ó no polares ( $\Delta ASA_{Best5I25V}/\Delta ASA_{salvaje}$ ) sea próxima a la unidad. Según esto, cuando se aplican las ecuaciones 4.2.10 y 4.2.11 propuestas por Myers et al. (1995), los valores de  $\Delta C_p$  predichos apenas varían entre ambas especies. Así, se obtienen  $2.9 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\text{mol}^{-1}$  para las dos especies con la primera de las dos ecuaciones, mientras que con la segunda se obtienen  $2.7$  y  $2.8 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\text{mol}^{-1}$  para la especie salvaje y Best5I25V respectivamente. De esta manera puede decirse que existe una buena correlación entre la ausencia de cambios conformacionales inducidos por la presencia de mutaciones en el corazón hidrofóbico en el mutante Best5I25V y la conservación de las funciones  $\Delta C_p$  y  $\Delta H_D(T)$  en el conjunto de las especies comparadas anteriormente.

## 5.3 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

### 5.3.1 ESTABILIDAD DEL MUTANTE Best5I25V

Dentro del estudio termodinámico realizado sobre el mutante Best5I25V mediante CDB y la comparación llevada a cabo con el mutante descrito en la literatura D48G, hay que destacar que el hecho de que los valores de  $\Delta H_m$  obtenidos a partir del análisis de las curvas de capacidad calorífica estén de acuerdo con la ecuación 5.2.1 descrita en la sección 5.2.1 de Resultados parece indicar que el efecto estabilizante producido en el dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina a través de las mutaciones introducidas en las variantes Best5I25V y D48G tiene un carácter principalmente entrópico. En el caso del mutante D48G, esto puede justificarse teniendo en cuenta que solo se ha introducido una mutación puntual respecto a la especie silvestre, que produce la estabilización del giro  $\beta$  de la estructura (Figura 5.2.1) y un incremento en la entropía del estado desnaturalizado, mientras que en el estado nativo no se producen cambios y la exposición al medio del corazo hidrofóbico sigue siendo la misma. Según esto, la función que describe el cambio de energía de Gibbs debido al desplegamiento para el mutante D48G tomaría valores mayores respecto a la calculada para la especie silvestre. Esto es lo que realmente ocurre con la precisión obtenida para las funciones  $\Delta H_D(T)$  y  $\Delta C_{p,D}(T)$  representadas en la Figura 5.2.3 de la sección de resultados.

En el caso del mutante Best5I25V, las razones termodinámicas que explican el aumento de estabilidad respecto a la especie silvestre se basan en que los cambios de entropía que tienen lugar en dicha variante mutada durante el desplegamiento son menores que los correspondientes a la forma silvestre, incluso en el caso de aceptar una única función  $\Delta H_D(T)$ . Además, el hecho de que la función  $\Delta C_{p,D}(T)$  obtenida del análisis múltiple de las curvas calorimétricas de Best5I25V adopte valores mayores que los correspondientes a la especie silvestre y el mutante D48G a bajas temperaturas parece ser consistente con la existencia de una mayor superficie hidrofóbica (del orden del 18 %) no expuesta al disolvente en la estructura nativa de Best5I25V. De aquí que las funciones que describen la energía de Gibbs para dicho mutante presenten una mayor curvatura a bajas temperaturas y un valor de  $T_H$  mayor, que indica que la desnaturalización por frío de Best5I25V tendería lugar a una temperatura más elevada que la correspondiente al mutante D48G. Por otra parte, la diferencia con el valor calculado a 298 K de la función  $\Delta G_D$  con respecto a la variante D48G a pH neutro implica a su vez que la estabilización producida por las múltiples mutaciones en el

corazo hidrofóbico en el caso de Best5I25V es menos efectiva que la que se produce realizando una única mutación en un punto concreto dentro del giro  $\beta$ , en el caso de D48G. Respecto a la función que describe el cambio de la entalpía de desplegamiento con la temperatura de Best5I25V, ésta toma valores ligeramente superiores a los de la especie silvestre en el intervalo de bajas temperaturas, lo que de nuevo explica que esta variante esté estabilizada debido a efectos entrópicos más que a efectos de carácter entálpico, fundamentalmente porque la ganancia entrópica que se produce al conseguir una variante con una superficie hidrofóbica mayor protegida del solvente compensa otros factores entrópicos negativos que resultan de una mayor rigidez en el corazo hidrofóbico y entálpicos.

Como ya se mencionó en la sección de Resultados, la estabilización de la especie Best5I25V también posee un carácter electrostático dependiente del valor del pH y de los valores del pK de las cadenas laterales de los aminoácidos ácidos. Así, en el mutante D48G a pesar de sustituir un grupo ácido, el aspártico en la posición 48, por otro neutro, la alanina, el valor del pK de estos grupos anómalos. Sin embargo, en el caso de realizar mutaciones múltiples por grupos neutros en el caso de Best5I25V sí se produce un cambio en las interacciones electrostáticas, resultando esta variante más estable que D48G a pH 2.0 y menos estable a pH 3.5, valor en el que la diferencia entre los cambios de energía de Gibbs del desplegamiento entre los dos mutantes alcanza los  $9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  aproximadamente. A diferencia de los valores de  $\Delta H_D$  y  $\Delta C_{p,D}$  los valores de  $T_m$  pueden determinarse con mayor precisión.

### 5.3.2 CARACTERIZACIÓN DEL ESTADO DE TRANSICIÓN

A partir de los resultados del análisis comparativo de los valores de  $\Phi_{\neq-D}$  obtenidos para las mutaciones puntuales realizadas sobre los mutantes D48G y Best5I25V podría decirse que aunque los estados de transición de ambos sean estructuralmente idénticos, el correspondiente a Best5I25V estaría estabilizado energéticamente respecto al del mutante D48G (Martínez et al., 1998a). En cualquier caso, en función de lo anteriormente expuesto el estado de transición resulta ser el mismo que el encontrado para el resto de la familia del dominio SH3.

Los resultados expuestos en la sección 5.2.2 están de acuerdo con las conclusiones descritas en la literatura que indican que la topología es el factor determinante en el camino de plegamiento de las proteínas, a pesar de que las constantes cinéticas medidas para diferentes mutantes sean distintas (Martínez et al., 1998a; 1999). En el caso del mutante D48G la

diferencia se encuentra claramente en que las constantes calculadas para las cinéticas de plegamiento son mayores en comparación a las correspondientes a la especie silvestre y en que el valor de  $\Phi_{\neq D}$  en la posición 48 se iguala a 1 (Figura 5.2.5). En el caso del mutante Best5I25V encontramos un aumento de las constantes cinéticas de las reacciones de plegamiento y desplegamiento. Este hecho indica que el estado de transición se ha estabilizado respecto a los estados nativo y desnaturalizado, de acuerdo con nuestra conclusión previa. De aquí se deduce que el corazo hidrofóbico ha sufrido una estabilización respecto a la especie silvestre de este dominio debido a que hay una mayor superficie hidrofóbica protegida de la exposición al solvente. Sin embargo, esta directa estabilización del estado de transición no es razón suficiente para obtener un cambio en la ruta de plegamiento, incluso aunque se haya provocado un cambio conformacional dentro del estado nativo (Ventura et al., 2001b).

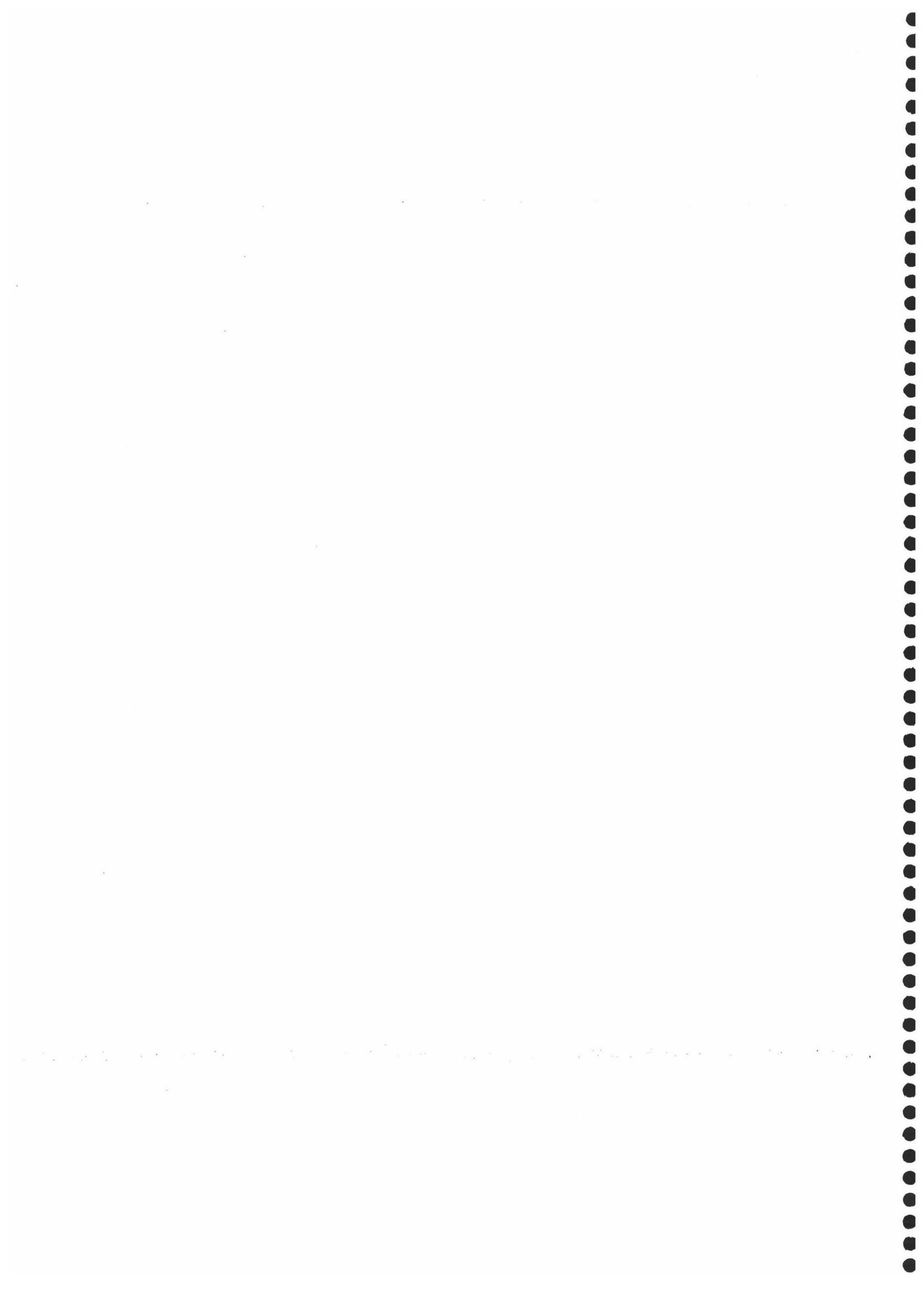








## **RESUMEN Y CONCLUSIONES**



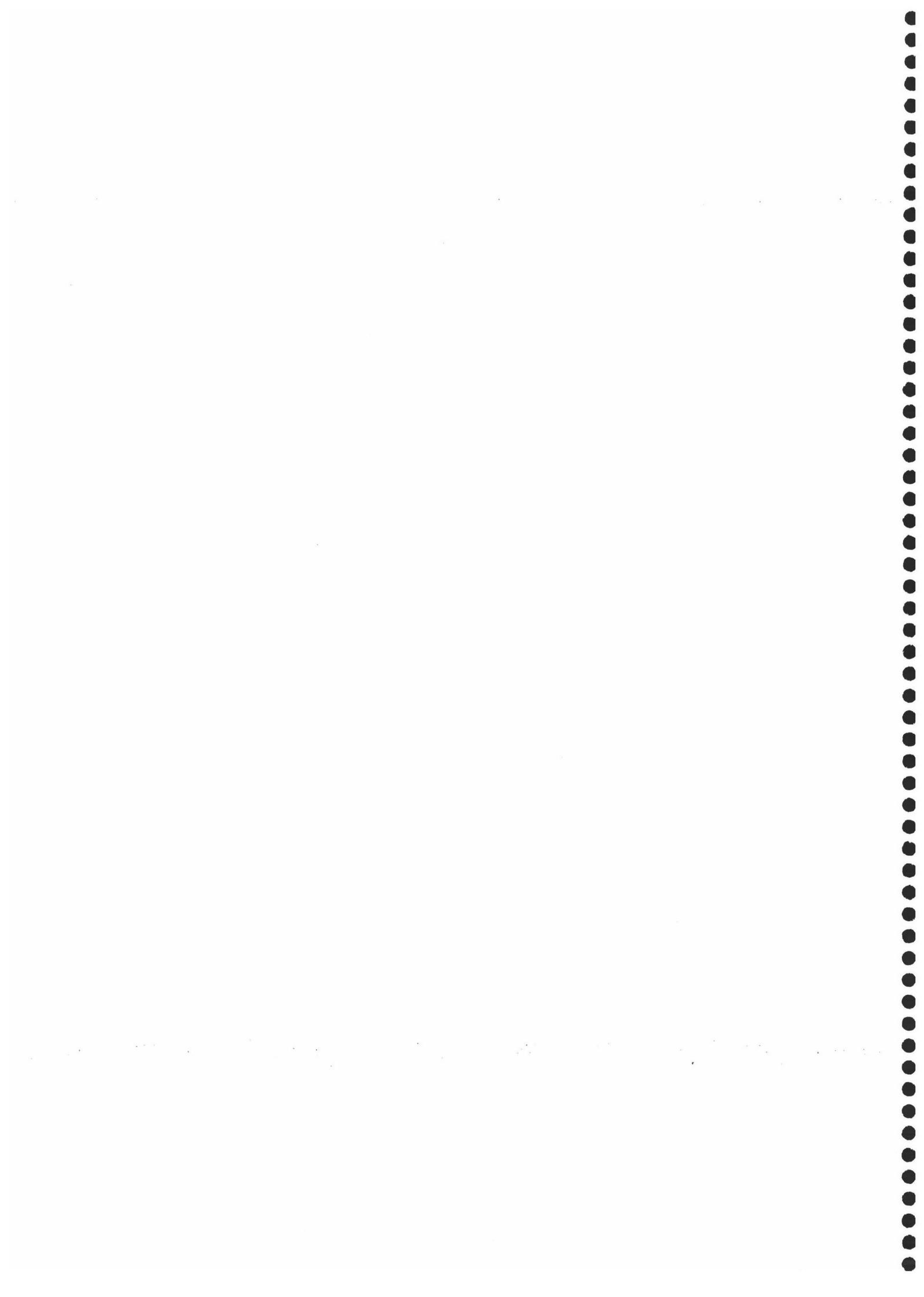
De forma general, puede decirse que el trabajo presentado en esta memoria, corresponde a la caracterización de la estabilidad y desplegamiento de proteínas globulares de pequeño tamaño (alrededor de los 7000 Daltons) inducido por la temperatura o en presencia de agentes desnaturizantes, utilizando tanto técnicas de equilibrio como la calorimetría diferencial de barrido (CDB) o espectroscópicas como el dicroísmo circular (DC) y técnicas cinéticas como la técnica de flujo detenido. Dichas investigaciones se han centrado en el estudio de la proteína circular AS-48 y del mutante Best5I25V del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina, cuya desnaturización puede describirse en ambos casos según el modelo de dos estados. AS-48 resulta ser una proteína con una elevada resistencia a la desnaturización térmica y en presencia de desnaturizantes. Por otra parte, el mutante Best5I25V diseñado sobre el corazón hidrofóbico del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina presenta una estabilidad mayor que la del dominio silvestre, aunque la estructura del estado de transición no varía en comparación al descrito hasta el momento para la familia SH3. Hay que destacar que para realizar el estudio termodinámico de estos dos sistemas fue necesario en primer lugar encontrar las condiciones experimentales en las que la desnaturización es un proceso de equilibrio y por tanto, pueda describirse utilizando la formulación termodinámica.

Para finalizar, y como resumen de todo el trabajo presentado en la Memoria, se enumeran a continuación y en el mismo orden que el utilizado en los resultados y discusión del mismo, las siguientes conclusiones:

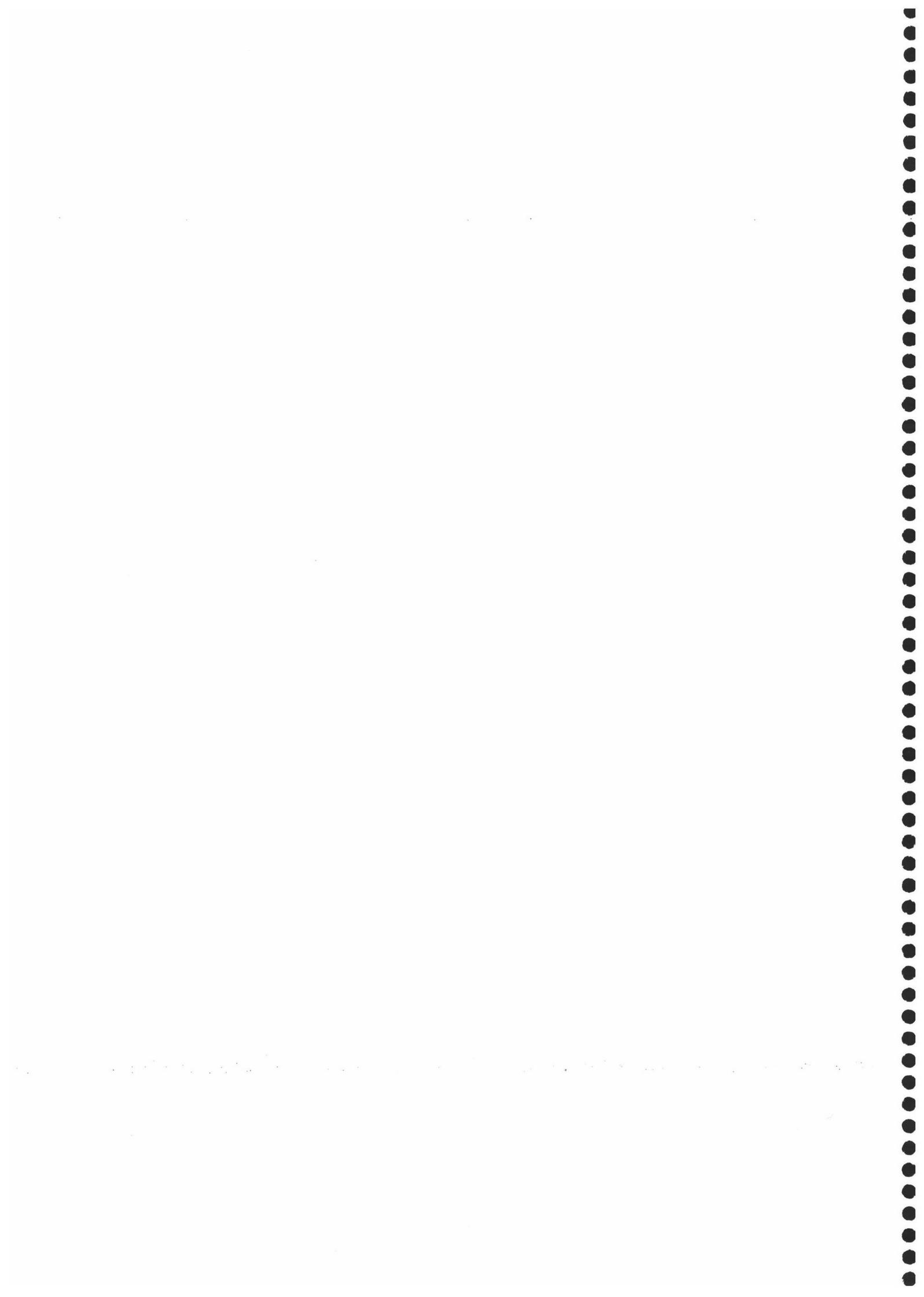
1. El estudio por CDB de la proteína AS-48 muestra que la desnaturización térmica tiene lugar a muy alta temperatura y se describe según el modelo de dos estados a baja fuerza iónica y pH 2.5, mientras que a pH neutro y alcalino se producen fenómenos de agregación irreversible.
2. El cambio de capacidad calorífica calculado mediante el análisis de los datos calorimétricos de AS-48 muestra un valor comparable al determinado para otras proteínas de tamaño similar. Por el contrario, el cambio de entalpía debido a la desnaturización es ligeramente pequeño mientras que el cambio de energía de Gibbs a 25 °C resulta ser elevado. La razón de la alta estabilidad parece ser debida a una ganancia entrópica debida a la organización circular de la cadena polipeptídica.

3. El valor del cambio de energía de Gibbs calculado a 25 °C, a partir de la desnaturalización térmica de AS-48 a baja fuerza iónica y pH 2.5 en presencia de urea presenta un valor elevado para el observado en otras proteínas de este tamaño, aunque se correlaciona con el calculado por CDB, en ausencia de este desnaturalizante.
4. El resultado del análisis termodinámico de la desnaturalización de AS-48 en presencia de guanidina muestra un valor del cambio de energía de Gibbs del desplegamiento en ausencia de dicho desnaturalizante dos veces superior a los encontrados en presencia de urea o CDB, indicando la doble acción de la guanidina: como agente desnaturalizante, desestabilizando la estructura cuando se encuentra a bajas concentraciones y como sal, produciendo una gran estabilización debido a la unión de los iones  $\text{Cl}^-$  a la superficie de la proteína.
5. La estabilidad de la proteína AS-48 a la vista de los resultados obtenidos de los estudios de CDB y DC puede explicarse mediante la distribución asimétrica de las cargas en su superficie, importante para desempeñar su función biológica, y más importante aún, mediante la ganancia de entropía que se produce por la circularización de su cadena.
6. Los intentos realizados para determinar el efecto de la circularización por tratamiento con BrCN han demostrado que la estructura se encuentra desplegada, incluso a temperatura ambiente, indicando que dicha ruptura debería realizarse en una regiones situadas entre dos hélices.
7. Los parámetros termodinámicos obtenidos del estudio de la estabilidad del mutante Best5I25V del dominio SH3 de  $\alpha$ -espectrina por CDB, en el intervalo de pH comprendido entre 2.0 y 3.5, muestran una mayor estabilidad para este mutante en comparación a la descrita en la literatura para el dominio silvestre.
8. Las constantes de velocidad obtenidas del estudio cinético de Best5I25V son mayores que las obtenidas para el dominio silvestre SH3 de  $\alpha$ -espectrina, indicando que existe una estabilización del estado de transición en este mutante, consecuencia de una mayor organización de los restos en el corazón hidrofóbico.

9. La caracterización del estado de transición del mutante Best5I25V del dominio de  $\alpha$ -espectrina mediante el método de la ingeniería de proteínas muestra que el estado de transición de este mutante tiene la misma estructura que los descritos en la literatura para otros miembros de la familia SH3 indicando que la topología es un factor determinante en el plegamiento de las proteínas, a pesar de las diferencias encontradas entre ellos en los valores de las constantes cinéticas y del parámetro  $\Phi$ .
  
10. El estado de transición parece estabilizarse energéticamente, entre otros motivos, por contactos inespecíficos entre los retos hidrofóbicos de la proteína.



## APÉNDICES



## 7. APÉNDICES

## APÉNDICE A

Subrutina empleada en el análisis individual y múltiple de los perfiles de las curvas de  $C_p$  por el método de mínimos cuadrados no lineales, aplicando el modelo de dos estados en el programa Origin 5.0:

APROXIMACIÓN DE  $T_m$  y  $\Delta H_m$ :

$$R = 8.314e-3;$$

$$T = x;$$

$$Tr = 293.15;$$

$$a = a_N - b_N \cdot Tr;$$

$$d = b_D - 2 \cdot c_D \cdot Tr;$$

$$c = a_D - (d \cdot Tr) - (c_D \cdot Tr^2);$$

$$C_{p,N} = a_N + b_N \cdot T;$$

$$C_{p,D} = c + d \cdot T + c_D \cdot T^2;$$

$$\Delta C_p = C_{p,D} - C_{p,N};$$

$$\Delta H_D = \Delta H_m + (c-a) \cdot (T-T_m) + (d-b) \cdot ((T^2-T_m^2)/2) + (c_D/3) \cdot (T^3-T_m^3);$$

$$\Delta S_D = (\Delta H_m/T_m) + (c-a) \cdot \ln(T/T_m) + (d-b) \cdot (T-T_m) + (c_D \cdot (T^2-T_m^2)/2);$$

$$\Delta G_D = \Delta H_D - (T \cdot \Delta S_D);$$

$$K = \exp(-\Delta G_D/(R \cdot T));$$

$$y = C_{p,N} + ((\Delta C_p \cdot K)/(1+K)) + (\Delta H_D^2 \cdot K)/((1+K)^2 \cdot (R \cdot T^2));$$

APROXIMACIÓN DE  $T_H$  y  $T_S$ :

$$R = 8.314e-3;$$

$$T = x;$$

$$a = a_N - b_N \cdot T_H;$$

$$d = b_D - 2 \cdot c_D \cdot T_H;$$

$$c = a_D - (d \cdot T_H) - (c_D \cdot T_H^2);$$

$$C_{p,N} = a_N + b_N \cdot T;$$

$$C_{p,D} = c + d \cdot T + c_D \cdot T^2;$$

$$\Delta C_p = C_{p,D} - C_{p,N};$$

$$\Delta H_D = (c-a) \cdot (T-T_H) + (d-b) \cdot ((T^2-T_H^2)/2) + (c_D/3) \cdot (T^3-T_H^3);$$

$$\Delta S_D = (T/T_S) + (c-a) \cdot \ln(T/T_S) + (d-b) \cdot (T-T_S) + (c_D \cdot (T^2-T_S^2)/2);$$

$$\Delta G_D = \Delta H_D - (T \cdot \Delta S_D);$$

$$K = \exp(-\Delta G_D / (R \cdot T));$$

$$y = C_{p,N} + ((\Delta C_p \cdot K) / (1 + K)) + (\Delta H_D^2 \cdot K) / ((1 + K)^2 \cdot (R \cdot T^2));$$

## APÉNDICE B

Subrutina empleada en el análisis individual y múltiple de los perfiles de las curvas de titulación de DC en presencia de desnaturalizantes, por el método de mínimos cuadrados no lineales, aplicando el modelo de dos estados en el programa SIGMA PLOT utilizando las distintas aproximaciones:

MEL (den = urea, guanidina)

$$R = 8.31e-3$$

$$T = 298$$

$$\theta_{222,N} = \theta_{N,0} + m_N \cdot c_{den}$$

$$\theta_{222,D} = \theta_{D,0} + m_D \cdot c_{den}$$

$$\Delta G = \Delta G_D - m_{den} \cdot c_{den}$$

$$K = \exp(-\Delta G / R / T)$$

$$\theta_{222} = (\theta_{222,N} + \theta_{222,D} \cdot K) / (1 + K)$$

MEL-C (guanidina)

$$R = 8.31e-3$$

$$T = 298$$

$$\theta_{222,N} = \theta_{N,0} + m_N \cdot D_{gu}$$

$$\theta_{222,D} = \theta_{D,0} + m_D \cdot D_{gu}$$

$$\Delta G = \Delta G_D + R \cdot T \cdot m_{D,gu} \cdot D_{gu}$$

$$K = \exp(-\Delta G / R / T)$$

$$\theta_{222} = (\theta_{222,N} + \theta_{222,D} \cdot K) / (1 + K)$$

fit  $\theta_{222}$  to y

MUD (urea)

$$R = 8.31e-3$$

$$\Delta H_{b,gu} = -9$$

$$T = 363$$

$$K_b = 0,06 * \exp((-\Delta H_{b,gu} / R) * (1 / T - (3,35e-3)))$$

$$\theta_{222,N} = \theta_{N,0} + m_N \cdot c_{den}$$

$$\theta_{222,D} = \theta_{D,0} + m_D \cdot c_{den}$$

$$\Delta G_{den} = \Delta G - \Delta n \cdot R \cdot T \cdot \ln(1 + K_b \cdot c_{den})$$

$$K = \exp(-\Delta G / R / T)$$

$$\theta_{222} = (\theta_{222,N} + \theta_{222,D} \cdot K) / (1 + K)$$

fit  $\theta_{222}$  to y

MUD (guanidina)

$$R = 8,31e-3$$

$$\Delta H_{b,gu} = -11$$

$$T = 298;308;318;328$$

$$K_b = 0,6 \cdot \exp((-\Delta H_{b,gu} / R) \cdot (1 / T - (3,35e-3)))$$

$$\theta_{222,N} = \theta_{N,0} + m_N \cdot c_{den}$$

$$\theta_{222,D} = \theta_{D,0} + m_D \cdot c_{den}$$

$$\Delta G_{den} = \Delta G - \Delta n \cdot R \cdot T \cdot \ln(1 + K_b \cdot c_{den})$$

$$K = \exp(-\Delta G / R / T)$$

$$\theta_{222} = (\theta_{222,N} + \theta_{222,D} \cdot K) / (1 + K)$$

fit  $\theta_{222}$  to y

Subrutina empleada en el análisis múltiple de los perfiles de las curvas de desnaturalización por DC en presencia de desnaturalizantes por el método de mínimos cuadrados no lineales, aplicando el modelo de dos estados en el programa SIGMA PLOT (como ejemplo se ha considerado el caso de un conjunto de cuatro curvas):

$$\theta_{222,N} = \theta_{N,0} + \theta_{N,1} \cdot (T - T_0)$$

$$\theta_{222,D} = \theta_{D,0} + \theta_{D,1} \cdot (T - T_1) + \theta_{D,2} \cdot (T - T_0)^2$$

$$R = 0.0083144$$

$$\Delta H_D = H_0 + \Delta C_p \cdot (T - T_0)$$

$$\Delta H_{m,1} = H_0 + \Delta C_p \cdot (T_{m,1} - T_0)$$

$$\Delta S_{D,1} = \Delta H_{m,1} / T_{m,1} + \Delta C_p \cdot \ln(T / T_{m,1})$$

$$K_1 = \exp((\Delta S_{D,1} - \Delta H_D/T)/R)$$

$$Q_1 = 1 + K_1$$

$$\theta_{222,1} = (\theta_{222,N} + \theta_{222,D} \cdot K_1)/Q_1$$

;curva 2

$$\Delta H_{m,2} = H_0 + \Delta C_p \cdot (T_{m,2} - T_0)$$

$$\Delta S_{D,2} = \Delta H_{m,2}/T_{m,2} + \Delta C_p \cdot \ln(T/T_{m,2})$$

$$K_2 = \exp((\Delta S_{D,2} - \Delta H_D/T)/R)$$

$$Q_2 = 1 + K_2$$

$$\theta_{222,2} = (\theta_{222,N} + \theta_{222,D} \cdot K_2)/Q_2$$

;curva 3

$$\Delta H_{m,3} = H_0 + \Delta C_p \cdot (T_{m,3} - T_0)$$

$$\Delta S_{D,3} = \Delta H_{m,3}/T_{m,3} + \Delta C_p \cdot \ln(T/T_{m,3})$$

$$K_3 = \exp((\Delta S_{D,3} - \Delta H_D/T)/R)$$

$$Q_3 = 1 + K_3$$

$$\theta_{222,3} = (\theta_{222,N} + \theta_{222,D} \cdot K_3)/Q_3$$

;curva 4

$$\Delta H_{m,4} = H_0 + \Delta C_p \cdot (T_{m,4} - T_0)$$

$$\Delta S_{D,4} = \Delta H_{m,4}/T_{m,4} + \Delta C_p \cdot \ln(T/T_{m,4})$$

$$K_4 = \exp((\Delta S_{D,4} - \Delta H_D/T)/R)$$

$$Q_4 = 1 + K_4$$

$$\theta_{222,4} = (\theta_{222,N} + \theta_{222,D} \cdot K_4)/Q_4$$

( $Q_1$ ,  $Q_2$ ,  $Q_3$  y  $Q_4$  son las funciones de partición de cada una de las curvas)

APÉNDICE C

Datos de los gráficos Chevron obtenidos para los mutantes de Best5I25V y D48G a pH 3.5 y 7.0

PH 3.5							
L31A/Best5I25V		D48G/Best5I25V		L8A/D48G		S36A/D48G	
[urea](M)	ln k	[urea](M)	ln k	[urea](M)	ln k	[urea](M)	ln k
7.3564	-3.0576	7.2174	0.015873	7.3564	1.6702	7.4568	0.49409
7.5404	-2.9004	6.8564	-0.12556	7.5404	1.7093	7.6432	0.58166
7.1728	-2.9957	6.3151	-0.17793	7.1728	1.5569	7.5903	0.41805
6.8049	-3.1011	7.7586	0.28668	6.8049	1.4902	6.8978	0.26773
6.4367	-3.2968	5.9545	-0.23953	7.9081	1.8303	8.0159	0.64343
6.0692	-3.3814	5.4129	-0.091019	6.4367	1.3556	6.5245	0.13802
5.5172	-3.6119	4.8716	0.20212	6.9885	1.5112	7.0838	0.36256
5.1495	-3.6497	8.4719	0.51103	6.0692	1.2470	6.1520	0.040182
8.0946	-2.6173	5.5935	-0.25103	5.5172	1.0623	5.5924	-0.14618
6.5574	-3.2442	5.2327	-0.023269	8.2760	1.9836	8.3889	0.83725
6.2333	-3.3524	6.4956	-0.20089	8.0946	1.9135	8.2051	0.79931
6.7214	-3.2442	7.5781	0.13628	8.4603	2.0040	8.5757	0.92505
5.5738	-3.6119	8.1196	0.44597	8.6424	2.0508	8.7274	0.93216
5.2459	-3.6497	6.5574	-0.17079	6.5574	1.3870	8.9392	1.2723
4.9180	-3.6119	6.2333	-0.16017	6.2333	1.2505	6.4581	0.24920
5.7376	-3.5756	6.7214	-0.12217	6.7214	1.4124	5.9739	0.016857
7.3772	-2.9375	5.5738	-0.056570	4.9180	0.82374	6.1351	0.088926
4.6380	-3.5066	5.2459	0.044973	5.7376	1.0578	6.6196	0.25231
4.2718	-3.3524	4.9180	0.19310	7.3772	1.6245	5.4893	-0.15315
4.0279	-3.1942	5.7376	-0.15900	5.9740	1.1750	5.1665	-0.23446
3.7837	-3.4112	7.3772	0.048790	6.9424	1.5151	6.9424	0.34854
3.5396	-2.6173	7.5870	0.25928	4.9799	0.90543	4.8426	-0.28635
4.8822	-3.6119	4.9799	0.13540	4.7308	0.83465	5.6507	-0.081210
1.7901	-0.87467	4.7308	0.23586	4.3573	0.71344	7.2661	0.49287
2.1482	-1.2765	4.3573	0.64867	5.3533	1.0716	7.5870	0.64448
2.6852	-1.7430	5.3533	0.0049875	4.1085	0.65700	4.8822	-0.16960
1.2531	-0.32435	4.1085	1.1581	3.7348	0.58445	5.1262	-0.12556
3.0432	-2.1286	5.8504	-0.079043	3.3613	0.56133	4.6380	-0.22065
3.5800	-2.5383	3.8594	1.3234	5.8504	1.2305	4.2718	-0.19723
4.1173	-3.0366	4.4815	0.62967	3.8594	0.61410	5.2483	-0.10647
1.4321	-0.50584	5.2288	0.062035	3.6105	0.57605	4.0279	-0.17316
0.89510	0.0079682	5.6024	0.038259	4.4815	0.75847	3.6609	-0.016129
4.4753	-3.6119	1.3675	3.3705	5.2288	1.0203	5.4929	-0.035627
		1.6410	3.1833	5.6024	1.1423	5.7356	0.030529
		2.0513	2.7182	3.4860	0.54812	3.7837	-0.093212
		0.95730	3.6601	1.5484	1.5228	3.5396	0.0069756
		2.2348	2.4416	1.8580	1.2404	4.3939	-0.23446
		2.7351	2.0732	2.3226	0.96508	5.3721	-0.069350
		3.1453	1.7827	1.0838	2.1477	1.7265	1.7971
		2.5983	2.2956	2.6322	0.72271	2.0718	1.3186
		2.8719	1.9763	3.0967	0.58834	2.4171	0.98358
		1.9146	2.9521	3.5612	0.51641	2.5898	0.78436
		1.0940	3.6769	0.46450	3.0401	2.9351	0.45552
				2.9419	0.61194	3.2804	0.19145
				3.2516	0.59443	3.4530	0.068593
				2.1677	1.0054	3.7984	-0.11093
				1.2387	1.8270	4.1437	-0.24207
				0.77420	2.5850	4.3163	-0.27444

						1.5540	1.9550
						1.2086	2.3832
						0.86330	2.8771

pH 7.0							
L8A/Best5I25V		V9A/Best5I25V		T24A/Best5I25V		D29A/Best5I25V	
[urea](M)	ln k	[urea](M)	ln k	[urea](M)	ln k	[urea](M)	ln k
7.3564	-0.28502	7.3564	-0.57093	7.3564	-0.18152	7.3564	-1.6607
7.5404	-0.26527	7.5404	-0.39304	7.5404	-0.24080	7.5404	-1.6246
7.1728	-0.40647	7.1728	-0.54300	7.1728	-0.34108	7.1728	-1.7148
6.8049	-0.44006	6.8049	-0.56387	6.8049	-0.39304	6.8049	-1.7373
7.9081	-0.15315	7.9081	-0.21319	7.9081	-0.13467	7.9081	-1.5187
6.4367	-0.49594	6.4367	-0.80968	6.4367	-0.45571	6.4367	-1.7661
6.9885	-0.38273	6.9885	-0.63299	6.9885	-0.37834	6.9885	-1.7148
6.0692	-0.59966	6.0692	-0.86038	6.0692	-0.44942	6.0692	-1.7204
5.5172	-0.66748	5.5162	-0.96758	5.5172	-0.49430	5.5172	-1.5654
8.2760	0.067659	5.1495	-0.97022	8.2760	0.021761	8.2760	-1.5512
8.0946	-0.044997	8.0946	-0.079043	8.0946	0.010940	8.0946	-1.5141
8.6424	0.077887	6.4581	-0.78526	8.4603	0.059212	8.4603	-1.4917
6.4581	-0.41400	5.9739	-0.84630	8.6424	0.18648	8.6424	-1.4524
6.1351	-0.53444	6.1351	-0.77871	6.4581	-0.32435	6.5574	-1.7148
6.6196	-0.42007	6.6196	-0.83011	6.1351	-0.45571	6.2333	-1.7037
5.4893	-0.64436	5.4839	-0.98886	6.6196	-0.46681	6.7214	-1.7260
5.1665	-0.69515	6.1665	-1.0328	5.4893	-0.48289	5.5738	-1.5418
4.8426	-0.63488	6.9424	-0.53957	5.1665	-0.51249	5.2459	-1.4439
5.6507	-0.64817	4.8426	-1.0385	4.8426	-0.51416	4.9180	-1.2658
7.2661	-0.28768	5.6507	-0.91629	5.6507	-0.49102	5.7376	-1.5896
5.9739	-0.59966	4.8822	-1.0671	7.2661	-0.20579	7.3772	-1.6928
6.9424	-0.30246	5.1262	-1.0244	4.9799	-0.44785	4.9799	-1.3823
4.9799	-0.52763	4.6380	-0.96496	4.7308	-0.46362	4.7308	-1.1842
4.7308	-0.57270	4.2718	-0.86750	4.3573	-0.38273	4.3573	-0.96233
4.3573	-0.48613	5.2483	-1.0413	5.3533	-0.41552	5.3533	-1.5051
5.3533	-0.66553	4.0279	-0.93395	4.1085	-0.38861	4.1085	-0.84397
4.1085	-0.54300	3.6609	-0.68122	3.7348	-0.27707	3.7348	-0.57803
3.7348	-0.37397	3.2954	-1.1874	3.6313	-0.13582	5.8504	-1.5896
3.6313	-0.14156	1.7139	0.84887	5.8504	-0.38273	3.8594	-0.62176
5.8504	-0.70320	2.0566	0.51522	3.8594	-0.32296	3.6105	-0.39750
3.8594	-0.14041	2.3994	0.15100	3.6105	-0.27971	4.4815	-1.0847
3.6105	-0.28768	2.5708	0.012916	4.4815	-0.42312	5.2288	-1.4271
4.4815	-0.56212	2.9135	-0.15199	5.2288	-0.42618	5.6024	-1.5325
5.2288	-0.65393	3.2563	-0.40947	5.6024	-0.46522	1.6394	1.1854
5.6024	-0.56740	3.4277	-0.52425	1.6891	0.77932	1.9672	0.99584
1.3184	1.0321	3.7705	-0.62736	2.0269	0.60868	2.4591	0.61896
1.5821	0.82418	4.1133	-0.86275	2.5337	0.12839	1.1475	1.7152
1.8458	0.68006	4.2846	-0.78966	1.1824	1.1973	2.7869	0.34784
1.9778	0.54232	1.5426	0.91067	2.8715	0.13191	3.2787	-0.059750
2.2413	0.42134	1.1997	1.2692	3.3782	-0.15665	3.7706	-0.48451
2.5050	0.089841	0.85690	1.7485	3.8850	-0.34531	0.49180	2.2311
2.6369	-0.0070246	1.8854	0.71638	0.50670	1.7554	3.1148	0.053541
2.9006	-0.12670			3.2093	-0.050241	3.4427	-0.20457
3.1643	-0.34956			3.5472	-0.24462	2.2951	0.72173
3.2961	-0.35240			2.3648	0.38662	1.3115	1.6040
1.1865	1.1933			1.3513	1.1145	0.81970	1.9939
0.92290	1.5619			0.84460	1.6355		
0.65920	1.8732						
1.4504	1.0242						

1.0547	1.3512						
3.0324	-0.26007						
0.79110	1.5819						
1.4504	-0.28502						
<b>pH 7.0</b>							
<b>L33A/Best5I25V</b>		<b>S36A/Best5I25V</b>		<b>K43AA/Best5I25V</b>		<b>F52AA/Best5I25V</b>	
[urea](M)	ln k	[urea](M)	ln k	[urea](M)	ln k	[urea](M)	ln k
7.3564	-0.27181	7.3564	-1.7430	7.3187	-0.81871	7.3564	-0.031491
7.5404	-0.13926	7.5404	-1.6928	6.9527	-0.94161	7.5404	0.052592
7.1728	-0.35382	7.1728	-1.7661	6.4038	-1.0328	6.9885	-0.19358
6.8049	-0.46045	6.8049	-1.8140	6.0381	-1.1147	6.6207	-0.14272
7.9081	-0.070422	7.9081	-1.6348	7.1360	-0.88916	6.4367	-0.27312
6.4367	-0.58879	6.4367	-1.8326	6.7701	-0.93395	6.0692	-0.35098
6.9885	-0.36817	6.9885	-1.7898	5.4889	-1.1457	7.9081	0.098940
6.0692	-0.63299	6.0692	-1.8326	5.1232	-1.1239	8.2760	0.11867
5.5172	-0.92887	5.5172	-1.6983	8.0532	-0.57625	8.4603	0.12663
8.2760	0.12663	8.2760	-1.5371	6.3588	-0.99696	8.6424	0.30969
8.0946	0.076035	8.0946	-1.5702	6.0408	-1.0498	5.7012	-0.47482
8.4603	0.21107	8.4603	-1.5141	6.5178	-0.95711	5.3335	-0.56212
8.6424	0.15100	8.6424	-1.4784	5.4049	-1.0996	6.4581	-0.22439
6.5574	-0.50088	6.5574	-1.8326	5.0870	-1.1363	5.9739	-0.35525
6.2333	-0.56037	6.2333	-1.8202	4.7690	-1.0906	6.1351	-0.29706
6.7214	-0.37397	6.7214	-1.8140	5.5638	-1.1489	6.6196	-0.18513
5.5738	-0.81645	5.5738	-1.7148	7.1537	-0.85567	5.4893	-0.50916
5.2459	-0.91379	5.2459	-1.5847	4.6748	-1.0527	5.1665	-0.54818
4.9180	-1.0134	4.9180	-1.5654	4.3145	-0.84397	6.9424	-0.12556
5.7376	-0.66359	5.7376	-1.7373	4.0682	-0.74866	4.8426	-0.61804
7.3772	-0.11317	7.3772	-1.7430	3.8215	-0.63677	5.6507	-0.44006
4.9799	-0.92887	4.9799	-1.6451	3.5750	-0.52088	7.2661	0.0089597
4.7308	-0.98886	4.7308	-1.3471	4.9310	-1.1552	7.5870	0.011929
4.3573	-1.1680	4.3573	-1.1809	1.7390	0.77196	4.8822	-0.54818
5.3533	-0.81193	5.3533	-1.6607	2.0868	0.61519	5.1262	-0.50088
4.1085	-1.2344	4.1085	-1.1056	2.6088	0.15186	4.6380	-0.62176
3.7348	-1.3130	3.7348	-0.74444	1.2173	1.2366	4.2718	-0.68916
3.3613	-1.3863	3.8594	-0.79629	2.9563	-0.035627	5.2483	-0.47321
3.8594	-1.2983	3.6105	-0.67924	3.4780	-0.52763	4.0279	-0.75502
3.6105	-1.3587	4.4815	-1.1973	3.9997	-0.83011	3.6609	-0.82554
4.4815	-1.1301	1.8140	1.0599	0.52170	1.7385	3.2954	-0.83702
5.2288	-0.83933	2.1768	0.76407	3.3044	-0.34814	5.4929	-0.40347
1.6394	-0.93140	2.7211	0.28893	3.6520	-0.57625	5.7356	-0.31061
1.9672	-1.1301	1.2698	1.5250	2.4346	-0.61990	3.7837	-0.78966
2.4591	-1.3205	3.0838	-0.026344	0.86950	1.5529	3.5396	-0.83933
1.1475	-0.46522	3.6281	-0.42465			4.3939	-0.67334
2.7869	-1.3863	4.1723	-0.79851			1.7390	-0.34672
3.2787	-1.4653	0.54420	2.1046			2.0868	-0.58161
3.7706	-1.4610	3.4466	-0.26007			2.4346	-0.68320
0.49180	0.14756	3.8095	-0.59059			2.6088	-0.78307
3.1148	-1.4188	2.5396	0.42918			2.9563	-0.85332
3.4427	-1.4610	1.4512	1.3276			3.2877	-0.92887
2.2951	-1.2344	0.90700	1.8228			3.8258	-0.89649
1.3115	-0.67727					4.1737	-0.84397
0.81970	-0.19723					4.3475	-1.0584
						1.5652	-0.28104
						1.2173	0.022739
						0.86950	0.034401

						1.9131	-0.46204
						1.3912	-0.14041
						3.9997	-0.85332
						0.52170	0.46562
<b>PH 7.0</b>							
<b>V53A/Best5I25V</b>		<b>A55G/Best5I25V</b>		<b>L8A/D48G</b>		<b>L33A/D48G</b>	
<b>[urea](M)</b>	<b>ln k</b>	<b>[urea](M)</b>	<b>ln k</b>	<b>[urea](M)</b>	<b>ln k</b>	<b>[urea](M)</b>	<b>ln k</b>
7.4317	-0.91629	7.3564	-0.31334	1.6145	2.7064	7.3564	-0.43541
7.6175	-0.89404	7.5404	-0.27575	1.9374	2.3942	7.5404	-0.36817
7.0600	-1.0877	7.1728	-0.36962	2.2603	2.0202	7.1728	-0.46522
6.6879	-1.1809	6.8049	-0.56387	2.4220	1.9607	6.8049	-0.56387
6.5026	-1.2483	7.9081	-0.10870	2.7447	1.7156	7.9081	-0.28635
6.1313	-1.3243	6.4367	-0.69917	3.0524	1.4360	6.4367	-0.63488
7.9889	-0.70928	6.9885	-0.50584	3.2290	1.3494	6.9885	-0.49758
8.3607	-0.57625	6.0692	-0.78307	3.5519	1.1181	6.0692	-0.72774
8.5469	-0.55165	5.5172	-0.94418	3.8749	0.94585	5.5172	-0.86275
8.7308	-0.51584	8.2760	0.022739	4.0363	0.80290	8.2760	-0.14734
5.7596	-1.4961	8.0946	-0.020203	1.4529	2.6668	8.0946	-0.18995
5.3881	-1.5847	8.4603	0.033435	1.1302	3.0245	8.4603	-0.16724
8.9092	-0.39008	8.6424	-0.31334	0.80730	3.3194	8.6424	0.32714
7.4317	-1.2344	6.4581	-0.27575	1.7761	2.5410	6.4581	-0.60148
7.0456	-1.3356	5.9739	-0.36962	1.2916	2.9553	5.9739	-0.71744
6.7214	-1.1270	6.1351	-0.56387	3.7134	0.96203	6.1351	-0.67531
7.0492	-1.1087	6.6196	-0.10870	0.96880	3.1641	6.6196	-0.56740
5.7376	-1.2140	5.4893	-0.69917	7.3564	-0.54300	5.4893	-0.84165
7.3772	-0.84630	5.1665	-0.50584	7.5404	-0.57803	5.1665	-0.93905
7.7030	-0.83933	6.9424	-0.78307	7.1728	-0.52088	6.9424	-0.47642
7.2155	-0.93905	4.8426	-0.94418	6.8049	-0.49430	4.8426	-0.96758
6.3937	-1.1809	5.6507	0.022739	7.9081	-0.59059	5.6507	-0.79629
5.9012	-1.3243	7.2661	-0.020203	6.4367	-0.40797	7.2661	-0.37834
4.9324	-1.7430	7.5870	0.033435	6.9885	-0.51919	7.5870	-0.39899
5.3023	-1.6094	4.9799	-0.31334	6.0692	-0.28768	4.8822	-0.98618
5.5490	-1.5654	5.2288	-0.27575	5.5172	-0.10536	5.1262	-0.87227
5.7946	-1.4740	4.7308	-0.36962	8.2760	-0.57625	4.6380	-1.0328
4.6857	-1.8079	4.3573	-0.56387	8.0946	-0.58161	4.2718	-1.0936
4.3158	-1.9173	5.3533	-0.10870	8.4603	-0.57093	5.2483	-0.87467
4.0694	-1.9449	4.1085	-0.69917	8.6424	-0.58340	4.0279	-1.0877
3.8226	-2.1371	3.7348	-0.50584	8.8189	-0.57982	3.6609	-1.0966
4.4388	-1.9105	3.3613	-0.78307	6.4581	-0.38419	3.2954	-1.0189
1.6394	-0.76143	5.6024	-0.94418	5.9739	-0.24846	5.4929	-0.80744
1.9672	-1.0759	5.8504	0.022739	6.1351	-0.32435	5.7356	-0.80968
2.2951	-1.2946	3.8594	-0.020203	6.6196	-0.48127	3.7837	-1.0788
2.4591	-1.3744	3.6105	0.033435	5.4893	-0.088831	3.5396	-1.0613
2.7869	-1.6399	4.4815	-0.31334	5.1665	0.027615	4.3939	-1.0328
3.1148	-1.7204	1.6394	-0.27575	6.9424	-0.52933	1.5649	-0.10759
3.2787	-1.8140	1.9672	-0.36962	4.8426	0.23349	1.8779	-0.31197
3.6066	-1.9449	2.2951	-0.56387	5.6507	-0.16605	2.1909	-0.55339
3.9345	-1.8515	2.4591	-0.10870	7.5870	-0.54991	2.3476	-0.64436
4.0984	-1.8579	2.7869	-0.69917	6.7808	-0.49266	2.6603	-0.76787
1.4754	-0.61065	3.0993	-0.50584	4.9799	0.29267	2.9586	-0.95192
1.1475	-0.34814	3.2787	-0.78307	5.2288	0.10526	3.1298	-0.97817
0.81970	0.016857	3.6066	-0.94418	4.7308	0.37707	3.4429	-1.1584
1.8035	-0.93140	3.9345	0.022739	4.3573	0.70508	3.7559	-1.0906
1.3115	-0.43696	4.0984	-0.020203	5.3533	0.016857	3.9123	-1.1394
3.7706	-1.8579	1.4754	0.033435	4.1085	0.81757	1.6569	-0.15900

0.49180	0.23744	1.1475	-0.31334	3.7348	1.1656	1.0954	0.32208
		0.81970	-0.27575	5.6024	-0.11317	0.78250	0.66629
		1.8035	-0.36962	5.8504	-0.16960	1.7216	-0.15900
		1.3115	-0.56387	3.8594	0.91629	1.2519	0.18814
		3.7706	-0.10870	4.4815	0.51462	0.46950	1.0017
		0.49180	-0.69917			0.93890	0.48612
		1.0195	-0.50584				

**PH 7.0**

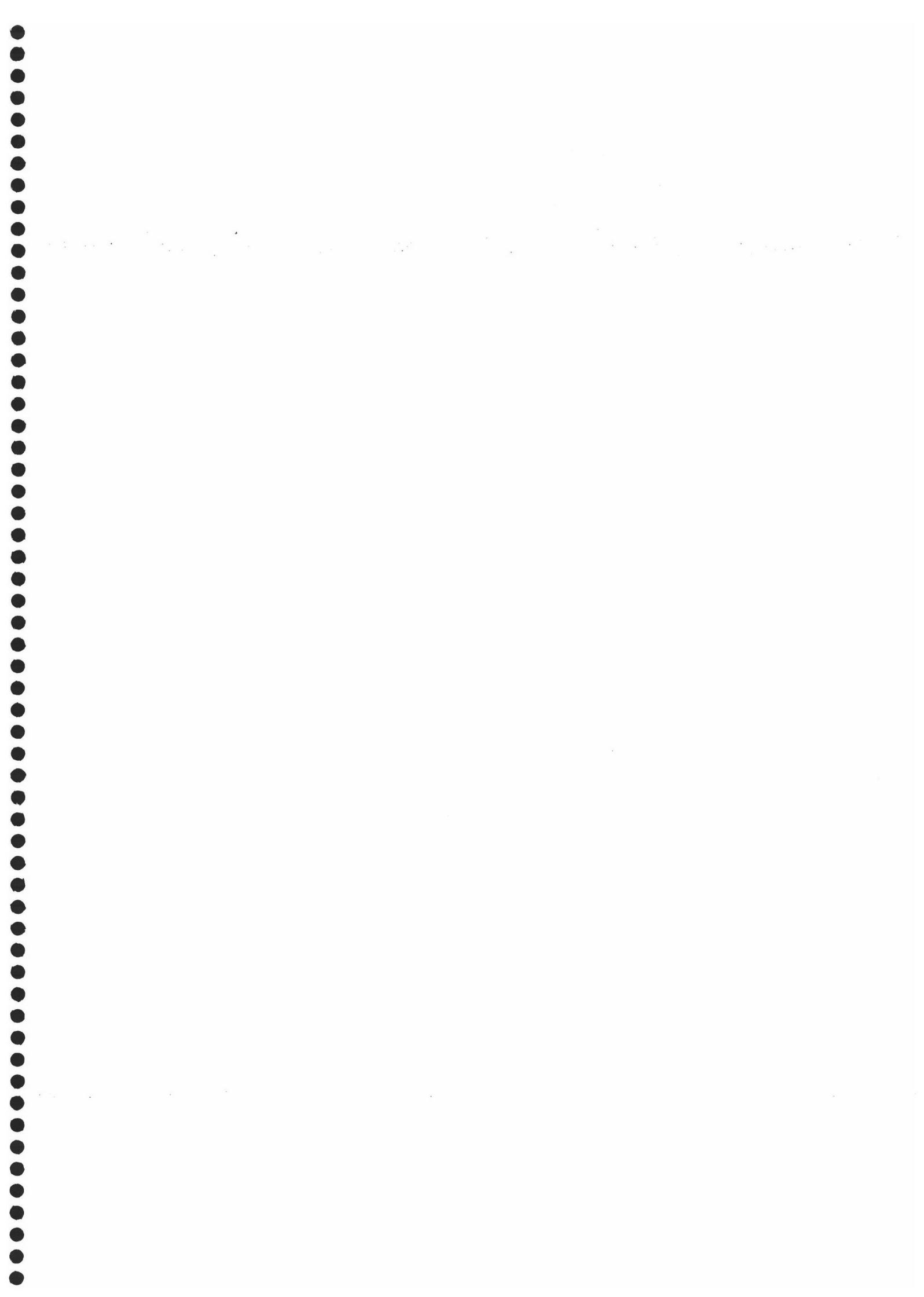
**S36A/D48G**

[urea](M)	ln k	[urea](M)	ln k
1.5402	2.1971	3.3884	1.3898
1.8485	2.5950	3.6964	1.2202
2.1562	2.4437	3.8504	0.99510
2.3105	2.2031	1.3860	3.0860
2.6182	2.0283	1.0781	3.0190
2.9263	1.8181	1.6943	2.8933
3.0803	1.6960	1.2321	1.9493
3.3884	1.3898	3.5424	1.2545
3.6964	1.2202	7.3564	-1.3243
3.8504	0.99510	7.5404	-1.3863
1.3860	3.0860	7.1728	-1.2310
1.0781	3.0190	6.8049	-1.0051
1.6943	2.8933	7.9081	-1.5141
1.2321	1.9493	6.4367	-0.82782
3.5424	1.2545	6.9885	-1.1489
7.3564	-1.3243	6.0692	-0.61619
7.5404	-1.3863	5.5172	-0.31061
7.1728	-1.2310	8.2760	-1.5799
6.8049	-1.0051	8.0946	-1.5654
7.9081	-1.5141	8.4603	-1.6045
6.4367	-0.82782	8.6424	-1.6555
6.9885	-1.1489	8.8189	-1.7037
6.0692	-0.61619	6.4581	-0.75502
5.5172	-0.31061	5.9739	-0.59966
8.2760	-1.5799	6.1351	-0.63866
8.0946	-1.5654	6.6196	-0.90387
8.4603	-1.6045	5.4893	-0.28369
8.6424	-1.6555	5.1665	0.099845
8.8189	-1.7037	6.9424	-1.1648
6.4581	-0.75502	5.6507	-0.31608
5.9739	-0.59966	7.2661	-1.3130
6.1351	-0.63866	7.5870	-1.4065
6.6196	-0.90387		
5.4893	-0.28369		
5.1665	0.099845		
6.9424	-1.1648		
5.6507	-0.31608		
7.2661	-1.3130		
7.5870	-1.4065		
1.5402	2.1971		
1.8485	2.5950		
2.1562	2.4437		
2.3105	2.2031		
2.6182	2.0283		
2.9263	1.8181		
3.0803	1.6960		





## **BIBLIOGRAFÍA**



## 8. BIBLIOGRAFÍA

A

- Abkevich, V.I., Gutin, A.M. & Shakhnovich, E.I. (1994) *Biochemistry* **33**, 10026-10036.
- Abriouel, H., Valdivia, E., Gálvez, A. & Maqueda, M. (2001) *Curr. Microbiol.* **42**, 89-95.
- Abriouel, H., Valdivia, E., Gálvez, A. & Maqueda, M. (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4623-4626.
- Andersson, M., Curstedt, T., Jörnvall, H. & Johansson, J. (1995) *FEBS Lett.* **362**, 328-332.
- Argos, P. (1988) *Protein Engng.* **2**, 101-103.
- Ausubel, F.M., Brent, R. Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1992) *Short protocols in molecular biology*. Wiley & Sons, New York
- Azuaga, A.I. (1995) Tesis doctoral, Universidad de Granada.
- Azuaga, A.I., Conejero-Lara, F., Rivas, G., de Filippis, V., Fontana, A. & Mateo, P.L. (1995) *Biochem. Biophys. Acta* **1252**, 95-102.
- Azuaga, A.I., Galisteo, M.L., Mayorga, O.L., Cortijo, M. & Mateo, P.L. (1992) *FEBS Lett.* **309**, 258-260.
- Azuaga, A.I., Woodruff, N., Conejero-Lara, F., Cox, V.F., Smith, R.A.G. & Dobson, C.M. (1999) *Protein Science* **8**, 443-446.

B

- Bach, D. & Chapman, D. (1980) "Biological Microcalorimetry" (Beezer, A.E., Ed.). 265, Academic Press, London.
- Baker, D. (2000) *Nature* **405**, 39-42.
- Barilá, D. & Superti-Furga, G. (1998) *Nature Gen.* **18**, 280-282.
- Bar-Sagi, D., Rotin, D., Batzer, A., Mandiyan, A. & Schlessinger, J. (1993) *Cell* **74**, 83-91.
- Beasty, A.M., Hurle, M.R., Manz, J.T., Stackhouse, T., Onuffer, J.J. & Matthews, C.R. (1986) *Biochemistry* **25**, 2965-2974.
- Becktel, W.J. & Schellman, J.A. (1987) *Biopolimers* **26**, 1859-1877.
- Blanco, F.J., Ortiz, A.R. & Serrano, L. (1997) *J. Biomol. NMR.* **9**, 347-357.
- Blond, A., Péduzzi, J., Goulard, C., Chiuchiolo, M.J., Barthélémy, M., Prigent, Y., Salomón, R.A., Farias, R.N., Moreno, F. & Rebuffat, S. (1999) *Wur. J. Biochem.* **259**, 747-755.
- Booker, G.W., Gout, I., Downing, A.K., Driscoll, P.C., Boyd J., Waterfield, M.D. & Campbell, I.D. (1993) *Cell* **73**, 813-822.
- Bown, M.T. & Cooper, J.A. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1287**, 121-149.
- Brahms, S. & Brahms, J. (1980) *J. Mol. Biol.* **138**, 149-178.

Brand, L. & Witholt, B. (1967) *Methods in enzymology* (Hirs, C.H.W. and Timasheff, S.N. ed.) Academic Press, New York .11, 748

Brandts, J.F. (1964) *J.Am.Chem. Soc.* **86**, 4291-4301.

Breslauer, K.J., Terrin, B. & Sturtevant, J.M. (1974) *J. Phys. Chem.* **78**, 2363.

Brock, T.D. (1974) *Biology of Microorganisms* (Prentice Hall. Englewood Cliffs, NJ), 2<sup>nd</sup> Ed.

Burton, R.E., Huang, G.S., Daugherty, M.A., Calderone, T.F. & Oas, G.T. (1998) *Nature Struct. Biol.* **4**, 305-310.

## C

Camarero J.A. & Muir, T.W. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 5597-5598.

Camarero, J.A., Fushman, D., Sato, S., Giriat, I., Cowburn, D., Raleigh, D.P. & Muir, T.W. (2001) *J. Mol. Biol.* **308**, 1045-1062.

Cantley, L.C., Auger, K.R., Carpenter, C., Duckworth, B., Grazini, A., Kapler, R. & Soltoff, S. (1991) *Cell* **64**, 281-302.

Cantor, C. & Schimmel, P.R. (1980) *Biophysical chemistry vol II*. Freeman, W.H. San Francisco.

Catanzano, F., Graciano, G., Fusi, P., Tortora, P. & Barone, G. (1998) *Biochemistry* **37**, 10493-10498.

Chan, C.K., Hu, Y., Takahashi, S., Rousseau, D.L., Eaton, W. & Hofrichter, J. (1996) *Biophys. J.*, **70**, A177.

Chant, J., Corrado, K., Pringle, J.R. & Herskowitz, I. (1991) *Cell* **65**, 1213-1224.

Chen, B.L. & Schellman, J.A. (1989b) *Biochemistry* **28**, 685-691.

Chen, B.L., Baase, W.A. & Schellman, J.A. (1989a) *Biochemistry* **28**, 691-699.

Chen, B.L., Baase, W.A. Nicholson, H. & Schellman, J.A. (1992) *Biochemistry* **31**, 1464-1476.

Chen, Y.H. & Yang, J.T. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **44**, 1285-1291.

Chenevert, J., Corrado, K., Bender, A., Pringle, J. & Herskowitz, I. (1992) *Nature* **356**, 77-79.

Chothia, C. (1976) *J.Mol. Biol.* **105**, 1-14.

Chowdy & Cole, (1989) *Trends in Biotechnology* **7**, 11-18.

Cichetti, P., Mayer, B.J., Thiel, G. & Baltimore, D. (1992) *Science* **257**, 803-806.

Coligan, J.E., Dunn, B.M., Ploegh, H.L., Speicher, D.W. & Wingfield, P.T. (eds) (1997) *Current protocols in protein science*, cap 11. John Wiley & Sons, Inc.

Compton, L.A. & Johnson W.C.Jr. (1986) *Anal Biochem.* **155**, 155-167.

- Conejero-Lara, F. & Mateo, P.L. (1996) *Biochemistry* **35**, 3477-3486.
- Conejero-Lara, F. (1993) Tesis doctoral, Universidad de Granada.
- Cooper, A. & Jhonson, C.M. (1994a) *Methods in Molecular Biology* **22**, 109-124.
- Cooper, A. & Jhonson, C.M. (1994b) *Methods in Molecular Biology* **22**, 125-136.
- Cotton, G.J. & Muir, T.W. (1999) *Chem. Biol.* **6**, R247-R256.
- Creighton, T.E. (1986) *Methods Enzymol.* **131**, 156-172.
- Creighton, T.E. (1993) *Proteins-structures and molecular properties*. W.H.Freeman and Company, New York. 2nd Ed.

**D**

- Davis, B.J. (1964) *Annals. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 404.
- Dec, S.F. & Gill, S.J. (1984) *J. Solution. Chem.* **13**, 27.
- Dec, S.F. & Gill, S.J. (1985) *J. Solution. Chem.* **14**, 417.
- Delgado, M.A., Solbiati, J.O., Chiuchiolo, M.J., Farias, R.N. & Salomón, R.A. (1999) *J. Bacteriol.* **181**, 1968-1970.
- Dill, K.A. & Chan, S. (1998) *Nature Struct. Biol.* **4**, -10-19.
- Dill, K.A. & Shortle, D. (1991) *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 795-825.
- Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T. & MacKinnon, R. (1998) *Science* **280**, 69-77.
- Drubin, D.G., Miller, K.G. & Botstein, D. (1988) *J. Cell. Biol.* **107**, 2551-2561.
- Drubin, D.G., Mulholland, D., Zhu, Z. & Botstein, D. (1990) *Nature* **343**, 288-290.
- Duddeck, H. (1995) *Gunther Sntzke. Liebigs Annalen* **6**: I-XIII.

**E**

- Edelhoch, H. (1967) *Biochemistry* **6**, 1948-1954.
- Eftink, Maurice R. & Shastry, C.R. (1997) *Methods Enzymol.* **278**, 258-286.
- Eftink, Maurice R. (1991) *Methods in biochemical analysis* (Suelter C.H. ed.) Wiley, J. New York **35**, 127.
- Eftink, Maurice R. (1994) *Biophysical J.* **66**, 482.
- Eisenbrandt, R., Kalkum, M., Lai, E.M., Lurz, R., Kado, C.I. & Lanka, E. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 22548-22555.
- Englander, S.W. & Mayne, L. (1992) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**, 243.
- Evans, T.C. Jr., Martin, D., Kolly, R., Panne, D., Sun, L., Ghosh, I., Chen, L., Benner, J., Liu, X.Q. & Xu, M.Q. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 9091-9094.
- Evans, T.C., Benner, J. & Xu, M.Q. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 18359-18381.

## **F**

- Feng, S., Chen, J.K., Yu, H., Simon, J.A. & Schreiber, S.L. (1994) *Science* **266**, 1241-1247.
- Fernández, A.M. (2000) Tesis doctoral, Universidad de Granada.
- Fersht, A.R. (1993) *FEBS Lett.* **325**, 5.
- Fersht, A.R. (1994a) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 79.
- Fersht, A.R. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 79-84.
- Fersht, A.R. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 1525-1529.
- Fersht, A.R., Itzhaki, L.S., ElMasry, N., Matthews, J.M. & Otzen, D. (1994b) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 10426-10429.
- Fersht, A.R., Matouschek, A. & Serrano, L. (1992) *J. Mol. Biol.* **224**, 771.
- Filimonov, V.V., Azuaga, A.I., Viguera, A.R., Serrano, L., & Mateo, P.L. (1999) *Biophys. Chem.* **77**, 195-208.
- Filimonov, V.V., Prieto, J., Martínez, J.C., Bruix, M., Mateo, P.L. & Serrano, L., (1993) *Biochemistry* **32**, 12906-12921.
- Fisinger, S., Serrano, L. & Lacroix, E. (2001) *Prot. Sci.* **10**, 809-818.
- Flory, P.J. (1956) *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 5222.
- Freire, E., van Osdol, W.W., Mayorga, O.L. & Sánchez-Ruiz, J.M. (1990) *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **19**, 159-188.

## **G**

- Gálvez, A. (1987) Tesis doctoral. Universidad de Granada.
- Gálvez, A., Giménez-Gallego, G., Maqueda, M. & Valdivia, E. (1989a) *Antimicrob. Agents Chemoter.* **33**, 437-441.
- Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M. & Valdivia, E. (1991) *J. Bacteriol.* **173**, 886-892.
- Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M. & Valdivia, E. (1989b) *Res. Microbiol.* **140**, 57-68.
- Gálvez, A., Maqueda, M., Valdivia, E., Quesada, A. & Montoya, E. (1986) *Can. J. Microbiol.* **32**, 765-771.
- Gálvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M. & Montoya, E. (1985) *Microbios.* **43**, 223-232.
- Gálvez, A., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M. & Maqueda, M. (1989c) *Antimicrob. Agents. Chemother.* **33**, 641-645.
- Gálvez, A., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M. & Maqueda, M. (1989d) *Can. J. Microbiol.* **35**, 318-321.

- García-Mira, M. (2001) Tesis doctoral, Universidad de Granada.
- Gill, S.C. & von Hippel, P.H. (1989) *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
- Gill, S.J. & Wadsö, I. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 2955.
- Goldenberg, D.P. & Creighton, T.E. (1983) *J.Mol. Biol.* **165**, 407-413.
- Goldenberg, D.P. & Creighton, T.E. (1984) *J.Mol. Biol.* **179**, 527.
- Goldenberg, D.P. (1985) *J.Cell. Biochem.* **29**, 321-335.
- Gómez, J. & Freire, E. (1995) *J. Mol. Biol.* **252**, 337-350.
- González, C., Langdom, G.M., Bruix, M., Valdivia, E., Maqueda, M. & Rico, M. (2000) *Proc. Acad. Sci. USA* **97**, 11221-11226.
- Gordon, D.B., Marchall, S.A. & Mayo, S.L. (1999) *Curr. Op. Struct. Biol.* **9**, 509-513
- Gorina, S. & Pavletich, N.P. (1996) *Science* **274**, 1001-1005.
- Grantcharova, V.P. & Baker, D. (2001) *J. Mol. Biol.* **306**, 555-563.
- Griko, Y.V. & Privalov, P.L. (1992) *Biochemistry* **31**, 8810-8815.
- Griko, Y.V., Privalov, P.L., Sturtevant, J.M., Venyamov, S.Y. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 3343-3347.
- Griko, Y.V., Venyamov, S.Y. & Privalov, P.L. (1989) *FEBS Lett.* **244**, 276-278.
- Gronenborn, A.M., Filpula, D.R., Essig, N.Z., Acahri, A., Whitlow, M., Wingfield, P.T. & Clore, G.M. (1991) *Science* **253**, 657.
- Grutter, M.G., Hawkes, R.B. & Matthews, B.W. (1979) *Nature* **277**, 667-669.

## **H**

- Häckel, M., Hinz, H-J. & Hedwig, G. (1999) *J. Mol. Biol.* **291**, 197-213.
- Hagel, P., Gerding, J.J.T., Fieggen, W. & Bloemendal, H. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* **243**, 366.
- Hagiara, Y., Aimoto, S., Fink, A.L. & Goto, Y. (1993) *J. Mol. Biol.* **231**, 180-184.
- Hammond, G.S. (1955) *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 334-338.
- Heinemann, U. & Hahn, M. (1995) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **64**, 121-143.
- Hu, C.Q., Sturtevant, J.M., Thomson, J.A., Erickson, R.E. & Pace, C.N. (1992) *Biochemistry* **31**, 4876-4882.
- Huang, G.S. & Oas, T.G. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6878-6882.
- Hurle, M.R., Michelotti, G.A., Crisanti, M.M., & Matthews, C.R. (1987) *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **2**, 54-63.

## **I**

- Ibarra-Molero, B. & Sánchez-Ruiz, J.M. (1996) *Biochemistry* **35**, 14689-14702.

Ibarra-Molero, B. (1998) Tesis doctoral, Universidad de Granada.

Ibarra-Molero, B., Loladze, V.V., Makhatadze, G.I. & Sánchez-Ruiz, J.M. (1999b) *Biochemistry* **38**, 8138-8149.

Ibarra-Molero, B., Makhatadze, G.I. & Sánchez-Ruiz, J.M. (1999a) *Biochem. Biophys. Acta* **1429**, 384-390.

Itzhaki, L.S., Otzen, D.E. & Fersht, A.R. (1995) *J. Mol. Biol.* **254**, 260-288.

Iwai, H. & Pluckthum, A. (1999) *FEBS Lett.* **459**, 166-172.

## **J**

Jack, R.W., Tagg, J.R. & Ray, B. (1995) *Microbiol. Rev.* **59**, 171-200.

Jackson, S.E. & Fersht, A.R. (1991) *Biochemistry* **30**, 10428-10435.

Jackson, S.E. & Fersht, A.R. (1991) *Biochemistry* **30**, 10443.

Johnson, C.M. & Fersht, A.R. (1995) *Biochemistry* **34**, 6795-6804.

Johnson, R.E., Adams, P. & Rupley, J.A. (1978) *Biochemistry* **17**, 1479.

Johnson, W.C., Jr. (1990) *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **7**, 205-214.

Jovin, T. (1975) "Biochemical Fluorescence: Concepts" (Chen, R. and Edelhoch, H. eds.) Dekker, Marcel, New York, 305.

## **K**

Kawai, Y., Saito, T., Suzuki, M. & Ithon, T. (1998) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 887-892.

Kawai, Y., Saito, T., Toba, T., Samant, S.K. & Ithon, T. (1994) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 1218-1221.

Khechinashvili, N.N., Janin, J. & Rodier, F. (1995) *Protein Sci.* **4**, 1315-1324.

Kim, P.S. & Baldwin, R.L. (1980) *Biochemistry* **19**, 6124.

Knapp, S., Karchikoff, A., Berndt, K.D., Christova, P., Atanasov, B. & Ladenstein, R. (1996) *J. Mol. Biol.* **264**, 1132-1144

Koch, C.A., Anderson, D., Moran, M.F., Ellis, C., & Pawson, T. (1991) *Science* **252**, 668-674.

Koradi, R., Billeter, M. & Wüthrich, K (1996) *J. Mol. Graphics* **14**, 29-32.

Kraulis, P.J. (1991) *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 946-950.

Kuriyan, J. & Cowburn, D. (1993) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 828-837.

## **L**

Lacroix, E. (1999) Tesis doctoral. European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg (Alemania).

- Laemmli, U.K. (1970) *Nature* **227**, 680-685.
- Laidler & King (1983) *J. Chem. Phys.* **87**, 2657.
- Lechuga, T. (1986) Tesis Doctoral, Universidad de Granada.
- Lee, B.K. & Richards, F.M. (1971) *J. Mol. Biol.* **55**, 379-400.
- Lehto, V.P., Wasenius, V.M. & Saraste, M. (1988) *Nature* **334**, 388.
- Lian, L.Y., Yang, J.C., Derrick, J.P., Sutcliffe, M.J., Roberts, G.C.K., Murphy, J.P., Goward, C.R. & Atkinson, T. (1991) *Biochemistry* **30**, 5335.
- Liepinsh, E., Andersson, M., Ruyschaert, J.M. & Otting, G. (1997) *Nat. Struct. Biol.* **4**, 793-795.
- Lim, W.A., Richards, F.M. & Fox, R.O. (1994) *Nature* **372**, 375-379.
- Lindqvist, Y. & Schneider, G. (1997) *Curr. Op. Struct. Biol.* **7**, 422-427.
- Livingstone, J.R., Spolar, R.S. & Record, M. T., Jr. (1991) *Biochemistry* **30**, 4237-4244.
- Loladze, V.V., Ibarra-Molero, B., Sánchez-Ruiz, J.M. & Makhatadze, G.I. (1999) *Biochemistry* **38**, 16419-16423.
- López-Hernández, E. & Serrano, L. (1996) *Folding & Design* **1**, 43-55.
- López-Mayorga, O. & Freire, E. (1987) *Biophys. Chem.* **87**, 87-96.
- López-Mayorga, O. (1983) Tesis Doctoral, Universidad de Granada.
- Luger, K., Hommel, U., Herold, M., Hofsteenge, J. & Kirschner, K. (1989) *Science* **243**, 206-210.
- M**
- Mabrey, S. & Sturtevant, J.M. (1978) *Methods Membr. Biol.* **9**, 237.
- Makhatadze, G.I. & Privalov, P.L. (1995) *Adv. Prot. Chem.* **47**, 307-425.
- Makhatadze, G.I. & Privalov, P.L. (1990) *J. Mol. Biol.* **213**, 357-384.
- Makhatadze, G.I. & Privalov, P.L. (1992) *J. Mol. Biol.* **226**, 491-505.
- Makhatadze, G.I. (1999) *J. Phys. Chem. B* **103**, 4781-4785.
- Makhatadze, G.I. Fernández, J. Freire, E., Liley, T.H. & Privalov, P.L. (1993) *J. Chem. Eng. Data* **38**, 83-87.
- Makhatadze, G.I., López, M.M., Richardson, J.M. & Thomas, S.T. (1998) *Protein Sci.* **7**, 689-697.
- Malakauskas, S.M. & Mayo, S.L. (1998) *Nature Struct. Biol.* **5**, 470-475.
- Manalavan, P. & Johnson, W.C.Jr. (1987) *Anal. Biochem.* **67**, 76-85.
- Marchesi, V.T. (1985) *Annu. Rev. Cell. Biol.* **1**, 531-561.
- Martínez, J.C. & Serrano, L. (1999) *Nature Struct. Biol.* **6**, 1010-1016.

- Martínez, J.C. (1995) Tesis doctoral, Universidad de Granada.
- Martínez, J.C., El Harrou, M., Filimonov, V.V, Mateo, P.L. & Fersht, A.R. (1994) *Biochemistry* **33**, 3919-3926.
- Martínez, J.C., Filimonov, V.V, Mateo, P.L., Schereiber, G. & Fersht, A.R. (1995) *Biochemistry* **34**, 5224-5233.
- Martínez, J.C., Pisabarro, M.T. & Serrano, L. (1998a) *Nature Struct. Biol.* **5**, 721-729.
- Martínez, J.C., Viguera, A.R., Berisio, R., Wilmanns, M., Mateo, P.L., Filimonov, V.V. & Serrano, L. (1999) *Biochemistry* **38**, 549-559.
- Martínez, J.C., Viguera, A.R., Serrano, L., Filimonov, V.V. & Mateo, P.L. (1998b) *React. Funct. Polymers* **36**, 221-225.
- Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., Gálvez, A., Samyn, B., van Beeumen, J., Coyette, J. & Valdivia, E. (1994) *J. Bacteriol.* **176**, 6334-6339.
- Mateo, P.L. (1984) "Thermochemistry and its applications to Chemical and Biochemical Systems" (Ribeiro de Silva, M.A.V., Ed.) pag. 541. Reidel, Holland.
- Matouschek, A. & Fersht, A.R. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 7814-7818.
- Matouschek, A., Serrano, L. & Fersht, A.R. (1992) *J. Mol. Biol.* **224**, 819.
- Matthews, C.R. & Hurler, M.R. (1987) *BioEssays* **6**, 254-257.
- Mayer, B.J., Hamaguchi, M. & Hanafusa, H. (1988) *Nature* **332**, 272-275.
- Mayr, L.M. & Schmid, F.X. (1993) *Biochemistry* **32**, 7994-7998.
- McCrary, B.S., Edmondson, S.P. & Shriver, J.W. (1996) *J. Mol. Biol.* **264**, 784-805
- Mendoza, F., Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M. & Valdivia, E. (1999) *Appli. Environ. Microbiol.* **65**, 618-625.
- Miteva, M., Andersson, M., Karshikoff, A. & Otting, G. (1999) *FEBS Lett.* **462**, 155-158.
- Morrissey, M.P. & Sakhnovich, E.I. (1996) *Fold. Des.* **1**, 391-405.
- Morton, C.J. & Campbell, I.D. (1994) *Curr. Biol.* **4**, 615-617.
- Mullis, K. & Faloona, F. (1987) *Meth. Enzymol.* **55**, 335-350.
- Murphy, K.P. & Freire, E. (1992) *Adv. Protein Chem.* **43**, 313-361.
- Murphy, K.P., & Gill, S.J. (1990) *Thermochim. Acta* **172**, 11-20.
- Murphy, K.P., Bhakuni, V., Xie, D. & Freire, E. (1992) *J. Mol. Biol.* **227**, 293-306.
- Murphy, K.P., Privalov, P.L., & Gill, S.J. (1990) *Science* **247**, 559-561.
- Musacchio, A., Gibson, T., Lehto, V.P. y Saraste, M. (1992a) *FEBS Lett* **307**, 55-61.
- Musacchio, A., Noble, M.E.M., Pautit, R., Wierenga, R. & Saraste, M. (1992b) *Nature* **359**, 851-855.

Musacchio, A., Saraste, M. & Wilmanns, M. (1994a) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1**, 546-551.

Musacchio, A., Saraste, M. & Wilmanns, M. (1994b) *Nat. Struct. Biol.* **1**, 546-551.

Myers, J.K., Pace, C.N. & Scholtz, J.M. (1995) *Protein Sci.* **4**, 2138-2148.

## N

Nakanishi, K., Berova, N. & Woody, R.W. (1994) *Circular Dichroism- Principles and Applications*, VCH Publishers Inc., New York.

Nguyen, J.T., Turck, C.W., Cohen, F.E., Zuckermann, R.N. & Lim, W.A. (1998). *Science* **282**, 2088-2092.

Nielsen, E.B. & Schellman, J.A. (1967) *J. Phys. Chem.* **71**, 2297-2304.

Nokazi, Y. (1972) *In Methods Enzymol.* Hirs, C. H. W. & Timasheff, S. N. (eds), Academic Press, New York, Vol. **26**, p. 43.

Noren, C.J., Wang, J.M. & Perler, F.B. (2000) *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**, 451-456.

## O

O'Neil, K.T., Hoess, R.H., Raleigh, D.P. & DeGrado, W.F. (1995) *Proteins Struct. Funct. Genet.* **21**, 11-21.

Oliveberg, M. (2001) *Curr. Op. Struct. Biol.* **11**, 94-100.

Onuchic, J.C., Socci, N.D., Luthey-Schulten, Z. & Wolynes, P.G. (1996) *Folding & Design* **1**, 441-450.

Ooi, T., Oobatake, M., Némethy, G., & Scheraga, H.A. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3086-3090.

Orban, J., Alexander, P. & Bryan, P. (1992) *Biochemistry* **31**, 3604.

Orstein, L. (1964) *Annals. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 321.

Otzen, D., Itzhaki, L.S., ElMasry, N., Jackson, S.E., & Fersht, A.R. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 10422.

## P

Pace, C.N. (1986) *Methods Enzymol.* **131**, 266-280.

Pace, C.N., Shirley, B.A. & Thomson, J.A. (1989) *in Protein Structure, a practical approach* (Creighton, T.E., Ed.) pp 311-330, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

Padmanabhan, S., Laurents, D.V., Fernández, A.M., Elias-Arnanz, M., Ruiz-Sanz, J., Mateo, P.L., Rico, M. & Filimonov, V.V. (1999) *Biochemistry* **38**, 15536-15547.

Parker, M.J., Spencer, J. & Clarke, A.R. (1995) *J.Mol.Biol.* **253**, 771-786.

Pawson, T. & Bernstein, A. (1990) *Trends Genet.* **6**, 350-356.

- Pawson, T. & Gish, G.D. (1992) *Cell* **71**, 359-362.
- Pawson, T. & Schlessinger, J. (1993) *Curr. Biol.* **3**, 434-442.
- Pawson, T. (1992) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 432-437.
- Pawson, T. (1995) *Nature* **373**, 573-580.
- Penzer, G.R. (1980) *An introduction to spectroscopy for biochemists* (Brown, S.B. ed.) Academic Press, London, 70.
- Peränen, J., Rikkonen, M., Hyvönen, M. & Kääriäinen, L. (1996) *Anal. Biochem.* **236**, 371-373.
- Perczel, A., Parck, K. & Fasman, G.D. (1992) *Anal. Biochem.* **203**, 83-93.
- Perl, D., Welker, C., Schindler, T., Schroder, K., Marahiel, M.A., Jaenicke, R. & Schmid, F.X. (1998) *Nat. Struct. Biol.* **5**, 229-235.
- Perry, K.M., Onuffer, J.J., Gittelman, M.S., Barmat, L. & Matthews, C.R. (1989) *Biochemistry* **28**, 7961-7968.
- Peterson, D.L. & Simpson, W.T. (1957) *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 2375-2382.
- Pisabarro, M.T., Ortiz, A.R., Serrano, L., Wade, R.C. (1994a) *Prot. Struct. Funct. Genet.* **20**, 203-215.
- Pisabarro, M.T., Ortiz, A.R., Viguera, A.R., Gago, F., Serrano, L. (1994b) *Prot. Eng.* **7**, 1455-1462.
- Pisabarro, M.T., Serrano, L. (1996) *Biochemistry* **35**, 10634-10640.
- Pisabarro, M.T., Serrano, L., Wilmanns, M. (1998) *J. Mol. Biol.* **281**, 513-521.
- Plaxco, K.W., Guijarro, J. I., Morton, C.J., Pitkeathly, M., Campbell, I.D. & Dobson, C.M. (1998a) *Biochemistry* **37**, 2529-2537.
- Plaxco, K.W., Kim, T.S. & Baker, D. (1998b) *J. Mol. Biol.* **277**, 958-994.
- Plaza del Pino, I.M., Pace, C.N. & Freire, E. (1992) *Biochemistry* **31**, 11196-11202.
- Plotnikov, V.V., Brandts, J.M., Lin, L.N. & Brandts, J.F. (1997) *Analytical Biochemistry* **250**, 237-244.
- Prieto, J., Wilmanns, M., Jiménez, M.A., Rico, M. & Serrano, L. (1997) *J. Mol. Biol.* **268**, 760.
- Privalov, G., Kavina, V., Freire, E. & Privalov, P.L. (1995) *Anal. Biochem.* **232**, 79-85.
- Privalov, P.L. & Makhatadze, G.I. (1990) *J. Mol. Biol.* **213**, 385-391.
- Privalov, P.L. & Filimonov, V.V. (1978) *J. Mol. Biol.* **122**, 447.
- Privalov, P.L. & Gill, S.J. (1988) *Adv. Protein Chem.* **39**, 191-234.
- Privalov, P.L. & Khechinashvili, N.N. (1974) *J. Mol. Biol.* **86**, 665-684.

- Privalov, P.L. & Potekhin, S.A. (1986) *Methods Enzymol.* **131**, 4-51.
- Privalov, P.L. (1979) *Adv. Prot. Chem.* **33**, 167-241.
- Privalov, P.L. (1980) *Pure Appl. Chem.* **52**, 479-497.
- Privalov, P.L. (1982) *Adv. Prot. Chem.* **35**, 1-104.
- Privalov, P.L. (1989) *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **18**, 47-69.
- Privalov, P.L., Griko, Y.V., Venyamov, S.Y., & Kutysenko, V.P. (1986) *J. Mol. Biol.* **190**, 487-498.
- Privalov, P.L., Tiktopoulo, E.I., Venyaminov, S.Y. Grico, Y.V., Makhatadze, G.I. & Khechinashvili, N.N. (1989) *J. Mol. Biol.* **205**, 737-750.
- Provencher, S.W. & Glöckner, J. (1981) *Biochemistry* **20**, 33-37.

**R**

- Rabilloud, T., Girardot, V., & Lawrence, J.J. (1996) *Electrophoresis*, **17**, 67.
- Regan, L. (1999) *Curr. Op. Struct. Biol.* **9**, 494-499.
- Ren, R., Mayer, B.J., Cichetti, P. & Baltimore, D. (1993) *Science* **259**, 1157-1161.
- Roder, H. Elove, G.A. & Englander, S.W. (1988) *Nature (London)* **335**, 700.
- Ruiz-Sanz, J. (1990) Tesis doctoral, Universidad de Granada.
- Ruiz-Sanz, J., Simoncsits, A., Törö, I., Pongor, S., Mateo, P.L. & Filimonov, V.V. (1999) *Eur. J. Biochem.* **263**, 246-253.
- Ruiz-Sanz, J., Simoncsits, A., Törö, I., Pongor, S., Mateo, P.L. & Filimonov, V.V. (1999) *Eur. J. Biochem.* **263**, 246-253.

**S**

- Sadqi, M. (2000) Tesis doctoral, Universidad de Granada.
- Sadqi, M., Casares, S., Abril, M.A., López-Mayorga, O., Conejero-Lara, F. & Freire, E. (1999) *Biochemistry* **38**, 8899-8906.
- Samyn, B., Martínez-Bueno, M., Devreese, B., Maqueda, M, Gálvez, A., Valdivia, E., Coyette, J. & van Beeumen, J. (1994) *FEBS Lett.* **352**, 87-90.
- Sánchez-Ruiz, J.M. & Mateo, P.L. (1987) *Cell. Biol. Rev.* **11**, 15-45.
- Sánchez-Ruiz, J.M. (1995) *Subcellular Biochemistry*, vol **24**, *Proteins: Structure, Function and Engineering* (Biswas, B.B., and Roy, S., Eds) pp 133-176, Plenum Press, New York.
- Santoro, M.M. & Bolen, D.W. (1992) *Biochemistry* **31**, 4901-4907.
- Schelessinger, J. (1994) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**, 25-30.
- Schellman, J.A. (1955) *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsburg Ser. Chim.* **29**, 230.
- Schellman, J.A. (1987) *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **16**, 115-137.

- Scheraga, H.A., Denton, M.E., Konishi, Y. & Lin, S.H. (1984) *Biochemistry* **23**, 5504.
- Serrano, L., Matouschek, A. & Fersht, A.R. (1992) *J. Mol. Biol.* **224**, 805.
- Shoichet, B.K., Baase, W.A., Kuroki, R. & Matthews, B.W. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 452-456.
- Shortle, D., Meeker, A.K. & Freire, E. (1988) *Biochemistry*, **27**, 4761-4768.
- Sicheri, F., Moraefi, I. & Kuriyan, J. (1997) *Nature* **385**, 602-609.
- Smith, J.S. & Scholtz, J.M. (1996) *Biochemistry* **35**, 7292-7297.
- Speicher, D.W. (1986) *J. Cell. Biochem.* **30**, 245-258.
- Spolar, R.S., Livingstone, J.R. & Record, M. T., Jr. (1992) *Biochemistry* **31**, 3947-3955.
- Stahl, M.L., Ferez, C.R., Kelleher, K.L.O., Kriz, R.W. & Knopf, J.L. (1988) *Nature* **332**, 269-272.
- Stark, G.R. (1965) *Biochemistry* **4**, 1030.
- Stokes, R.H. (1967) *Aust. J. Chem.* **20**, 2087-2100.
- Sturtevant, J.M. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 2236-2240.
- Sturtevant, J.M. (1987) *Annu. Rev. Phys. Chem.* **38**, 463-488.

## T

- Tagg, J.R. (1992) Lazdunski, R.J.C., Pattus (ed) pg. 33-36. Bacteriocins, microcins & lantibiotics. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- Tamura, A., Kimura, K., Takahara, H., & Akasaka, K. (1991) *Biochemistry* **30**, 11307-11313.
- Tandford, C. (1968) *Adv. Prot. Chem.* **23**, 121-275.
- Tandford, C. (1973) "*The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Living Membranes*" Wiley (Interscience), New York.
- Ternström, T., Mayor, U., Akke, M. & Oliveverg, M. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 14854-14859.

## U

- Udgaonkar, J.B. & Baldwin, R.L. (1988) *Nature (London)* **335**, 694.
- Ullrich, A. & Schlessinger, J. (1990) *J. Cell* **61**, 203-212.
- Uversky, V.N. (1993) *Biochemistry* **32**, 13288-13298.

## V

- Van Nuland, N.A.J., Meijberg, W., Warner, J., Forge, V., Scheek, R.M., Robillard, G.T. & Dobson, C.M. (1998) *Biochemistry* **37**, 662-637.
- Ventura, S., Vega, M.C., Lacroix, E. & Serrano, L. (2001b) *Nature Struct. Biol.*, en prensa.

- Ventura, S., Vega, M.C., Lacroix, E., Spagnolo, L., Angrand, I. & Serrano, L. (2001a) enviado a *Nature Struct. Biol.*
- Vidugiris, G.J.A., Markley, J.L., & Royer, C.A. (1995) *Biochemistry* **34**, 4909.
- Viguera, A.R. & Serrano, L. (1997) *Nature Struct. Biol.* **4**, 939-946.
- Viguera, A.R., Arrondo, J.L., Musacchio, A., Saraste, M. & Serrano, L. (1994a) *Biochemistry* **33**, 10925-10933.
- Viguera, A.R., Blanco, F.J. & Serrano, L. (1995) *J. Mol. Biol.* **247**, 670-681.
- Viguera, A.R., Jiménez, M.A., Rico, M. & Serrano, L. (1996c) *J. Mol. Biol.* **255**, 507-521.
- Viguera, A.R., Martínez, J.C., Filimonov, V.V., Mateo, P.L. & Serrano, L. (1994b) *Biochemistry* **33**, 2142-2150.
- Viguera, A.R., Villegas, V., Avilés, F.X. & Serrano, L. (1996a) *Fold. Des.* **2**, 23-33.
- Viguera, A.R., Wilmanns, M. & Serrano, L. (1996b) *Nature Struct. Biol.* **3**, 874-880.
- Villegas, V., Viguera, A.R., Avilés, F.X. & Serrano, L. (1996) *Fold. Des.* **1**, 29-34.

## W

- Warren, J.R. & Gordon, J.A. (1966) *J. Phys. Chem.* **67**, 1524.
- Wintrode, P.L., Makhatadze, G.I. & Privalov, P.L. (1994) *Proteins Struct. Funct. Eng.* **18**, 246-253.
- Wittekind, M., Mapelli, C., Farmer, B., Suen, K.L., Goldfarb, V., Tsao, J., Lavoie, T., Barbacid, M., Meyers, C.A & Mueller, L. (1994) *Biochemistry* **33**, 13531-13539.

## X

- Xu, W., Harrison, S.C. & Eck, M.J. (1997) *Nature* **385**, 595-602.

## Y

- Yamada, H., Kuroki, R., Hirata, M. & Imoto, T. (1983) *Biochemistry* **22**, 4551.
- Yao, M. & Bolen, D.W. (1995) *Biochemistry* **34**, 3771-3781.
- Ybe, J.A., Brodsky, F.M., Hofmann, K., Lin, K., Liu, S.H., Chen, L., Earnest, T.N., Fletterick, R.J. & Hwang, P.K. (1999) *Nature (London)* **399**, 371-375.
- Yi, Q. & Baker, D. (1996) *Protein Science* **5**, 1060-1066.
- Yu, H., Chen, J.K., Feng, S., Dalgarno, D.C., Brauer, A.W. & Schreiber, S.L. (1994) *Cell* **76**, 933-945.



Biblioteca Universitaria de Granada



01037527