

T 9-21

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha <u>25/9/03</u>
ENTRADA NUM. <u>2790</u>



BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento <u>61492574</u>
N.º Copia <u>16264381</u>

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA

ANÁLISIS DE LAS RUTAS COOPERATIVAS DE PROPAGACIÓN DE ESTABILIDAD EN EL DOMINIO SH3. APLICACIÓN AL ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES PROTEÍNA-LIGANDO.

Salvador Casares Atienza

Tesis Doctoral
GRANADA
2003
 UNIVERSIDAD DE GRANADA

UNIVERSIDAD DE GRANADA
00 000 000
COMISION DE DOCTORADO

FACILTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA

**Memoria presentada para aspirar al grado
de Doctor en Ciencias Químicas**



Fdo: **Salvador Casares Atienza**

Licenciado en Bioquímica
por la Universidad de Granada

Visado en Granada, a 8 de septiembre de 2003

VºBº
DIRECTORES DE LA TESIS



Fdo: **Obdulio López Mayorga**
Catedrático de Química Física
de la Universidad de Granada



Fdo: **Francisco Conejero Lara**
Profesor Titular de Química Física
de la Universidad de Granada



*A mis padres,
a mi familia,
a mi tía M^a Teresa.*



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Diseño molecular.

1.2. Dominios modulares de reconocimiento molecular.

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.

2.1. Dominios SH3 y procesos de reconocimiento molecular.

2.2. El dominio SH3.

2.2.1. Función biológica.

2.2.2. Estructura, plegamiento y estabilidad del dominio SH3.

2.2.3. Unión de ligandos al dominio SH3. Importancia biológica.

2.2.4. Diseño de ligandos del dominio SH3.

2.2.4.1. Estrategias clásicas.

2.2.4.2. Diseño basado en consideraciones termodinámico-estructurales y dinámicas.

2.3. Estudios de Intercambio Hidrógeno-Deuterio para caracterizar los procesos de reconocimiento molecular.

3. OBJETIVOS.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. Materiales y Reactivos.

4.1.1. Sistemas biológicos.

4.1.2. Reactivos.

4.1.3. Instrumentación.

4.2. Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB).

4.2.1. Introducción a la calorimetría diferencial de barrido.

4.2.2. El calorímetro diferencial de barrido.

4.2.3. Realización del experimento calorimétrico.

4.2.3.1. Cálculo de la capacidad calorífica molar parcial de la proteína.

4.2.3.2. Análisis de las trazas calorimétricas.

4.2.3.2.1. Modelo de equilibrio de dos estados.

4.2.3.2.2. Ajuste de las curvas de capacidad calorífica molar parcial.

4.3. Calorimetría Isotérmica de Titulación (CIT).

- 4.3.1. Introducción a la calorimetría isotérmica de titulación.
- 4.3.2. Instrumentación.
- 4.3.3. Formulación general y análisis de un experimento de CIT.

4.4. Espectroscopía de Fluorescencia.

- 4.4.1. Introducción a la espectroscopía de fluorescencia.
- 4.4.2. Empleo de la espectroscopía de fluorescencia para el estudio de los procesos de asociación proteína-ligando.
- 4.4.3. Experimentos de titulación de SH3-Spc con p41. Metodología.
 - 4.4.3.1. Titulaciones por adición de volúmenes variables.
 - 4.4.3.2. Titulaciones con disoluciones independientes.

4.5. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

- 4.5.1. Introducción a la RMN.
- 4.5.2. El fenómeno: breves fundamentos de la RMN.
- 4.5.3. La señal de RMN. Atenuación libre de la inducción (FID).
- 4.5.4. El desplazamiento químico (δ).
- 4.5.5. Acoplamiento escalar.
- 4.5.6. El efecto nuclear Overhauser (NOE).
- 4.5.7. La resonancia magnética nuclear bidimensional (RMN-2D).
 - 4.5.7.1. Experimentos bidimensionales de correlación escalar: COSY (COrelated SpectroscopY) y TOCSY (Total COrelation SpectroscopY).
 - 4.5.7.2. Experimentos bidimensionales de correlación bipolar: NOESY ("Nuclear Overhauser Effect" SpectroscopY) y ROESY (Rotating frame "Overhauser Effect" SpectroscopY).
- 4.5.8. RMN de protones (^1H -RMN) de proteínas.
 - 4.5.8.1. ^1H -RMN de aminoácidos.
 - 4.5.8.2. ^1H -RMN de proteínas.
- 4.5.9. Adquisición de los espectros de RMN.
 - 4.5.9.1. Parámetros de adquisición de los espectros.
 - 4.5.9.2. Procesado de los espectros de RMN.
 - 4.5.9.3. Reasignación de la "huella dactilar" de los espectros de RMN.

4.6. Intercambio Hidrógeno-Deuterio (IHD).

- 4.6.1. El fenómeno del IHD.
 - 4.6.1.1. Introducción al fenómeno del IHD.
 - 4.6.1.2. El intercambio intrínseco en las cadenas polipeptídicas. Concepto de factor de protección.
 - 4.6.1.3. Estudios de IHD en proteínas.
- 4.6.2. Mecanismos de IHD en proteínas nativas.
 - 4.6.2.1. Modelo de dos procesos.
 - 4.6.2.2. Proceso de baja energía de activación. El modelo de “penetración” frente al de “desplegamiento local”.
 - 4.6.2.3. Generalización termodinámico-estadística del modelo de despliegamiento.
- 4.6.3. Procedimiento experimental.
 - 4.6.3.1. Realización del experimento de intercambio.
 - 4.6.3.2. Obtención de los factores de protección.

4.7. Clonación de mutantes del dominio SH3-Spc.

- 4.7.1. Introducción.
- 4.7.2. Glosario de definiciones y conceptos básicos en ingeniería genética.
- 4.7.3. Reacción de la Polimerasa en Cadena (RCP).
 - 4.7.3.1. Introducción.
 - 4.7.3.2. Puesta en práctica del método de la RCP.
- 4.7.4. Mutagénesis dirigida. Diseño e introducción de mutaciones en fragmentos de ADN.
- 4.7.5. Restricción de los productos de la RCP.
- 4.7.6. Ligación del inserto al vector de expresión.
- 4.7.7. Transformación de la célula huésped: introducción del plásmido en el organismo de expresión.
- 4.7.8. Controles de la capacidad de expresión.
- 4.7.9. Obtención del plásmido mutante puro.
- 4.7.10. Secuenciación del plásmido.

4.8. Expresión y purificación de las diferentes variantes del dominio SH3 de α -espectrina.

- 4.8.1. Expresión del dominio SH3-Spc.
- 4.8.2. Extracción del crudo de proteínas.
- 4.8.3. Purificación de las diferentes variantes del dominio SH3-Spc por cromatografía de exclusión molecular.
- 4.8.4. Renaturalización y conservación de las distintas variantes del dominio SH3-Spc purificadas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1. Transmisión de cooperatividad por efecto de mutaciones puntuales.

- 5.1.1. Diseño y obtención de las variantes del dominio SH3-Spc.
- 5.1.2. Determinación de las magnitudes termodinámicas de la estabilidad global del dominio por calorimetría diferencial de barrido (CDB).
- 5.1.3. Reasignación de los espectros de RMN de los mutantes del dominio SH3-Spc. Efectos en los desplazamientos químicos producidos por las mutaciones.
- 5.1.4. Análisis del efecto de las mutaciones sobre el intercambio hidrógeno-deuterio.
 - 5.1.4.1. Estabilidad Termodinámica Local de los dominios. Valores de ΔG_{ap} .
 - 5.1.4.2. Efectos de las mutaciones. Cambios en el ΔG_{ap} ($\Delta\Delta G_{ap}$).
- 5.1.5. Determinación y cálculos basados en las estructuras del dominio SH3 natural y de los mutantes en posición 47 y 56.
 - 5.1.5.1. Determinación de las estructuras de los mutantes.
 - 5.1.5.2. Superposición de estructuras. Desviación cuadrática media del esqueleto polipeptídico.
 - 5.1.5.3. Contactos atómicos en las diferentes variantes del dominio SH3-Spc.
 - 5.1.5.4. Área superficial accesible a la molécula de agua (ASA) en las diferentes variantes del dominio SH3-Spc.

5.1.6. Conclusiones generales sobre la transmisión cooperativa de interacciones en el dominio SH3-Spc.

5.2 Estudio de la interacción entre el dominio SH3-Spc y el decapeptido de diseño p41 (APSYSPPPPP).

5.2.1. Análisis estructural del complejo SH3-Abl con p41.

5.2.2. Estudio de la unión entre el dominio SH3-Spc y el p41 seguido por espectroscopía de fluorescencia.

5.2.2.1. Diseño y estudio de nuevas construcciones mutantes múltiples del dominio SH3-Spc.

5.2.3. Estudio termodinámico del proceso de unión del dominio SH3-Spc al p41 por calorimetría isotérmica de titulación (CIT).

5.2.4. Estudio termodinámico del proceso de la unión del dominio SH3-Spc al p41 por calorimetría diferencial de barrido (CDB).

5.2.5. Estudio del proceso de unión del mutante R21A del dominio SH3-Spc al decapeptido p41 por resonancia magnética nuclear (I). Efecto de la unión sobre los desplazamientos químicos del dominio.

5.2.6. Estudio del proceso de unión del mutante R21A del dominio SH3-Spc al decapeptido p41 por resonancia magnética nuclear (II). Efectos de la unión sobre el intercambio Hidrógeno-Deuterio del dominio.

5.2.6.1. Efectos de la unión del ligando en la estabilidad del dominio. Cambios en el ΔG_{ap} debidos a la unión.

5.2.6.2. Afinidades de unión al ligando p41 de los diferentes estados conformacionales del dominio SH3-Spc.

5.2.7. Conclusiones y discusión general del proceso de la unión del decapeptido p41 al dominio SH3-Spc.

6. CONCLUSIONES GENERALES.

1. INTRODUCCIÓN.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Diseño molecular.

El ciclo vital de la célula está gobernado por una serie de interacciones de carácter transitorio entre moléculas biológicas entre las que podemos encontrar la unión de sustratos e inhibidores a enzimas, la identificación de antígenos por sus anticuerpos complementarios, la interacción entre las hormonas y sus receptores correspondientes o el establecimiento de cascadas de transducción de señales. Dado que en ocasiones, este ciclo celular se ve alterado y como consecuencia se originan patologías, que pueden llegar a ser graves, es muy importante conocer y comprender en profundidad los factores que determinan estos procesos de *reconocimiento* a nivel *molecular*. El conocimiento exhaustivo de estos fenómenos facilitaría enormemente el desarrollo de estrategias de diseño molecular que permitan obtener nuevas proteínas con las funciones y estabilidades deseadas e incluso el desarrollo de nuevos fármacos con mayor efectividad y menores efectos secundarios.

El enorme desarrollo que ha tenido lugar en el campo de la genómica, la resolución del *Genoma Humano* junto con la de otros organismos inferiores, entre ellos los de algunos agentes patógenos importantes, ha hecho aún más patente la necesidad de revisar y actualizar las metodologías tradicionales de diseño molecular así como de la profundización en el estudio de estos fenómenos de reconocimiento a nivel molecular. Los 35000 genes identificados en el genoma humano codifican al menos un número idéntico de proteínas, que deberán ser caracterizadas desde un punto de vista tanto estructural como funcional y cuyas interacciones con el resto de las moléculas presentes en la célula habrán de identificarse y analizarse como condición sin la cual no se podrá avanzar en la comprensión y control de los complejos mecanismos que regulan el ciclo vital de la célula. Más aún, muchas de estas proteínas resultan ser dianas potenciales para el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos a combatir numerosas enfermedades. De esta manera, para cada proteína diana, será preciso identificar o diseñar, en su caso, nuevos compuestos que regulen adecuadamente su actividad y que, tras ser optimizados, podrán ser empleados como agentes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades

diversas, ya que dispondrán de la afinidad, especificidad y selectividad en la unión, biodisponibilidad y propiedades toxicológicas adecuadas para el tratamiento de una patología concreta.

Es necesario por tanto, por una parte, incrementar la eficiencia de los algoritmos de diseño molecular y, como consecuencia, profundizar en el conocimiento de la íntima *relación* que existe entre la *estructura* y la *estabilidad* de una proteína y sus características funcionales, con lo que se incorporan al proceso de diseño no sólo los aspectos estructurales, sino consideraciones termodinámicas y dinámicas, esto es, *estabilidad* y *cooperatividad*, genéticas y funcionales, lo que requiere un abordaje multidisciplinar del fenómeno de reconocimiento molecular.

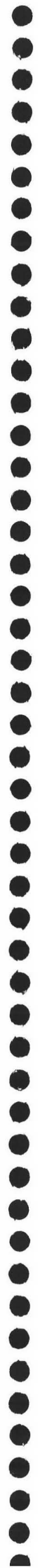
1.2. Dominios modulares de reconocimiento molecular.

En estos procesos de reconocimiento molecular a través de los cuales se organiza y coordina todo el ciclo vital de la célula, frecuentemente intervienen como intermediarios una serie de pequeños dominios modulares, altamente conservados, que forman parte de diversas proteínas, en número variable y en distintas combinaciones (Pawson, T. et al., 1997) (Pawson, T. et al., 2002). Se trata de dominios de pequeño tamaño (entre 30 y 150 aminoácidos) que se encuentran plegados en estructuras bastante compactas y estables, al tiempo que presentan uno o más sitios de unión. Por lo general, cada grupo de dominios reconoce en sus proteínas diana secuencias concretas, de entre 3 y 8 restos, altamente conservadas. Por ejemplo, los dominios SH3, WW y EVH reconocen secuencias con un alto contenido en restos prolina, los dominios SH2 y PTB reconocen secuencias peptídicas en las que aparezcan restos tirosina que estén fosforilados y los dominios PDZ por su parte, secuencias correspondientes a los extremos carboxilo terminal (Kuriyan, J. et al., 1997), (Kay, B. K. et al., 2000). Dichas secuencias se encuentran flanqueadas por otros restos adicionales que son capaces de interactuar con elementos variables del sitio de unión y que parecen dotar de especificidad al proceso de unión dentro de una misma familia de dominios, es decir, son responsables de la selección de proteínas funcionalmente complementarias “in vivo”. Las interacciones en las que median este tipo de dominios no requieren de

grandes superficies de contacto, sino que se trata de superficies relativamente pequeñas, bastante similares a las que se encuentran en los sitios de unión de pequeños ligandos a enzimas, lo que facilita enormemente el diseño molecular y la obtención de compuestos que bloqueen estas superficies de interacción, con una gran especificidad (Kardinal, C. et al., 1999), (Kardinal, C. et al., 2000), (Lee, K. Y. et al., 2002). De esta manera, estos dominios constituyen interesantes dianas para posibles nuevos fármacos de diseño, con menores efectos colaterales.

Sin embargo, aún no están suficientemente claros los factores que determinan la afinidad y la especificidad de la interacción entre estos dominios de reconocimiento y sus dianas, de tal forma que resulta imprescindible profundizar en el estudio de los diferentes elementos que dirigen las interacciones entre estos dominios y sus ligandos. Así, en los últimos años se ha podido establecer de forma mucho más concluyente, la enorme interdependencia que existe entre la estructura y la estabilidad de una proteína y su función biológica. Concretamente, ha quedado muy patente la necesidad de incorporar consideraciones termodinámicas (contribuciones entálpicas y entrópicas a la afinidad y especificidad del proceso de unión, estabilidad y cooperatividad, etc.) al método de diseño (Luque, I. et al., 2000), (Velazquez-Campoy, A. et al., 2001a; Velazquez-Campoy, A. et al., 2001b; Velazquez-Campoy, A. et al., 2001c), (Luque, I. et al., 2002).

Por otro lado, en la era de la proteómica, se hace necesario el desarrollo de métodos fiables de predicción de posibles dianas celulares dentro de un genoma concreto, así como qué secuencias serán reconocidas por un dominio en particular. En este sentido, la integración de toda la información disponible en un “código de reconocimiento molecular” genérico, esto es, un conjunto de reglas precisas que permitan no sólo entender sino también determinar *a priori* las interacciones en las que estos dominios van a intervenir, es fundamental para obtener un rendimiento máximo de toda la creciente información contenida en genomas y proteomas, que se están descodificando (Brannetti, B. et al., 2000), (Sudol, M., 1998), (Tong, A. H. et al., 2002).



2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.

2.1. Dominios SH3 y procesos de reconocimiento molecular.

Como se ha indicado en la Introducción de este trabajo, el ciclo vital de la célula y su respuesta ante los estímulos que recibe tanto del interior como del exterior se encuentra organizado según una compleja red de procesos de reconocimiento molecular, en los que intervienen los dominios SH3, que probablemente sean los módulos de reconocimiento más extendidos del proteoma (Mayer, B. J., 2001). Mediante algoritmos de cribado de bases de datos se han logrado identificar hasta la fecha más de 1500 dominios SH3 diferentes, que forman parte de proteínas tales como kinasas, lipasas, GTPasas, proteínas adaptadoras y estructurales (o proteínas víricas) que participan en las redes de comunicación intracelular, en la organización del esqueleto citoplasmático y en el tráfico de membranas (Skorski, T. et al., 1998; Stein, R., 1998), (McPherson, P. S., 1999). Se sabe que los dominios SH3 actúan frecuentemente como sitios de anclaje para el reclutamiento de sustratos y la formación de complejos supramoleculares que a menudo conducen a la modificación enzimática de algunos de sus componentes, que dan lugar a la aparición de nuevos sitios de interacción así como a la propagación y amplificación de señales químicas intracelulares (Kiyokawa, E. et al., 1997; Klejman, A. et al., 2002).

A veces estos dominios son elementos esenciales en la regulación de la actividad enzimática de las proteínas que los contienen mediante el establecimiento de interacciones intramoleculares con otros elementos de la misma molécula (Barila, D. et al., 1998), (Arold, S. T. et al., 2001; Brasher, B. B. et al., 2001), (Brabek, J. et al., 2002). Este es el caso de las tirosina kinasas de la familia Src, algunos de cuyos miembros, especialmente c-Src y c-Yes, están claramente implicados en el desarrollo de procesos cancerígenos (Miyazaki, K. et al., 1999). Pero, además de con el cáncer, los dominios SH3 han sido asociados con otras patologías entre las que se encuentra el SIDA (Lyn, Hck, Lck), leucemia (Abl), osteoporosis (Src), y procesos inflamatorios, alérgicos y asmáticos (Dalgarno, D. C. et al., 1997; Skorski, T. et al., 1998). De ahí que el diseño de ligandos que interfieran en el establecimiento de las interacciones entre estos dominios y sus dianas se ha consolidado en los últimos años como una estrategia

viable para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de este tipo de patologías (Stauffer, T. P. et al., 1997), (Kardinal, C. et al., 2000), (Vidal, M. et al., 2001), (Lee, K. Y. et al., 2002), (Oneyama, C. et al., 2002).

2.2. El dominio SH3.

Todos los dominios SH3 comparten una estructura tridimensional común, que consiste en dos láminas- β antiparalelas dispuestas ortogonalmente entre sí. Contienen un número de aminoácidos que oscila entre 60 y 85. El sitio de unión de estos dominios se corresponde con una región hidrofóbica muy conservada, flanqueada por dos lazos (RT y n-Src) de composición bastante más variable y de naturaleza más polar. Este tipo de dominios se encuentran en numerosas proteínas modulares, muchas de las cuales ni siquiera están funcionalmente relacionadas, tanto en organismos unicelulares como en pluricelulares.

2.2.1. Función biológica.

Además de formar parte de proteínas implicadas en rutas específicas de transducción de señales, en interacciones proteína-proteína, funciones de reconocimiento a nivel molecular, etc. (Viguera, A. R. et al., 1994a), (Pawson, T., 1995), (Xu, W. et al., 1997), (Stein, R., 1998), (Skorski, T. et al., 1998), (McPherson, P. S., 1999), los dominios SH3 también están presentes en numerosas proteínas del citoesqueleto proporcionando de esta manera un posible nexo entre las distintas rutas de transducción de señales y los cambios morfológicos que sufre la célula (Lehto, V. P. et al., 1988), (Musacchio, A. et al., 1992b).

Los dominios SH3 no presentan una posición topológica definida dentro de las proteínas que los contienen y además se encuentran en proteínas funcionalmente muy diferentes (Koch, C. A. et al., 1991), (Musacchio, A. et al., 1992a; Musacchio, A. et al., 1992b), (Pawson, T. et al., 1993), por lo que se acepta que este tipo de dominios juega un papel esencial en procesos de interacción proteína-proteína, muy importantes para el

desarrollo de numerosas funciones celulares, la localización y el anclaje de componentes diferentes dentro de la estructura celular, como ya hemos indicado.

Por tanto, los estudios de estos dominios presentan un enorme interés, tanto a nivel funcional, por su implicación en procesos celulares relacionados con patologías tales como el cáncer, como a nivel estructural y energético, ya que se trata de modelos muy adecuados dado su pequeño tamaño, con un peso molecular inferior a los 10kDa. Además se pueden sobre-expresar muy bien, empleando técnicas de ADN recombinante y pueden purificarse y cristalizarse de forma totalmente independiente al resto de la proteína de la que forman parte, lo que constituye una clara ventaja para su estudio.

2.2.2. Estructura, plegamiento y estabilidad del dominio SH3.

Durante los últimos años se han resuelto las estructuras tridimensionales de varios dominios SH3, entre ellos el de α -espectrina, tanto por cristalografía de Rayos X (Musacchio, A. et al., 1992b) como por RMN en disolución (Blanco, F. J. et al., 1997), y ello ha permitido una descripción precisa y exhaustiva del mismo. Aquí nos centraremos de forma exclusiva en la descripción de uno de los dominios de la familia SH3, el de α -espectrina (SH3-Spc), cuyo estudio se ha realizado en este trabajo.

El dominio SH3-Spc está constituido por 62 aminoácidos y parece estar implicado en el anclaje de la proteína de la que forma parte, al citoesqueleto. En la figura 2.2.1., se representa la estructura tridimensional. El dominio está constituido (Musacchio, A. et al., 1992b) por cinco hebras β antiparalelas denominadas β_a (posiciones 8 a 11), β_b (ídem 30 a 35), β_c (ídem 41 a 46), β_d (ídem 49 a 54) y β_e (ídem 58 a 61). Estas hebras β forman dos láminas β denominadas β_I y β_{II} . La lámina más pequeña, la β_I , está constituida por β_b - β_a - β_e , y la mayor de ellas, la β_{II} , la forman las hebras de β_b - β_c - β_d . Otro elemento de este dominio es un largo lazo de 19 restos denominado "lazo RT" que conecta las dos primeras hebras β_a y β_b , que forma una estructura a modo de horquilla. La conexión entre las hebras β_d y β_e se hace por una vuelta de hélice 3_{10} (posiciones 55 a 57) que comienza con el aminoácido prolina 54, bastante conservado en las distintas secuencias de la familia SH3. Entre las hebras β_c , β_d

existe una vuelta muy ajustada llamada *giro distal* que consiste en un giro β de tipo II'; los restos valina 46 y arginina 49 forman un puente de hidrógeno mediante átomos de la cadena principal. Este giro β presenta una cierta tensión estructural, ya que el resto asparagina 47 ocupa una posición no permitida en el diagrama de Ramachandran. Finalmente, el lazo denominado "n-Src" (Src neuronal) conecta las hebras β_b y β_c . En resumen, el plegamiento básico del dominio SH3 de α -espectrina es un sandwich de dos láminas β dispuestas ortogonalmente entre sí, donde cada lámina consta de tres cadenas.

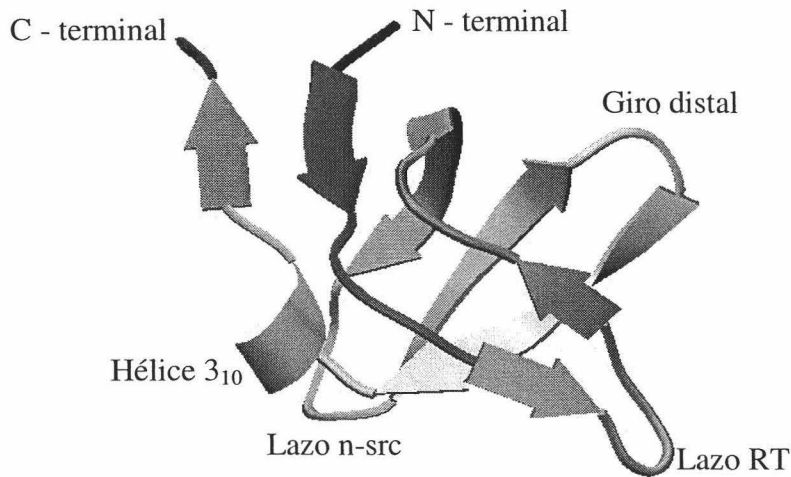


Fig. 2.2.1.: Representación esquemática de la estructura tridimensional de la forma natural, WT, del dominio SH3-Spc en estudio, realizada con el programa MolScript (Kraulis, P., 1991) a partir de sus coordenadas atómicas depositadas en el PDB con el código 1shg, obtenidas por cristalografía de Rayos X. Se indican algunos elementos de la estructura sobre la misma.

En la figura 2.2.2., se muestra la organización espacial y la topología del dominio y se indican sobre la misma, las láminas β y los tres giros a los que se ha hecho mención, según la nomenclatura a la que se ha hecho referencia con anterioridad:

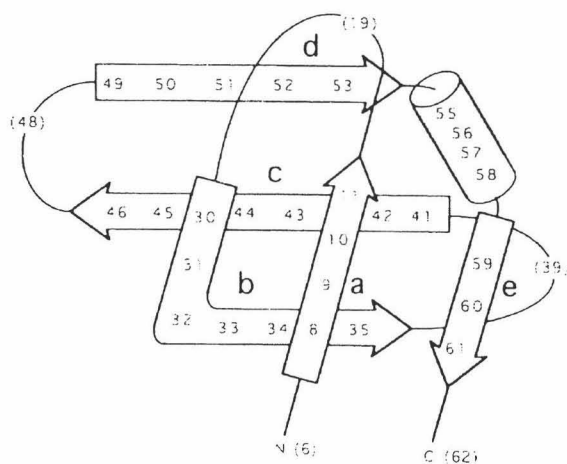


Fig. 2.2.2.: Representación topológica de la estructura secundaria de la variante natural del dominio SH3-Spc, tal y como se describió inicialmente cuando fue resuelta (Musacchio, A. et al., 1992b). La hélice 3_{10} aparece como un cilindro y las láminas β , como flechas. Los números hacen referencia a las posiciones de los residuos en la estructura y, cuando aparecen entre paréntesis, la localización de los mismos es aproximada.

Los restos conservados de la secuencia están próximos entre sí, desde un punto de vista estructural. De hecho, se localizan en su práctica totalidad entre los lazos *RT* y *n-Src* formando el sitio de unión para ligandos o el sitio de reconocimiento en las interacciones proteína-proteína (Argos, P., 1988). Estos aminoácidos conservados no son los mismos en todos los dominios SH3, sino que presentan ciertas variaciones, lo cual da idea de que éstos reconocen secuencias similares, pero no idénticas, de manera que esta diversidad les otorga una cierta especificidad estructural (Ren, R. et al., 1993). De hecho, estos dominios SH3 presentan una mayor homología estructural que de secuencia.

En cuanto a la estabilidad estructural y el plegamiento de este tipo de dominios, cabe mencionar que numerosos grupos de investigación han llevado a cabo estudios de este tipo, empleando para ello diversas técnicas como el diroísmo circular, la fluorescencia, la calorimetría diferencial de barrido (CDB), el pH o la concentración de agentes desnaturalizantes (Viguera, A. R. et al., 1994b), (Guijarro, J. I. et al., 1998), (Plaxco, K. W. et al., 1998), (Filimonov, V. V. et al., 1999), (Vega, M. C. et al., 2000). Los estudios cinéticos y de equilibrio de este tipo de dominios indican que el proceso de plegamiento-desplegamiento de los mismos es un proceso sencillo, que puede describirse según un *modelo de dos estados*, en el que no aparecen estados intermedios significativamente poblados.

No obstante, y a pesar de la aparente simplicidad macroscópica de los procesos de plegamiento-desplegamiento de estos pequeños dominios globulares, los resultados de los recientes estudios realizados de Intercambio Hidrógeno-Deuterio (IHD) seguidos por RMN de alta resolución, llevados a cabo en nuestro grupo de investigación (Sadqi, M. et al., 1999), (Sadqi, M. et al., 2002a; Sadqi, M. et al., 2002b), indican que, en condiciones nativas, el dominio se encuentra en un equilibrio conformacional de naturaleza estadística constituido por un gran número de conformaciones, que comprenden desde el estado nativo, totalmente plegado, hasta estados altamente desordenados, pasando por otros estados en los que el desorden es parcial o incluso, sólo local. Por tanto, se puede decir, a la luz de estos resultados, que en condiciones nativas el equilibrio conformacional del dominio SH3 dista mucho de estar de acuerdo con el modelo de dos estados. Así, el dominio presenta una *cooperatividad estructural* sólo parcial aunque bastante elevada y, como consecuencia de ello, las fluctuaciones conformacionales que sufren los diferentes elementos de la estructura están parcialmente acopladas entre sí. Como consecuencia directa de esta cooperatividad estructural parcial del dominio, un cambio energético o bien interacción, que se produzca a escala local, como bien pueden ser mutaciones puntuales en la secuencia de la proteína, o la interacción con un ligando, se transmitirán de forma eficiente al resto de la estructura, a través de ciertas rutas de interacciones cooperativas, como demuestran los estudios realizados con variantes mutantes del dominio SH3-Spc, presentados en esta memoria, algunos de los cuales han sido publicados ya (Casares, S. et al., 2003) y otros se encuentran en fase de preparación para su envío a publicación.

2.2.3. Unión de ligandos al dominio SH3. Importancia Biológica.

Actualmente se sabe que los dominios SH3 reconocen secuencias ricas en el aminoácido prolina, a las que se unen por lo general con una afinidad baja ($10^{-6} < K_d < 10^{-4}$). Los ligandos de estos dominios se unen a los mismos adoptando una conformación correspondiente a una hélice de tipo *poliprolina-II* (PPII) en dos posibles orientaciones. Análisis realizados con las estructuras de que se dispone de algunos de los complejos formados por estos dominios han permitido proponer ciertas secuencias *consenso* para los ligandos de estos dominios SH3, a saber: RxLPPΨP para orientación

tipo I y $Px\Psi PxR$ para orientación tipo II, donde Ψ es frecuentemente un resto hidrofóbico y x representa a cualquier otro resto (Alexandropoulos, K. et al., 1995). Ahora bien, observaciones recientes han llevado a cuestionar la generalidad de este modelo y sugieren que el potencial de unión de la familia de dominios SH3 pueda ser más amplio de lo que se supuso inicialmente (Lewitzky, M. et al., 2001), (Kami, K. et al., 2002), (Agrawal, V. et al., 2002). Así, la identificación de algunos ligandos naturales, ya sean intra o intermoleculares, que carecen de prolinas en su secuencia pero que, sin embargo, interaccionan de forma favorable con estos dominios, parece señalar cuál es la condición realmente crítica para que la unión de estos ligandos sea posible, y es su capacidad para adoptar una conformación en hélice de poliprolina en el complejo, siempre que el coste energético del proceso no sea demasiado elevado. Son varios los grupos que actualmente se encuentran en fases avanzadas de estudio de determinantes de afinidad y especificidad en la unión de ligandos de poliprolina a este tipo de dominios. Mención especial merece el grupo del Dr. Cesareni, en el que muy recientemente se ha desarrollado una clasificación de los diferentes dominios SH3 de acuerdo con sus preferencias por distintas secuencias en los ligandos y además han desarrollado también un primer algoritmo computacional para la identificación de posibles ligandos de los dominios SH3 en las bases de datos de secuencias (Brannetti, B. et al., 2000), (Cesareni, G. et al., 2002).

2.2.4. Diseño de ligandos del dominio SH3.

2.2.4.1. Estrategias clásicas.

Dada la baja afinidad que presentan este tipo de dominios por sus ligandos naturales y el hecho de que los procesos de reconocimiento molecular en los que están implicados tanto estos dominios como sus secuencias diana naturales, se asocian con diversas patologías humanas, es lógico pensar que se esté haciendo un gran esfuerzo por parte de muchos grupos de investigación, entre ellos el nuestro, dirigidos a la búsqueda de nuevas estrategias que permitan no sólo identificar sino también diseñar ligandos de alta afinidad para estos dominios. De entre todos los dominios SH3, son los de Src y los de Grb2, por su implicación en procesos cancerígenos, las dianas más consideradas (Dalgarno, D. C. et al., 1997), (Garbay, C. et al., 2000).

Existen diversas estrategias para obtener ligandos de estas características, entre las que destacan el empleo de bibliotecas de compuestos sintéticos, la sustitución de restos en distintas posiciones del ligando por alanina, realizadas de forma sistemática (Chen, J. K. et al., 1993), (Feng, S. et al., 1994), (Ren, R. et al., 1993), o bien las conocidas técnicas de “*phage display*” (exposición por fagos) (Panni, S. et al., 2002), (Tong, A. H. et al., 2002). Ahora bien, ninguno de estos dos métodos “clásicos” ha sido capaz de proporcionar resultados satisfactorios en lo que a identificación de ligandos de mayor afinidad se refiere. En general, ya sea por uno u otro método, se han conseguido ligandos peptídicos de unos diez restos de longitud y se han alcanzado con ellos, afinidades que rondan 10^6 M^{-1} . Algunos otros grupos de investigación sin embargo, han centrado sus esfuerzos en la incorporación de elementos no peptídicos a los ligandos (Combs, A. P. et al., 1996; Feng, S. et al., 1996). De esta manera, se ha propuesto la sustitución del grupo Pro-Pro en el ligando por derivados espirolactámicos (Witter, D. J. et al., 1998) o el empleo de D-aminoácidos (Schumacher, T. N. et al., 1996), pero tampoco se ha encontrado un incremento significativo en la afinidad de estos ligandos.

También se ha hecho uso de métodos combinatorios con bibliotecas de peptoides en los que los restos prolina claves han sido sustituidos por derivados sintéticos, con lo que se consigue estabilizar la conformación del péptido y se mejora también su interacción con algunos elementos del sitio de unión. Este es quizás el método que mejores resultados ha proporcionado hasta ahora, de manera que se han obtenido ligandos de muy elevada afinidad ($K_d \approx 40\text{nM}$) por el dominio SH3-Grb2 (Aghazadeh, B. et al., 1999), (Nguyen, J. T. et al., 2000), si bien su actividad *in vivo* aún no ha sido descrita. La modificación racional de los ligandos peptídicos mediante el empleo de algoritmos computacionales de modelado, por otro lado, ha dado algunos resultados satisfactorios, como los obtenidos en el grupo de investigación del Dr. Serrano (EMBL, Heidelberg), en los que se ha podido constatar un incremento notable tanto de la afinidad como de la especificidad de secuencias ricas en prolina, por el dominio SH3-Abl (Pisabarro, M. T. et al., 1994; Pisabarro, M. T. et al., 1996).

Sin embargo, una limitación importante de estos métodos radica en que, si bien otros aminoácidos podrían conferir mayor afinidad y especificidad a la unión, los restos de prolina son necesarios para estabilizar la conformación de los péptidos en la hélice de poliprolina-II (PPII). De esta manera se consigue minimizar el coste entrópico que

supone la formación de dicha hélice en el proceso de unión, al encontrarse ya “preformada” en disolución cuando el ligando está libre y que es supondría una disminución en la afinidad de unión. Si se introducen elementos sintéticos que estabilicen dicha conformación, permitiendo cierta variabilidad en las cadenas laterales, nos encontraríamos ante otra opción válida para la estrategia de diseño.

Una solución alternativa al problema, que se ha propuesto recientemente en nuestro grupo de investigación, en colaboración con el del Dr. Serrano, consiste en el diseño de una “proteína molde” en la que la conformación de la hélice PPII del ligando se mantiene merced a interacciones con el resto de la molécula, de tal manera que los restos de prolina podrían ser sustituidos por otros más adecuados para incrementar la afinidad. Estos trabajos aún se encuentran en fase de desarrollo.

2.2.4.2. Diseño basado en consideraciones termodinámico-estructurales y dinámicas.

Para que el diseño de ligandos se pueda llevar a cabo de forma eficaz, es precisa una caracterización previa exhaustiva de la diana del mismo, tanto desde un punto de vista estructural, como termodinámico y dinámico, y lógicamente, la integración subsiguiente de toda la información obtenida, en un método racional de diseño. Hasta ahora, el proceso de optimización de ligandos estaba encaminado casi exclusivamente hacia la mejora en la afinidad de la unión. Para ello, se optaba por un cribado de extensas bibliotecas de compuestos o bien se empleaban complejos algoritmos computacionales cuya única base se centraba en la información estructural previa de que se disponía sobre las dos moléculas que interaccionaban. Ahora bien, se ha podido comprobar cómo la consideración de la afinidad de la unión, exclusivamente determinada por la energía libre de Gibbs (ΔG_B), es una visión muy pobre y parcial del proceso de unión ya que no proporciona ningún tipo de información acerca del origen de las fuerzas directrices del mismo, esto es, las contribuciones entálpica y entrópica a dicha energía libre de Gibbs y que, en muchas ocasiones ha limitado, y aún hoy limita, un avance significativo en el desarrollo de nuevos y mejores ligandos.

Durante los últimos años, nuestro grupo de investigación, en colaboración con el del Dr. Freire (John’s Hopkins University, Baltimore, USA), ha trabajado en la

incorporación de estas consideraciones termodinámicas al método de diseño, con lo que finalmente ha sido posible abordar el análisis molecular no sólo del origen de la afinidad y la especificidad de los ligandos, sino también de la posible aparición de resistencia a fármacos, y de las redes de transmisión de información y cooperatividad (Sadqi, M. et al., 1999), (Luque, I. et al., 2000), (Velazquez-Campoy, A. et al., 2000), (Velazquez-Campoy, A. et al., 2001a; Velazquez-Campoy, A. et al., 2001b), (Luque, I. et al., 2002). De hecho, son varios los trabajos que recientemente han demostrado que los estudios del plegamiento y la dinámica molecular de los dominios SH3 son esenciales para abordar el diseño de ligandos para los mismos. Así por ejemplo, se ha demostrado que las alteraciones que se producen en la dinámica molecular de los lazos *RT* y *n-Src* son de gran importancia para la determinación de la especificidad en la unión a los dominios SH3 (Roberts, G. C., 1999), (Wang, C. et al., 2001; Wang, W. et al., 2001), (Yuzawa, S. et al., 2001), lo que sin duda destaca la relevancia del análisis del plegamiento y la dinámica molecular, en el proceso de diseño de ligandos (Gmeiner, W. H. et al., 2001), (Kolafa, J. et al., 2000).

Es importante hacer notar que, si se desea obtener ligandos específicos, es esencial conocer perfectamente los elementos comunes y variables de los sitios de unión, tanto entre los distintos dominios SH3 como entre éstos y otros dominios, tales como los WW o los EVH, que unen ligandos muy similares. De ahí que, durante estos últimos años, nuestro grupo de investigación ha estado trabajando intensamente en la caracterización dinámica, estructural y termodinámica de varios dominios SH3, entre ellos los de Spc, Fyn y Abl (Viguera, A. R. et al., 1994b), (Martinez, J. C. et al., 1998a; Martinez, J. C. et al., 1998b), (Martinez, J. C. et al., 1999a; Martinez, J. C. et al., 1999b), (Filimonov, V. V. et al., 1999), (Sadqi, M. et al., 1999; Sadqi, M. et al., 2002a; Sadqi, M. et al., 2002b). Al mismo tiempo, se han iniciado estudios de unión de diversos tipos de ligandos con estos dominios para tratar de determinar, desde un punto de vista termodinámico, cuáles son las bases moleculares de la especificidad de dicha unión. Dentro de este marco de trabajo se ha abordado el estudio del proceso de unión del dominio SH3-Spc y el decapeptido p41, que se recoge en esta Memoria, usando para ello técnicas macroscópicas de titulación clásicas, como la espectroscopia de fluorescencia o la calorimetría isotérmica de titulación (CIT) y técnicas microscópicas como los estudios de Intercambio Hidrógeno-Deuterio (IHD) seguidos por RMN de alta

resolución, que nos han permitido caracterizar el proceso de unión haciendo uso de consideraciones termodinámico-estructurales, que nos permiten establecer la manera en la que las diferentes regiones del dominio se ven afectadas por la interacción del mismo con un ligando externo gracias al acoplamiento que existe entre las mismas, es decir, cómo se transmite la “información” de la interacción dominio-ligando a través de las redes de transmisión de cooperatividad. Este trabajo, continúa así en la línea iniciada (Sadqi, M., 2000), (Sadqi, M. et al., 1999; Sadqi, M. et al., 2002a; Sadqi, M. et al., 2002b), y trata de profundizar en la consideración de las características dinámicas y la cooperatividad de estos dominios, incorporándolas al proceso de diseño, ya que son muchas las evidencias que confirman la interrelación que existe entre estas propiedades y la afinidad y especificidad en la unión (Erpel, T. et al., 1995), (Cordier, F. et al., 2000).

Determinar las contribuciones individuales de cada uno de los diferentes aminoácidos del dominio a la afinidad y la especificidad de la unión, junto con la dinámica estructural y la cooperatividad, resulta esencial para el diseño y desarrollo eficiente de ligandos específicos para cada uno de estos dominios que permitan, por ejemplo, bloquear de forma unívoca ciertos caminos de señalización empleados por cada kinasa de la que un determinado dominio SH3 forma parte, evitando así posibles efectos colaterales no deseados que la inhibición inespecífica de múltiples miembros de la familia pudiera conllevar. De esta manera la actuación terapéutica contra las enfermedades a las que hemos hecho mención anteriormente, como el cáncer, podría resultar por un lado más efectiva y por otro menos invasora y dañina para el paciente.

2.3. Estudios de Intercambio Hidrógeno-Deuterio para caracterizar los procesos de reconocimiento molecular.

El papel central que juegan la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear en la investigación moderna de la estructura, el plegamiento y la función de las macromoléculas está siendo suplementado de manera creciente por las técnicas de intercambio hidrógeno-deuterio (IHD) seguido por RMN bidimensional (RMN-2D), que pueden acceder a ciertos tipos de información que no es accesible a

métodos más familiares. Las velocidades de IHD dependen de detalles importantes de la estructura macromolecular y de su comportamiento dinámico y termodinámico. Durante las últimas décadas el reto ha sido cómo medir la velocidades de IHD de manera precisa y, posteriormente, cómo decodificar la información que contienen (Englander, S. W. et al., 2001).

Aunque inicialmente la mayoría de los trabajos han utilizado la técnica de IHD para complementar la información estructural o caracterizar cambios conformacionales en proteínas y ácidos nucleicos, recientemente los métodos basados en IHD han comenzado a ser frecuentemente utilizados para obtener información sobre muchos complejos proteína-proteína o proteína-ligando biológicamente relevantes, por ejemplo, complejos con GroEL (Gozu, M. et al., 2002), calmodulina (Kranz, J. K. et al., 2002), anticuerpos (Williams, D. C., Jr. et al., 1996), inhibidores y sustratos (Wang, C. et al., 2001), (Engen, J. R. et al., 1999) o DNA (Kalodimos, C. G. et al., 2002). La principal ventaja de las técnicas de IHD combinadas con RMN-2D reside en que puede proporcionar información cinética y/o termodinámica con un nivel de resolución del residuo, lo que permite obtener una visión inusualmente detallada de los mecanismos de reconocimiento molecular.

Como ya se ha mencionado con anterioridad, una de las principales conclusiones que se han derivado de los experimentos de IHD en proteínas es la visión de éstas como colectivos estadísticos de estados conformacionales en equilibrio (ver, por ejemplo, (Englander, S. W., 2000), (Sadqi, M. et al., 1999), (Bai, Y. et al., 1995), (Woodward, C. et al., 1982), (Milne, J. S. et al., 1999)). En condiciones nativas, las proteínas sufren multitud de desplegamientos locales o parciales diseminados por toda su estructura, lo que da lugar a un gran número de estados cuyas energías difieren dependiendo de sus conformaciones. La más inmediata es la existencia de regiones de alta estabilidad y regiones de baja estabilidad en la estructura de las proteínas (Hilser, V. J. et al., 1998), (Hilser, V. J. et al., 1996), en contraposición a la visión clásica de éstas según el modelo de plegamiento de dos estados. La cooperatividad de la estructura de las proteínas es por tanto regional y no global.

En años recientes, el grupo de investigación del Dr. E. Freire ha venido desarrollando un formalismo teórico basado en la termodinámica estadística para modelar el equilibrio conformacional de las proteínas. De dichos trabajos surgió el algoritmo COREX (Hilser, V. J. et al., 1996), (Hilser, V. J. et al., 1997), (Hilser, V. J. et al., 1998), el cual basándose en la estructura tridimensional de alta resolución de una proteína genera un gran número de estados conformacionales parcialmente plegados de la misma mediante el desplegamiento combinatorio de una serie de unidades de plegamiento predefinidas. La energía de Gibbs, ΔG_i , de cada estado conformacional se calcula mediante una parametrización termodinámica semiempírica de la energía basada en la estructura previamente desarrollada por el mismo grupo (Murphy, K. P. et al., 1992), (D'Aquino, J. A. et al., 1996), (Gomez, J. et al., 1995), (Xie, D. et al., 1994). A partir de su energía de Gibbs el algoritmo evalúa la probabilidad de cada estado mediante la distribución de Boltzmann:

$$P_i = \frac{e^{-\frac{\Delta G_i}{RT}}}{\sum_i e^{-\frac{\Delta G_i}{RT}}} \quad (2.3.1)$$

El descriptor estadístico de la estabilidad regional de una proteína es la llamada *constante de estabilidad por residuo*, que se determina para cada residuo j de la proteína a partir de las probabilidades de los diferentes estados conformacionales según la ecuación:

$$K_j = \frac{\sum_{i(j,pl)} P_i}{\sum_{i(j,despl)} P_i} \quad (2.3.2)$$

donde las sumas (j,pl) y $(j,despl)$ se extienden sobre los estados que contienen al residuo j en conformación plegada y desplegada, respectivamente. Las constantes de estabilidad proporcionan una medida de la estabilidad local en el entorno de cada residuo de la proteína.

La verificación experimental de las predicciones del algoritmo COREX ha venido proporcionada por las medidas de los *factores de protección* de IHD, que según su definición termodinámico-estadística difieren poco de la de las constantes de estabilidad (Hilser, V. J. et al., 1996), (Hilser, V. J. et al., 1997), (Hilser, V. J. et al., 1998), (Sadqi, M. et al., 1999), y que han sido correctamente predichos por el algoritmo COREX para una serie de proteínas.

A partir de éste enfoque termodinámico-estadístico de la estabilidad de las proteínas se ha propuesto recientemente que esta distribución desigual de estabilidad parece tener gran importancia desde el punto de vista biológico, ya que proporciona mecanismos moleculares no sólo para que las proteínas interactúen de manera más eficiente con sus ligandos y efectores sino además para la propagación cooperativa de dichas interacciones a regiones distantes de su estructura en fenómenos biológicos fundamentales como el alosterismo o la transducción de señales (Luque, I. et al., 2002), (Freire, E., 2000), (Luque, I. et al., 2000), (Freire, E., 1999), (Freire, E., 1998), (Hilser, V. J. et al., 1998). Así, una condición necesaria para que la unión de un ligando al sitio de unión de una proteína se transmita a regiones remotas de su estructura es que la conformación del sitio de unión en el estado libre no sea competente para interactuar con el ligando. De hecho, si la conformación adecuada del sitio de unión fuera intrínsecamente estable, todas las conformaciones accesibles a la proteína serían competentes para unir el ligando estabilizándose de forma similar con la unión, sin producirse ninguna redistribución en sus poblaciones relativas. Así, el colectivo conformacional de la proteína permanecería inalterado con la unión del ligando y la propagación de los efectos de la unión se limitaría al entorno cercano del sitio de unión (Freire, E., 1999). Este razonamiento explica la observación de que los sitios de unión para efectores y sustratos de muchas enzimas y proteínas estén compuestos en parte por regiones de baja estabilidad (Luque, I. et al., 2000).

En cualquier caso, la transmisión de efectos entre dos regiones distantes de una proteína requiere que dichas regiones se encuentren conectadas entre sí por una ruta de interacciones cooperativas. Derivados del algoritmo COREX existen en la literatura tratamientos teóricos que han arrojado luz sobre los mecanismos de comunicación entre

puntos distantes de la estructura y las rutas cooperativas para esta propagación de interacciones (Pan, H. et al., 2000), (Hilser, V. J. et al., 1998), (Freire, E., 1999).

De nuevo, la única fuente de obtención de información experimental suficientemente detallada sobre los efectos cooperativos de la interacciones proteína-ligando procede de los estudios de IHD a alta resolución mediante RMN-2D, lo cuales, aunque relativamente escasos, son cada vez más frecuentes (Kranz, J. K. et al., 2002), (Wang, C. et al., 2001), (Williams, D. C., Jr. et al., 1996), (Engen, J. R. et al., 1999), (Gozu, M. et al., 2002), (Kalodimos, C. G. et al., 2002), (England, J. J. et al., 1998), (England, S. W. et al., 1992).

Una forma relativamente simple de diseccionar la transmisión de interacciones a través de la estructura de una proteína consiste en producir una perturbación energética localizada en un punto concreto de la estructura, por ejemplo mediante la realización de una mutación de un determinado residuo de la proteína localizado en la superficie de la misma, y analizar cómo la estabilidad del resto de las regiones de la proteína se ve afectada por dicha perturbación. Esta metodología, que fue originalmente propuesta para su aplicación teórica mediante el algoritmo COREX (Hilser, V. J. et al., 1998), tiene su contrapunto experimental a través de los estudios de IHD combinados con mutagénesis dirigida (Casares, S. et al., 2003), (Neira, J. L. et al., 1997), (Hilser, V. J. et al., 1997).

El trabajo que se describe en esta Memoria está basado fundamentalmente en esta concepción termodinámico-estadística del estado nativo de las proteínas y trata de constituir una aportación experimental a este ámbito de estudio de la estabilidad regional y la cooperatividad de las estructuras proteicas, centrándose en el pequeño dominio SH3-Spc. Para ello, como técnica fundamental hace uso de las medidas de IHD mediante RMN-2D.

En la primera parte del trabajo las medidas de IHD por RMN-2D se combinan con la mutagénesis dirigida para el análisis experimental de las rutas de transmisión cooperativa de interacciones a través del dominio SH3-Spc. Dicha información se ha complementado de manera exhaustiva con información de tipo estructural proporcionada por la RMN o la cristalografía de rayos X, y termodinámica, a través de

estudios de estabilidad global mediante la calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los resultados de esta primera parte del trabajo sirven para sustentar la interpretación de los resultados de una segunda parte que analiza los efectos cooperativos de la unión de un ligando peptídico al mismo dominio, combinando de nuevo los experimentos de IHD con el análisis termodinámico, macroscópico, y el estructural proporcionado por los estudios de RMN.

3. OBJETIVOS.

3. OBJETIVOS DE LA TESIS.

La finalidad global perseguida en la línea de trabajo en que se enmarca esta Tesis consiste en comprender las relaciones existentes entre la estabilidad termodinámica local y global de las proteínas, así como entre la energética de sus interacciones internas o con ligandos externos y la transmisión cooperativa de tales interacciones a través de la estructura. Este trabajo se encuadra en el seno de un proyecto de investigación que persigue profundizar en la comprensión de los determinantes termodinámicos, dinámicos y estructurales de las interacciones proteína-ligando con el fin de incorporar este conocimiento en las metodologías de diseño de ligandos.

El objetivo general de este trabajo consiste en profundizar en la comprensión de los fenómenos de cooperatividad energética y estructural del dominio SH3 de α -espectrina (SH3-Spc), inducidos bien mediante perturbaciones energéticas locales mediante mutaciones puntuales, o bien a través de la interacción de un ligando peptídico rico en prolina con el sitio de unión del dominio.

Los resultados de este estudio deben ser útiles para comprender mejor las características termodinámico-estructurales de este tipo de interacción proteína-ligando de gran relevancia biológica, así como los mecanismos por los que dicha interacción de propaga cooperativamente a través de la estructura proteica.

Como objetivos específicos se enumeran los siguientes:

1. Diseñar, clonar, expresar y purificar una serie de mutantes del dominio SH3-Spc con la intención de introducir cambios energéticos localizados en puntos concretos de la superficie de su estructura que modifiquen la estabilidad del dominio.
2. Estudiar los cambios producidos por tales perturbaciones energéticas sobre las magnitudes termodinámicas que caracterizan la estabilidad térmica global del dominio SH3-Spc.

3. Analizar el mecanismo por el que cada tipo de perturbación energética local es transmitida a través de la red de interacciones cooperativas del dominio al resto de su estructura.
4. Investigar los posibles cambios en la estructura tridimensional del dominio inducidos por las mutaciones.
5. Determinar el efecto de las mutaciones sobre la capacidad funcional del dominio en lo referente a su afinidad por un decapeptido rico en prolina (APSYSPPPPP, p41), seleccionando el mutante con afinidad óptima por dicho ligando.
6. Medir las magnitudes termodinámicas de la unión del p41 al mutante seleccionado.
7. Estudiar la forma en que las interacciones establecidas entre el ligando p41 y el sitio de unión se transmiten cooperativamente al resto de la estructura, comparando la transmisión de este tipo de interacciones con la de las perturbaciones locales estudiadas anteriormente.



4. MATERIALES Y MÉTODOS.



4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. Materiales y Reactivos.

4.1.1. Sistemas Biológicos.

En este trabajo se ha abordado el estudio desde un punto de vista termodinámico del dominio SH3 de α -espectrina, tanto en su forma natural (WT) como de diversos mutantes descritos a continuación, todos ellos diseñados, producidos y purificados en nuestro laboratorio:

- Mutantes en el aminoácido asparagina 47, localizado en el lazo distal del dominio, de los cuales se han estudiado las variantes N47A, en la que la asparagina de origen se ha sustituido por una alanina, y N47G, en la que se ha realizado el cambio por una glicina.

- Mutantes en el aminoácido alanina 56, localizado al comienzo de la vuelta de hélice 3_{10} , de los que se han escogido para su estudio las variantes A56G, en la que la alanina original se ha cambiado por una glicina, y A56S, en la que la sustitución llevada a cabo ha sido por una serina.

- Mutantes en el aminoácido arginina 21, situado en el “lazo RT”, que conecta las láminas β_a y β_b . De ellos se han elegido para su estudio las variantes R21A, en la que se ha sustituido la arginina original por una alanina y R21G, donde el cambio ha sido a glicina.

4.1.2. Reactivos.

- Los siguientes productos se obtuvieron de la casa comercial *MERCK*: glicina, fosfato sódico dibásico y monobásico, carbonato sódico, azul de

bromofenol, glicerol, ácido acético (96 %), 2-mercaptoetanol y la urea utilizada en las purificaciones de los mutantes.

- De la casa *PANREAC* son: el metanol y el ácido clorhídrico (35 %, químicamente puro) y el sulfato amónico sólido.
- De la casa *SIGMA* se han adquirido: el aceite mineral para las reacciones en cadena de la polimerasa, el isopropil β -D-thiogalactopiranosido (IPTG) y la ampicilina (sal sódica), la disolución comercial al 30% de acrilamida/Bis-acrilamida (29:1), el Coomassie Brilliant Blue R, la disolución de bromuro de etidio, el Trizma base y el persulfato sódico (APS). Éste último se conserva en el desecador por descomponerse en presencia de agua. Para los experimentos de IHD se usaron óxido de deuterio, el cloruro de deuterio y deuterohidróxido sódico, también de esta casa comercial.
- También se empleó isopropil β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) de la casa comercial *CALBIOCHEM GmbH*.
- Para los experimentos de IHD se utilizó también glicina-d₅ (deuterada), de los laboratorios Cambridge Isotope Inc.
- De *BIORAD* es la agarosa empleada para preparar los geles de electroforesis para las muestras de ADN.
- 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 la casa *ROCHE BIOCHEMICALS* son: la mezcla de los nucleótidos (dNTP's), de concentración 10 mM, la Taq ADN-polimerasa (5 U/ μ L, 250 U totales) y su tampón de dilución (a concentración 10x) utilizadas en las RCP, así como 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/ μ L) (Rapid Ligation Kit) y la batería de reactivos empleados para la purificación de los plásmidos (*High Pure® Plasmid Isolation Kit*).

- 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/ μ L).
- El enzima de restricción *HindIII* (15 U/ μ L) es de la casa *PHARMACIA*.
- De *QIAGEN* se ha adquirido la batería de reactivos empleados en la purificación de los productos de la RCP (PCR Purification Kit, Qiaquick®).
- Las células competentes utilizadas en las transformaciones de la cepa XL10-Gold® 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 obtenido, mediante síntesis química, y han sido proporcionados por la casa comercial AMERSHAM BIOSCIENCES (Barcelona).
- 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 μ m de *SARSTEDT*. De esta misma casa son los filtros de 0.45 μ m de tamaño de poro empleados para filtrar los extractos celulares antes de purificarlos mediante cromatografía.
- Para las diálisis de las disoluciones del dominio SH3 se utilizaron membranas de Spectra-Por® (3.5 kDa de "cut-off"), que se preparan previamente mediante calentamiento en agua ultrapura tres veces hasta 70°C. Se almacenan a 4°C en disolución acuosa de azida sódica al 0.02%.
- El agua ultrapura empleada 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 Plus® (*MILLIPORE*). Las disoluciones tampón se han filtrado a través de filtros Millipore de 0.45 μ m.

- Los tubos de RMN de 5 mm, modelo 528-PP, fueron comparados de la casa comercial *WILMAD*.

Finalmente, indicar que para la sobreexpresión del dominio SH3 en *E. coli*, el medio de cultivo LB (Laura-Bertani), utilizado para el crecimiento de las células está compuesto de (para 1 litro de medio):

- 10 g de Triptona Peptona de la casa *DIFCO*.
- 5 g de extracto de levadura de la casa *DIFCO*.
- 5 g de cloruro sódico de la casa *MERCK*.

Para la preparación de las placas de siembra en las que se hicieron crecer las colonias de *E. coli* transformadas (ver aptdo. 4.7.8.), se empleó como medio, LB común, como el indicado anteriormente, pero se le adicionaron además 15g de Bacto agar de la casa *DIFCO* por cada litro de medio preparado.

El resto de los reactivos empleados en la preparación de las muestras fueron así mismo de la máxima pureza disponible.

4.1.3. Instrumentación.

El desarrollo del trabajo realizado ha supuesto la utilización de diversos instrumentos tal y como se describe a continuación:

La concentración de las muestras de los diferentes dominios cuyo estudio se recoge en la presente tesis, se determinó a partir de los espectros ultravioleta-visible obtenidos con el espectrofotómetro de doble haz modelo V-530, de la casa comercial *JASCO*. De forma puntual, también se realizaron medidas con un espectrofotómetro de haz simple, modelo DU-70, de la casa comercial *Beckman*.

Las medidas de pH de las diferentes disoluciones tampón empleadas se realizaron por medio de electrodos combinados de vidrio *Crison* de dos tamaños

diferentes, uno de diámetro de bulbo 10mm, modelo 52-03, para medidas de grandes volúmenes, y otro de diámetro de bulbo 3mm, modelo 52-09, para medidas de pequeños volúmenes, fundamentalmente disoluciones de proteína. Ambos electrodos se encontraban conectados a un pHmetro *Crison* modelo Basic 20, equipado con célula de temperatura para mayor sensibilidad en la medida. La sensibilidad proporcionada por ambos electrodos es de ± 0.01 unidades de pH. La calibración del pHmetro se realizó de forma sistemática con disoluciones tampón estándar *Crison*.

La esterilización de todo el material necesario para los cultivos celulares se llevó a cabo en un autoclave de la casa comercial *Selecta*.

Para la termostatación durante el crecimiento de las colonias de *E.Coli* en placa se utilizó una estufa de cultivos de la casa comercial *Selecta*, adaptada para trabajar dentro de un intervalo de temperaturas comprendido entre 20 y 80 °C. Por otro lado, los cultivos celulares en matraces de 2 L se realizaron en un baño termostatación con agitación modelo SBD-50, de la casa comercial *Heto*.

Durante el proceso de purificación de los diferentes dominios se llevaron a cabo diversas centrifugaciones empleándose para ello las centrífugas siguientes: centrífuga *Kokusan* modelo H-251, con un rotor M1 (8000 rpm) y ultracentrífuga *Beckman* L5-40 con un rotor R35 (30.000 rpm). Para la centrifugación de pequeños volúmenes de muestra, se empleó una centrífuga de mesa para tubos tipo *Eppendorf* de la casa comercial *Hettich*, modelo EBA-12.

La lisis de los cultivos celulares se realizó por medio de una prensa French de la casa comercial *Sim-Aminco*.

Para llevar a cabo las electroforesis, se empleó el sistema *Mighty-Small II* modelo SE-250, conectado a una fuente de tensión variable modelo PS500XT, ambos de la casa comercial *Hoefer Scientific Instruments*.

El sistema de cromatografía líquida empleado para la purificación de las diferentes muestras de proteína es de la casa *Pharmacia-LKB*, constituido por los siguientes componentes: una bomba peristáltica de velocidad de flujo variable, modelo

Microperpex 2132, una columna cromatográfica preparativa de exclusión molecular Hi-Load Superdex 75, XK-26, un detector UV-VIS de longitud de onda fija (280nm) y un colector de fracciones RediFrac 100 asociado.

Las muestras cuya preparación así lo requiera, se liofilizaron en un liofilizador de la casa comercial *Heto*, modelo FD 1.0.

Para los experimentos de Calorimetría Diferencial de Barrido se empleó el microcalorímetro de la casa comercial *Microcal Inc.*, modelo VP-DSC. Los experimentos de Calorimetría Isotérmica de Titulación, se realizaron en un microcalorímetro modelo ITC- Ω , automatizado con un sistema de control externo MCS (MicroCal System), también de la casa comercial *Microcal Inc.*

Los experimentos de Fluorimetría se llevaron a cabo en un fluorímetro de la casa comercial *Perkin-Elmer* modelo LS-55B.

Todos los experimentos de resonancia magnética nuclear con la excepción de los que se realizaron para estudiar la unión del ligando peptídico p41 al dominio R21A, se llevaron a cabo en el Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada, empleando para ello un espectrómetro de RMN de 500MHz de la casa comercial *Bruker* modelo AMX-500. Los experimentos encaminados a estudiar la unión del p41 al dominio R21A, se llevaron a cabo en un espectrómetro de la casa comercial *Bruker* modelo OXFORD-750 Avance, de 750MHz, del Bijvoet Centre for Biomolecular Research de la Universidad de Utrecht, en Holanda. El procesamiento y análisis de los espectros de RMN se llevó a cabo en un estación de trabajo Silicon Graphics O2-10000, utilizando los paquetes de software NMRPipe (Delaglio, F. et al., 1995) y NMRView (Johnson & Blevins, 1994), con el permiso de los autores.

4.2. Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB).

4.2.1. Introducción a la calorimetría diferencial de barrido.

Se considera de forma generalizada que la Calorimetría Diferencial de Barrido, comúnmente conocida por su acrónimo inglés **DSC** (“**Differential Scanning Calorimetry**”), es la técnica experimental más adecuada y precisa para el estudio y caracterización termodinámica de los cambios conformacionales inducidos por temperatura en proteínas (Privalov y Khechinashvili, 1974); (Privalov y Potekhin, 1986), ácidos nucleicos (Privalov y Filimonov, 1978) y biomembranas (Mabrey et al., 1978); (Bach y Chapman, 1980). Podemos encontrar revisiones recientes sobre esta técnica y sus aplicaciones en las referencias siguientes, que recopilan los aspectos formales, metodológicos y de análisis de esta técnica: (Privalov, 1989); (Chowdry y Cole, 1989); (Freire et al., 1990); (Cooper y Johnson, 1994; Cooper y Johnson, 1994) y (Sanchez-Ruiz, 1995).

Un experimento de DSC consiste en registrar la capacidad calorífica aparente de una disolución de una macromolécula como una función continua de la temperatura, lo que generalmente recibe el nombre de *termograma*. El termograma de una macromolécula se caracteriza generalmente por un “pico” de absorción de calor que, según el segundo principio de la Termodinámica (supuesto el sistema en equilibrio), se corresponde con un proceso endotérmico (transición) inducido por el aumento de la temperatura.

El posterior procesamiento del termograma dicha magnitud nos permitirá, siempre que el sistema molecular esté bien definido, la determinación de los todos los parámetros termodinámicos asociados a la transición inducida por el aumento de la temperatura: los incrementos de entalpía, ΔH , de entropía, ΔS , de energía de Gibbs, ΔG y de capacidad calorífica, ΔC_p . Asimismo se puede determinar la capacidad calorífica parcial de la macromolécula. El conocimiento de los valores de estos parámetros termodinámicos y su dependencia con las condiciones experimentales tales como pH, fuerza iónica, naturaleza del disolvente, presencia de ligandos, etc., unido al conocimiento de la estructura tridimensional de las macromoléculas, la posibilidad de

inducir cambios mediante mutaciones específicas, así como la modelización computacional, nos permite interpretar la energética de los procesos de plegamiento/desplegamiento en términos de los cambios estructurales asociados.

4.2.2. El Calorímetro Diferencial de Barrido.

Desde hace más de veinte años, la microcalorimetría se ha venido utilizando para el estudio y caracterización termodinámica de biopolímeros de varios tipos, particularmente de proteínas y de ácidos nucleicos, por lo que el desarrollo instrumental de la técnica ha estado condicionado por el creciente interés en el estudio de dichas macromoléculas en disolución. Así, el objetivo primordial de la técnica es el estudio de macromoléculas *in vitro*, en condiciones similares a las fisiológicas pero de manera que las únicas especies moleculares presentes sean el biopolímero, el agua como disolvente y otros cosolventes tales como sales, tampones y agentes caotrópicos que se emplean para fijar el pH, establecer la fuerza iónica o modificar la estabilidad del biopolímero.

La purificación de las macromoléculas es una tarea compleja, normalmente se obtienen cantidades pequeñas y aún en el caso de disponerse de grandes cantidades, las muestras deben prepararse a bajas concentraciones (unos pocos mg/mL) para poder considerar despreciables las interacciones intermoleculares y evitar agregaciones inespecíficas. Más aún, los volúmenes de muestra que se utilizan son también pequeños, dado que la viscosidad de las mismas dificultaría su homogeneidad térmica y haría necesaria su agitación, lo que iría en detrimento de la sensibilidad y la precisión en la medida.

Considerando todo lo expuesto anteriormente, los calores puestos en juego en los procesos implicados serán muy pequeños lo que, unido a la necesidad de realizar el barrido de temperatura a velocidades muy bajas para evitar así posibles gradientes de temperatura, hacen necesario disponer de elevada sensibilidad, precisión y fiabilidad. Hoy en día podemos disponer de este tipo de instrumentos gracias a los trabajos de diversos autores desde hace más de dos décadas (Privalov, 1965); (Wadsö, 1970);

(Sturtevant, 1974); (Mabrey et al., 1978) y (Privalov, 1980). Todos estos microcalorímetros presentan ciertas características comunes entre las cuales, tenemos:

- Miden la capacidad calorífica de forma diferencial, esto es miden la diferencia de capacidad calorífica entre dos células que han de ser lo más idénticas posible (principio de células “gemelas”).
- El barrido de temperatura se realiza de forma continua, calentando o enfriando la muestra a una velocidad constante, lo que supone la dificultad añadida de conseguir que la muestra se encuentre en todo momento en equilibrio térmico (aquí juega un papel esencial el diseño de las células), para lo cual la velocidad de barrido no suele ser superior a 2 K/min.
- Funcionan en modo adiabático, como veremos a continuación.
- Disponen de un sistema de presurización para evitar la formación de burbujas, que producen grandes artefactos en la medida, lo que además permite trabajar a temperaturas superiores a la de ebullición e inferiores a la de fusión.
- No disponen de sistema de agitación mecánica alguno, para evitar de esta manera, el calor por efecto Joule que introduciría una perturbación térmica del mismo orden o incluso mayor, que el calor que se ha de medir. La ausencia de agitación facilita así mismo la hermeticidad precisa para presurizar las células.

Un microcalorímetro diferencial de barrido consta básicamente de dos células gemelas, una de ellas (*referencia*) contiene sólo el disolvente del biopolímero y la otra (*muestra*) contiene la disolución del biopolímero en estudio. Ambas células se encuentran rodeadas de una coraza metálica que las aísla del exterior y se encarga de mantenerlas en un entorno prácticamente adiabático. La temperatura de dicha coraza se encuentra a su vez finamente controlada por una serie de termosensores (termopilas de

uniones bimetálica o de semiconductor) y efectores (resistencias eléctricas laminares) que la mantienen a una temperatura muy próxima a la de las células.

Durante el barrido, en ambas células se disipa la misma potencia térmica mediante la alimentación de una intensidad de corriente idéntica a dos resistencias de idéntico valor en contacto íntimo con la superficie de cada célula. Dicha intensidad está determinada por la velocidad de barrido de temperatura que se haya seleccionado. La medida de la diferencia de capacidad calorífica entre ambas células se lleva a cabo mediante un método de compensación simétrica, de modo que, en ausencia de cualquier tipo de efecto térmicamente inducido, la temperatura de ambas células evoluciona de igual manera. Ahora bien, la aparición de un efecto de este tipo en una célula “retarda” su temperatura con respecto a la de la otra, diferencia de temperatura que es detectada por un sensor de temperatura (una termopila de elevada sensibilidad de múltiples uniones bimetálica o de semiconductor). La señal eléctrica de ésta última se emplea como señal de error en el sistema de retroalimentación que suministra una potencia eléctrica adicional a la resistencia calefactora de la célula más fría para conseguir de este modo, restablecer la igualdad de temperaturas entre ambas células. De esta manera, las dos células se mantienen prácticamente a la misma temperatura durante todo el barrido.

Considerando una velocidad de barrido de temperatura constante, el exceso de potencia eléctrica disipada en la célula de medida es directamente proporcional a la diferencia de capacidad calorífica entre ambas células y constituye la magnitud fundamental que se mide en este instrumento.

Existen varias compañías que comercializan microcalorímetros de estas características en la actualidad, pero para la realización de los experimentos de esta tesis tan sólo se ha empleado el microcalorímetro **VP-DSC** (Valery Plotnikov Differential Scanning Calorimeter), de Microcal Inc., representado en la figura siguiente, fig. 4.2.1., cuyas características lo hacen muy adecuado para el estudio de biopolímeros en disolución.

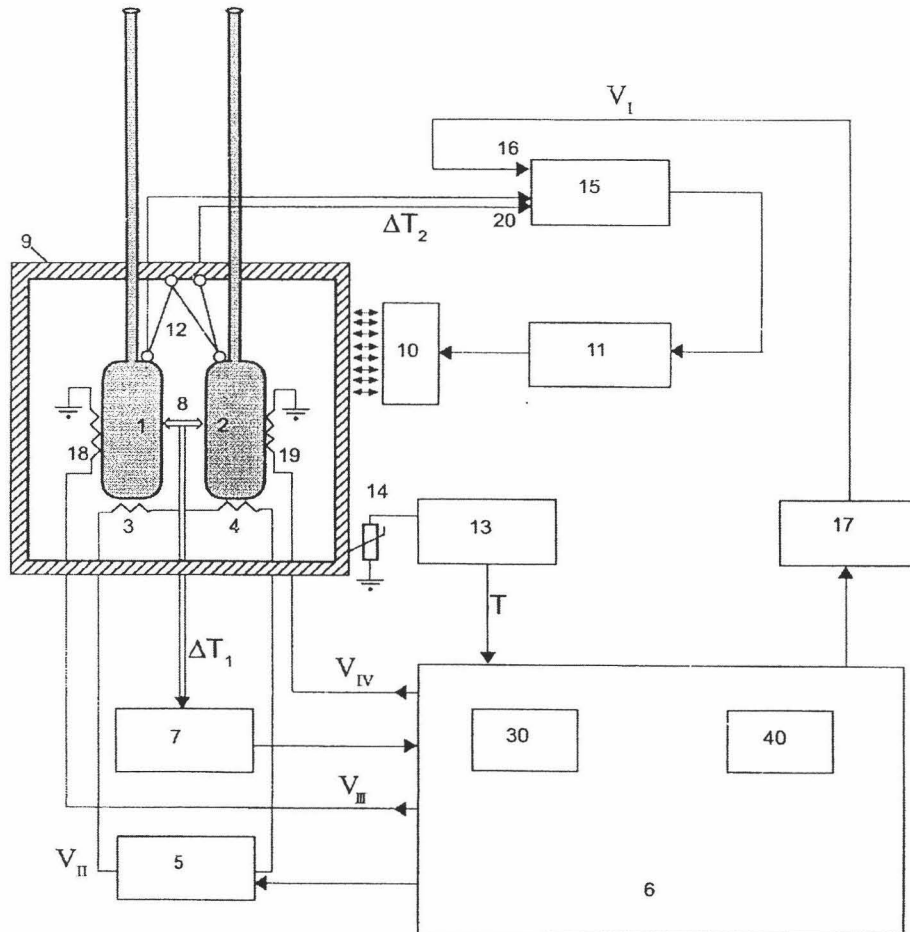


Fig. 4.2.1.: Representación esquemática del calorímetro diferencial de barrido VP-DSC: (1,2) Células de muestra y referencia con los tubos capilares de entrada para el llenado y limpieza; (3,4) calentadores principales situados sobre las células, controlados por el voltaje V_{II} de la fuente de alimentación (5). Ésta a su vez está conectada al computador (6) a través de una tarjeta convertora analógico/digital (A/D) (30), (18,19) elementos auxiliares de calentamiento, activados a través de la tarjeta A/D (30), utilizados en la calibración y en el modo de retroalimentación; dispositivo de medida del efecto térmico (7) y sensor de cristal (8) para medir la diferencia de temperatura ΔT_1 entre las dos células. Rodeando a las dos células se encuentra una coraza (9) con dispositivos de calentamiento/enfriamiento (10) dirigidos por un controlador (11), que responde a una señal que procede de un sistema de amplificación (15). El amplificador recibe, a su vez, una señal entrante en un terminal (20) procedente del sensor (12) que mide la diferencia de temperatura ΔT_2 entre las células y la coraza. El otro terminal (16) recibe un voltaje V_I de la fuente de alimentación (17), controlada por el computador a través de la tarjeta A/D (30). La coraza tiene además un dispositivo (13) para la medida de temperaturas absolutas activado mediante un sensor (14) dispuesto en la coraza térmica, de manera que la señal que sale de él pasa por el computador a través de la tarjeta A/D (30). Las señales calibradas de entrada al computador (que corresponden a ΔT_1 y ΔT_2), así como la temperatura absoluta T son seguidas continuamente durante el experimento y almacenadas en la memoria del computador (40) a intervalos señalados por el operador.

Entre sus características principales destacan la geometría de sus células, que es en forma de moneda y se encuentran soldadas a sendos tubos capilares de llenado de 1.5 mm de diámetro interno. Esta geometría permite un gran contacto entre la muestra y la

superficie de la célula, con lo que se incrementa la sensibilidad. Dichas células están fabricadas en una aleación de tantalio, denominada comercialmente *Tantaloy 61*, de cualidades químicas próximas a las del vidrio, con lo que resulta prácticamente inerte frente a la acción de muchas sustancias, en especial a casi todos los ácidos, pero resulta ser sensible al ataque por álcalis concentrados.

El volumen efectivo de ambas células es de aproximadamente 0.532 mL y su intervalo operativo de temperatura oscila entre los -10 y los 130°C . Es capaz de registrar barridos de temperatura, tanto en incremento o como en descenso (en este caso de manera no adiabática) con una velocidad de barrido que puede ser seleccionada por el operador y que oscila entre 0 y 2 K/min. Este microcalorímetro emplea un mecanismo Peltier interno, de modo que no precisa de ningún dispositivo exterior de calentamiento o enfriamiento. Además dispone de la capacidad de trabajar en modo isoterma (*isoscan*) que resulta extremadamente conveniente para el seguimiento de cinéticas o para la determinación de la estabilidad de cualquier fármaco o compuesto químico, sólo limitado por el espacio que quede libre en el dispositivo de almacenamiento de datos (disco duro del ordenador). Para permitir trabajar a temperaturas superiores a la de ebullición, dispone de un sistema de presurización que permite alcanzar presiones de hasta 35 psi, con lo que se evita de esta manera la ebullición de la muestra en la célula. Las principales ventajas de este calorímetro son su elevada sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad. Ha visto mejorada su relación señal/ruido así como la repetitividad del sistema en un orden de magnitud con respecto a los calorímetros de la década anterior. Finalmente hay que decir que el VP-DSC está gobernado por un ordenador PC estándar, preconfigurado y calibrado por la casa comercial en origen, por lo que no precisa de ningún ajuste previo para su funcionamiento.

4.2.3. Realización del experimento calorimétrico.

Las muestras empleadas para la realización de un experimento de DSC han de prepararse de forma muy rigurosa, poniendo especial cuidado en la pureza de las mismas, su filtrado o centrifugado y en la comprobación de su pH final. Hay que tener

en cuenta que la determinación de la concentración exacta de la muestra es esencial ya que la incertidumbre en esta variable supone un error inevitable en las magnitudes termodinámicas resultantes del experimento.

Debido a que las dos células calorimétricas, aunque gemelas, no son exactamente idénticas, se ha de registrar un termograma con las dos células rellenas con disolución tampón pura. Dicho termograma, al que se denomina *línea base instrumental*, recoge la contribución de dicha asimetría así como otros factores instrumentales. Por otra parte, puede ser necesario registrar varias líneas base instrumentales consecutivas antes de registrar el termograma de la muestra, con el mismo ciclo térmico y los mismos parámetros instrumentales, para asegurarnos de que la reproducibilidad del instrumento esté dentro de las especificaciones técnicas, que es de $\pm 2 \mu\text{cal} / \text{grado}$ en el caso del VP-DSC.

Acabada la línea base se llenará entonces la célula de muestra con la disolución de proteína dializada y la de referencia con el tampón. La obtención del termograma se realizará calentando en las mismas condiciones empleadas para registrar la línea base, manteniendo el ciclo térmico.

De forma general, el termograma de DSC de una proteína es una curva que contiene uno o varios picos de absorción de calor (endotérmicos). Para el caso más sencillo de que la proteína sufra una única transición altamente cooperativa, el perfil del termograma contiene un único pico de absorción de calor asociado a la desnaturalización de la proteína inducida por la temperatura. Los valores de la señal en la zona *pre* y *postransicional* se corresponden a las capacidades caloríficas de los estados *nativo* ($C_{p,N}$) y *desnaturalizado* ($C_{p,D}$) de la proteína. Es importante resaltar que el termograma de la muestra aparece normalmente por debajo de la línea base debido a que la capacidad absoluta de la proteína es menor que la del agua que desplaza en la disolución (Privalov y Khechinashvili, 1974). Una vez restada la línea base al termograma de muestra se puede determinar los parámetros más significativos de la transición calorimétrica, tal como se observa en la fig. 4.2.2.

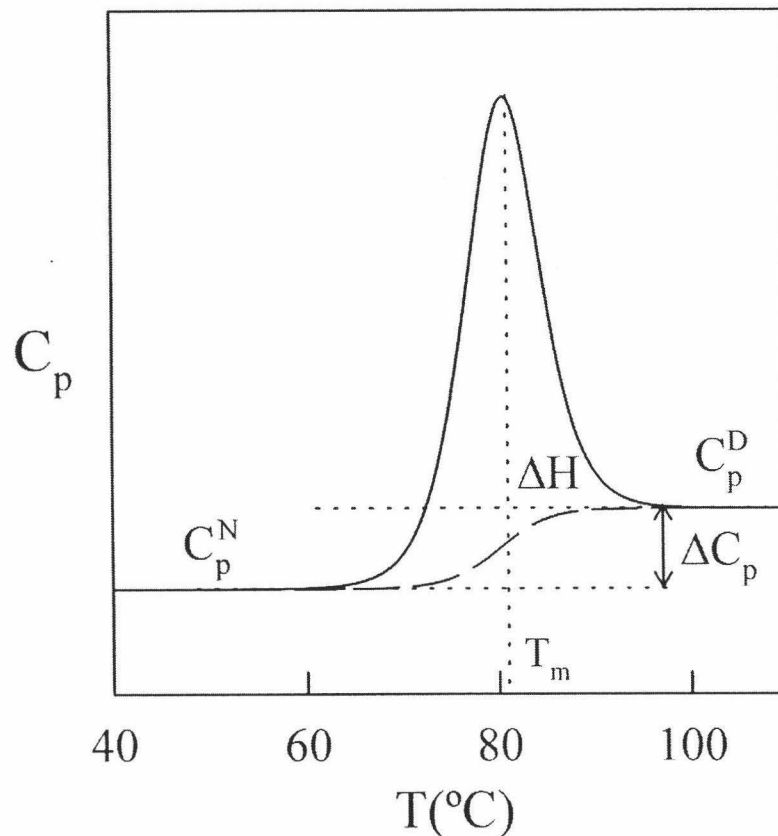


Fig. 4.2.2.: Representación gráfica de un termograma. En el se representa la curva de capacidad calorífica (trazo continuo) en función de la temperatura, para el proceso de desnaturalización térmica de una proteína hipotética sencilla C_p^N representa la capacidad calorífica del estado nativo y C_p^D la del estado desplegado. En trazo discontinuo se representa también la capacidad calorífica intrínseca. El área encerrada entre ambas curvas es la entalpía de desnaturalización, ΔH . T_m es la temperatura a la que se localiza el máximo de la transición y ΔC_p es el incremento de capacidad calorífica que existe entre ambos estados, nativo (N) y desplegado (D).

Tras registrar el primer termograma, es conveniente registrar aún otro más sin extraer la muestra de la célula, en las mismas condiciones en que se registró el anterior, con objeto de determinar el grado de *reproducibilidad* de la transición y para verificar que el proceso (o transición) ocurre en equilibrio termodinámico. No obstante, existen criterios más fiables para comprobar si la transición se corresponde con un proceso en

equilibrio o no (Sanchez-Ruiz et al., 1988); (Conejero-Lara et al., 1991; Conejero-Lara et al., 1991).

4.2.3.1. Cálculo de la capacidad calorífica molar parcial de la proteína.

Se puede obtener la capacidad calorífica molar parcial de la proteína a partir de la diferencia de capacidad calorífica relativa entre la disolución de la macromolécula y la de del disolvente que la contiene. Dicha diferencia, que es normalmente negativa debido al volumen de disolvente excluido por la macromolécula en disolución como ya se ha establecido, se describe como (Privalov y Khechinashvili, 1974):

$$\Delta C_{p,ap}(T) = C_{p,ap}(T) \cdot m_p - C_{p,s}(T) \cdot \Delta m_s \quad (4.2.1.)$$

donde $C_{p,ap}(T)$ y $C_{p,s}(T)$ son las capacidades específicas parciales aparentes de la proteína en disolución y del disolvente respectivamente, m_p es la cantidad de proteína en la célula calorimétrica y Δm_s la cantidad de disolvente desplazado por la proteína en disolución. Teniendo en cuenta además que:

$$\Delta m_s = m_p \cdot \frac{V_p(T)}{V_s(T)} \quad (4.2.2.)$$

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

$$C_{p,ap}(T) = C_{p,s}(T) \cdot \frac{V_p(T)}{V_s(T)} - \frac{\Delta C_{p,ap}(T)}{m_p} \quad (4.2.3.)$$

Dado que generalmente se trabaja con disoluciones acuosas, se considera que la capacidad calorífica del disolvente y su volumen específico son los del agua pura y aproximadamente independientes de la temperatura, $1 \text{ cal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ y $1 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ respectivamente (Privalov y Potekhin, 1986). Así:

$$C_{p,ap} (T) (\text{kJ} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}) = 4.186 \cdot 10^{-3} \cdot V_p (T) \cdot M + \frac{C_{p,ap} (T)}{C \cdot V_{cel}} * \phi \quad (4.2.4.)$$

En esa ecuación, M es el peso molecular de la proteína en Dalton, C es la concentración de la proteína en la disolución (en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), V_{cel} es el volumen de la célula del calorímetro y ϕ es un factor intrínseco al experimento y al instrumento, que depende de la velocidad de barrido ($v = 1 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$, en nuestro caso) y las constantes de calibración propias del instrumento (prefijadas de fábrica en este microcalorímetro VP-DSC).. Se puede considerar que el volumen específico de la disolución de proteína, V_p , es de $0.73 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$, valor promedio para proteínas globulares, tal y como demostraron los cálculos de (Makhatadze y Privalov, 1990), a partir de los volúmenes específicos de cada aminoácido.

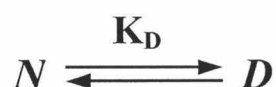
4.2.3.2. Análisis de las trazas calorimétricas.

Del análisis de la capacidad calorífica molar parcial de la proteína como una función de la temperatura podremos extraer los parámetros termodinámicos del proceso de desnaturalización térmica, para lo cual, considerando que el proceso es reversible, deberemos aplicar un modelo de equilibrio. A continuación explicaremos brevemente el más sencillo de ellos, el *Modelo de Equilibrio de Dos Estados*, adecuado para analizar el desplegamiento de muchas proteínas globulares pequeñas y que es el que se ha utilizado en el análisis de los termogramas que se presentan en este trabajo.

No obstante, cuando las proteínas son más complejas, pueden aparecer procesos simultáneos o concomitantes al de desnaturalización, como pueden ser la aparición de intermediarios de plegamiento, fenómenos de asociación de la proteína, etc., que requieren el empleo de modelos de equilibrio más complejos (Xie et al., 1991); (Montgomery et al., 1993); (Thompson et al., 1993); (Conejero-Lara et al., 1994); (Sanz et al., 1994); (Azuaga et al., 1995), (Conejero-Lara y Mateo, 1996); (Filimonov y Rogov, 1996).

4.2.3.2.1. Modelo de Equilibrio de Dos Estados.

Se ha podido comprobar que para el caso de pequeñas proteínas globulares, el desplegamiento inducido por temperatura o por agentes desnaturizantes es un proceso altamente cooperativo en el que se puede considerar que sólo los estados nativo (N) y desnaturizado o desplegado (D) se encuentran significativamente poblados, por lo que dicho proceso se puede describir bien a través de un **modelo de Dos Estados**. Se puede considerar desde un punto de vista termodinámico-estadístico que los estados N y D son en realidad *macroestados* constituidos cada uno de ellos por multitud de *microestados* que difieren poco en entalpía. El modelo viene descrito por la siguiente ecuación de equilibrio:



En esta ecuación, K_D es la constante de equilibrio aparente para el proceso de desplegamiento en función de las concentraciones de los estados nativo y desplegado, así:

$$K_D = \frac{[D]}{[N]} \quad (4.2.5.)$$

Las **fracciones de proteína** que se encuentran en el estado N y en el D, son:

$$\chi_D = \frac{[D]}{[N]+[D]} = \frac{K_D}{1+K_D} \quad \text{y} \quad \chi_N = \frac{[N]}{[N]+[D]} = \frac{1}{1+K_D} \quad (4.2.6. \text{ y } 4.2.7)$$

y siendo lógicamente $\chi_N + \chi_D = 1$.

Teniendo esto en cuenta y conociendo las poblaciones de cada estado accesible al sistema, se puede determinar cualquier propiedad lineal del sistema (la proteína en disolución), X, según la ecuación:

$$\langle X \rangle = \chi_N \cdot X_N + \chi_D \cdot X_D \quad (4.2.8.)$$

De esta manera, la entalpía molar parcial de la proteína vendría dada por la expresión:

$$\langle H \rangle = \chi_N \cdot H_N + \chi_D \cdot H_D = H_N + \chi_D \cdot \Delta H_D = H_N + \frac{K_D}{1 + K_D} \cdot \Delta H_D \quad (4.2.9.)$$

donde $\Delta H_D = H_D - H_N$, esto es la diferencia de entalpía de desplegamiento. De esta manera, la capacidad calorífica molar parcial, C_p , se define como:

$$C_p = \frac{\partial \langle H \rangle}{\partial T} = C_{p,N} + \frac{\Delta H_D}{(1 + K_D)^2} \left[\frac{\partial K_D}{\partial T} \right] + \frac{K_D}{1 + K_D} \left[\frac{\partial \Delta H_D}{\partial T} \right] \quad (4.2.10.)$$

En esta ecuación, $C_{p,N}$ es la capacidad calorífica del estado nativo. Si ahora expresamos las dependencias de K_D y de ΔH_D con la temperatura, nos queda:

$$\frac{\partial \Delta H_D}{\partial T} = \Delta C_p \quad (4.2.11.)$$

$$\frac{\partial \Delta S_D}{\partial T} = \frac{\Delta C_p}{T} \quad (4.2.12.)$$

$$K = e^{\frac{-\Delta G_D}{T}} \quad (4.2.13.)$$

y así, ΔS_D , ΔG_D y ΔC_p son las diferencias de entropía, de energía de Gibbs y de capacidad calorífica entre los estados D y N respectivamente. Según los trabajos de Privalov y colaboradores (Privalov, 1989), el incremento de capacidad calorífica de desplegamiento de una proteína, incluso cuando se trate de una pequeña proteína globular, no es constante, sino que es una función no lineal de la temperatura. Dicha variación de ΔC_p con la temperatura puede ser importante en transiciones anchas. La función capacidad calorífica de una proteína desplegada se puede estimar a partir de su secuencia aminoacídica (Makhatadze y Privalov, 1990); (Privalov y Makhatadze, 1990). Así, la función $C_{p,D}(T)$ puede describirse como un polinomio de segundo grado. Por el

contrario, se puede considerar a la función $C_{p,N}(T)$ prácticamente lineal en el intervalo pretransicional, esta línea además, suele extrapolarse a temperaturas superiores.

Así, se obtienen las siguientes ecuaciones para $C_{p,D}$, $C_{p,N}$ y ΔC_p :

$$C_{p,D} = a + b \cdot T + c \cdot T^2 \quad (4.2.14.)$$

$$C_{p,N} = d + e \cdot T \quad (4.2.15.)$$

$$\Delta C_p = (a-d) + (b-e) \cdot T + c \cdot T^2 \quad (4.2.16.)$$

Una vez establecida la dependencia de ΔC_p con la temperatura, podemos integrar las ecuaciones anteriores, 4.2.14., 15 y 16 para obtener las dependencias de ΔH_D y ΔS_D con la temperatura, así:

$$\Delta H_D(T) = \Delta H_m + \int_m^T \Delta C_p \cdot dT \quad (4.2.17.)$$

$$\Delta S_D(T) = \Delta S_m + \int_m^T \frac{\Delta C_p}{T} \cdot dT \quad (4.2.18.)$$

donde ΔH_m y ΔS_m son los incrementos de entalpía y entropía de deplegamiento a la temperatura de la transición (T_m). Esa temperatura de la transición es aquella a la que χ_D se hace igual a 0.5, ΔG_D se anula y por lo tanto K_D se hace igual a 1. En ese punto, el cambio de entropía a la temperatura T_m , ΔS_m , se puede obtener según la ecuación siguiente:

$$\Delta S_m = \frac{\Delta H_m}{T_m} \quad (4.2.19.)$$

Si integramos las ecuaciones de $\Delta H_D(T)$ y de $\Delta S_D(T)$ con respecto a la temperatura, nos queda que:

$$\Delta H_D = \Delta H_m + (a-d) \cdot (T - T_m) + \frac{(b-e)}{2} \cdot (T^2 - T_m^2) + \frac{1}{3} \cdot c \cdot (T^3 - T_m^3) \quad (4.2.20.)$$

$$\Delta S_D = \frac{\Delta H_m}{T_m} + (a-d) \cdot \ln\left(\frac{T}{T_m}\right) + (b-e) \cdot (T - T_m) + \frac{1}{2} \cdot c \cdot (T^2 - T_m^2) \quad (4.2.21.)$$

$$\Delta G_D = \Delta H_D - T \cdot \Delta S_D \quad (4.2.22.)$$

Y así, podemos expresar la capacidad calorífica molar parcial como sigue:

$$C_p = C_{p,N} + \frac{(\Delta H_D)^2}{RT^2} \cdot \frac{K_D}{(1+K_D)^2} + \chi_D \cdot \Delta C_p \quad (4.2.23.)$$

Se denomina *curva de estabilidad* para la desnaturalización de una proteína a la representación de ΔG_D en función de la temperatura según la figura siguiente, fig. 4.2.3.

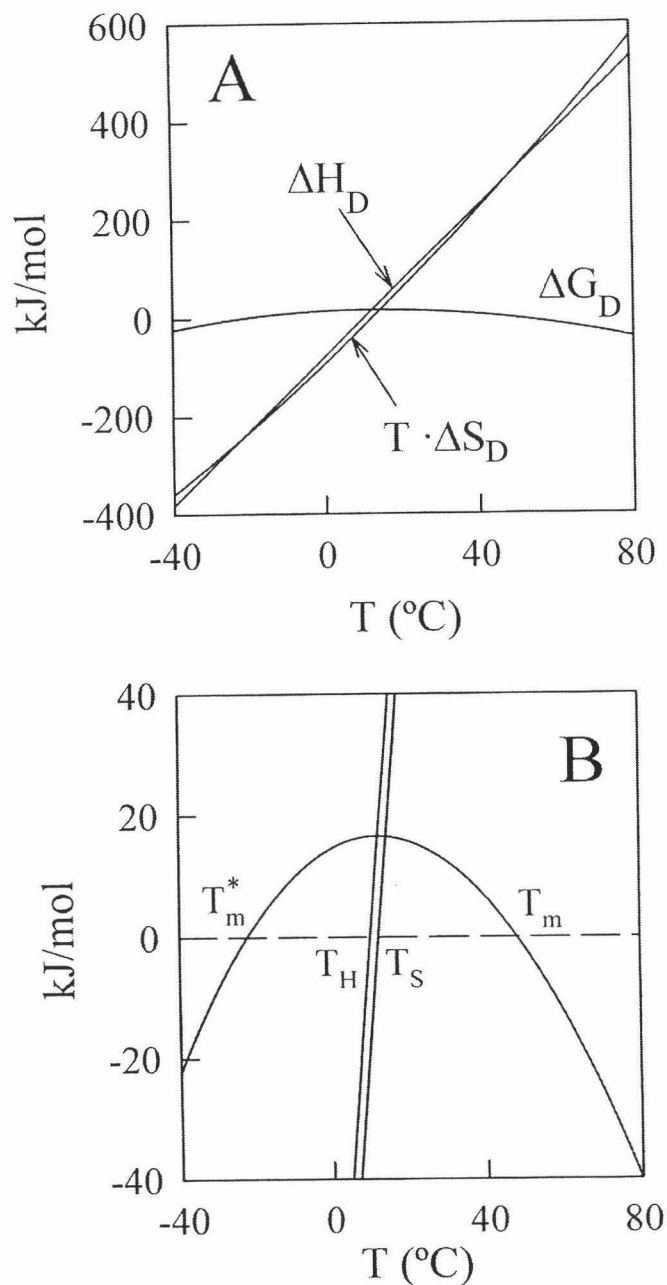


Fig. 4.2.3.: Representación de la "curva de estabilidad" de una proteína. En el panel A se representa la dependencia con la temperatura de los incrementos de entalpía, entropía y energía libre de Gibbs de desnaturalización de la misma. El panel B es una ampliación del eje de ordenadas de la gráfica del panel superior (A), que muestra las características esenciales de la curva de estabilidad de la proteína, $\Delta G_D(T)$. Se indican las temperaturas correspondientes a la desnaturalización caliente T_m , y fría, T_m^* , así como las temperaturas de inversión de entalpía T_H y T_S a las que ΔH_D y ΔS_D se hacen cero, respectivamente.

Dicha curva presenta unas características especiales:

- Su pendiente se define como $-\frac{\partial(\Delta G_D)}{\partial T} = \Delta S_D$, con un único máximo a $T=T_S$, donde ΔS_D se anula.
- Existe una temperatura a la que ΔH_D se anula y se denomina T_H . T_H es ligeramente inferior a T_S .
- Su curvatura, que se define por $\frac{\partial^2(\Delta G_D)}{\partial T^2} = -\frac{\Delta C_p}{T}$, sólo puede ser negativa porque $\Delta C_p > 0$ siempre.
- ΔG_D presenta un máximo a temperaturas bajas, próximas a la fisiológica, con lo que el estado nativo se encuentra favorecido en esas condiciones. El valor de ΔG_D a 25°C es una medida de la estabilidad de la proteína. Existen dos puntos de corte de la función ΔG_D con el eje de abscisas, T_m (temperatura de desnaturalización) y T_m^* (temperatura de desnaturalización por frío). Este último hecho fue predicho por (Brandts, 1964) y demostrado experimentalmente por (Privalov y Potekhin, 1986). Diversos estudios posteriores de DSC sugieren que se trata de una característica común de las proteínas globulares (Privalov y Potekhin, 1986); (Griko et al., 1988) y (Griko Yu et al., 1989); (Tamura et al., 1991); (Griko y Privalov, 1992); (Azuaga et al., 1992).

Sin embargo es importante tener en cuenta que toda esta formulación matemática sólo es concebible para el análisis de curvas de C_p para las que el modelo de *Dos Estados* describa bien el proceso de desnaturalización. El procedimiento comúnmente aceptado consiste en ajustar directamente por mínimos cuadrados no lineales la curva experimental de C_p al modelo de *Dos Estados*, empleando las ecuaciones 4.2.5. a 4.2.23. Se considerará pues como criterio de validez del modelo, la buena concordancia en el ajuste (Viguera et al., 1994); (Freire, 1995); (Privalov et al., 1995).

Existen ciertos autores como Karplus y colaboradores (Zhou et al., 1999) que plantean sus dudas sobre la validez del criterio calorimétrico para la aplicación del modelo de *Dos Estados* ya que se han podido ajustar a dicho modelo curvas de DSC simuladas con hasta tres estados significativamente poblados en equilibrio. Así, estos autores plantean que la DSC no siempre resulta una técnica sensible a la presencia de estados intermedios de equilibrio de plegamiento, lo cual depende de sus magnitudes termodinámicas con respecto a los estados nativo y desnaturalizado. Se hace pues necesario, para validar el modelo de *Dos Estados*, realizar otros estudios complementarios de desplegamiento de proteínas, como pueden ser la *Electroforesis en Gel* (Creighton, 1986), la *espectroscopia de Dicroísmo Circular* o de *Fluorescencia* (Filimonov et al., 1993); (Viguera et al., 1994), (Van Nuland et al., 1998); (Azuaga et al., 1999), la *Cromatografía de Exclusión Molecular* (Uversky, 1993); (Conejero-Lara y Mateo, 1996), *Ultracentrifugación Analítica* (Azuaga et al., 1995) o el *Intercambio Hidrógeno-Deuterio* (Yi y Baker, 1996); (Sadqi et al., 1999) amén de estudios cinéticos de los procesos de plegamiento y desplegamiento (Jackson y Fersht, 1991); (Viguera et al., 1994).

4.2.3.2.2. Ajuste de las curvas de capacidad calorífica molar parcial.

Tal y como se ha indicado anteriormente y siguiendo el criterio de análisis por mínimos cuadrados no lineales directo de las curvas de C_p empleando las ecuaciones del modelo elegido, se empleo el programa Origin 6.1 (Microcal Software Inc.). En el caso del análisis de las curvas de C_p para las desnaturalizaciones térmicas de los dominios SH3 cuyo estudio se recoge en esta Memoria, el modelo elegido fue el de más sencillo, el de Dos Estados.

La ecuación empleada para el ajuste fue la 4.2.23. pero antes es preciso definir todas las magnitudes de las que depende C_p en dicha ecuación, en función de la temperatura. De esta manera la C_p queda expresada en función de la temperatura y una serie de parámetros de ajuste adecuados:

- T_m , es la temperatura a la que ΔG_D se anula.

- ΔH_m , es el incremento de entalpía de desnaturalización a $T=T_m$.
- $\Delta C_{p,m}$, es el incremento en la capacidad calorífica a $T=T_m$.
- a , es la ordenada en el origen de la función $C_{p,D}$. ec. 4.2.14..
- e , es la pendiente de la función $C_{p,N}$. ec. 4.2.15..

Los parámetros b y c de la ecuación 4.2.14. se mantienen fijos en los ajustes. Se les dan los valores que se obtienen de la regresión cuadrática de los datos de $C_{p,D}$ determinados a partir de la secuencia de la proteína (Makhatadze y Privalov, 1990). Todas las demás magnitudes en las ecuaciones del modelo dependen de los parámetros anteriores, de manera que al final, la curva de C_p se ajusta sólo con cinco parámetros independientes.

4.3. Calorimetría Isotérmica de Titulación (CIT).

4.3.1. Introducción a la calorimetría isotérmica de titulación.

La Calorimetría Isotérmica de Titulación, también conocida por su denominación en inglés “**Isothermal Titration Calorimetry**” (ITC) mide directamente el calor liberado o absorbido en una reacción. Desde el punto de vista de su interés biológico, el estudio de las interacciones proteína-proteína, proteína-ligando o proteína-ADN/ARN constituyen los ejemplos más claros en los que el empleo de esta técnica está plenamente justificado (Ladbury y Chowdhry, 1996). Si el efecto térmico neto de la interacción es suficientemente grande, se puede llegar a determinar sin ambigüedad la *estequiometría*, la *entalpía de formación* y la *constante de unión* de estos complejos. Se puede pues determinar tanto la *energía de Gibbs* de formación de estos complejos así como su entropía:

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K \quad (4.3.1.)$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (4.3.2.)$$

Además se puede llegar a determinar el cambio de capacidad calorífica del sistema asociado al proceso de unión sin más que repetir los experimentos de titulación calorimétrica a diferentes temperaturas. Esto es extremadamente útil ya que nos permite estimar los efectos de deshidratación de grupos polares y apolares que acompañan a la formación del complejo.

La utilidad de esta técnica calorimétrica se centra en que, considerando a priori que cualquier interacción absorbe o libera calor, podemos medir directamente dicho calor a presión constante, esto es, se mide directamente la entalpía de reacción real del proceso lo cual contrasta con las medidas de entalpía aparente que se deduce de la dependencia con la temperatura de la constante de equilibrio del proceso de asociación-disociación, obtenida a partir de la ecuación de van't Hoff, con técnicas tales como la *diálisis en equilibrio*, la *ultrafiltración* o la *cromatografía de exclusión*.

Existe una base teórico-metodológica perfectamente establecida para el análisis de los datos experimentales que se obtienen de esta técnica (Christensen et al., 1973); (Wiseman et al., 1989); (Freire, 1990), con lo que en muchos casos es posible caracterizar de forma completa una interacción molecular de tal manera que es la única técnica que permite la caracterización termodinámica del sistema al tiempo que determina la estequiometría del proceso de unión. No obstante, la técnica es intrínsecamente incapaz de discernir el origen real de la interacción que origina el calor que es capaz de detectar, de tal modo que se hace precisa la ayuda de otras técnicas más específicas para interpretar los valores de los parámetros termodinámicos que se obtienen del análisis de un experimento de CIT, en términos moleculares.

4.3.2. Instrumentación.

En el desarrollo de los experimentos de titulación por CIT recogidos en esta memoria se han llevado a cabo en un microcalorímetro de titulación isotérmica del tipo *adiabático*. Se trata del modelo **ITC- Ω** , asociado a un sistema de control **MCS-2** (Microcal System-2), de la casa comercial Microcal Inc. Este tipo de calorímetros se emplean en estudios de interacciones proteína-proteína, proteína-pequeños ligandos, enzima-inhibidor, hormona-receptor, DNA-proteína, lípido-proteína, cinéticas enzimáticas y procesos de plegamiento de proteínas. En la figura siguiente, fig. 4.3.1., se representa un esquema sencillo del microcalorímetro de titulación empleado para la realización de los experimentos descritos en esta memoria:

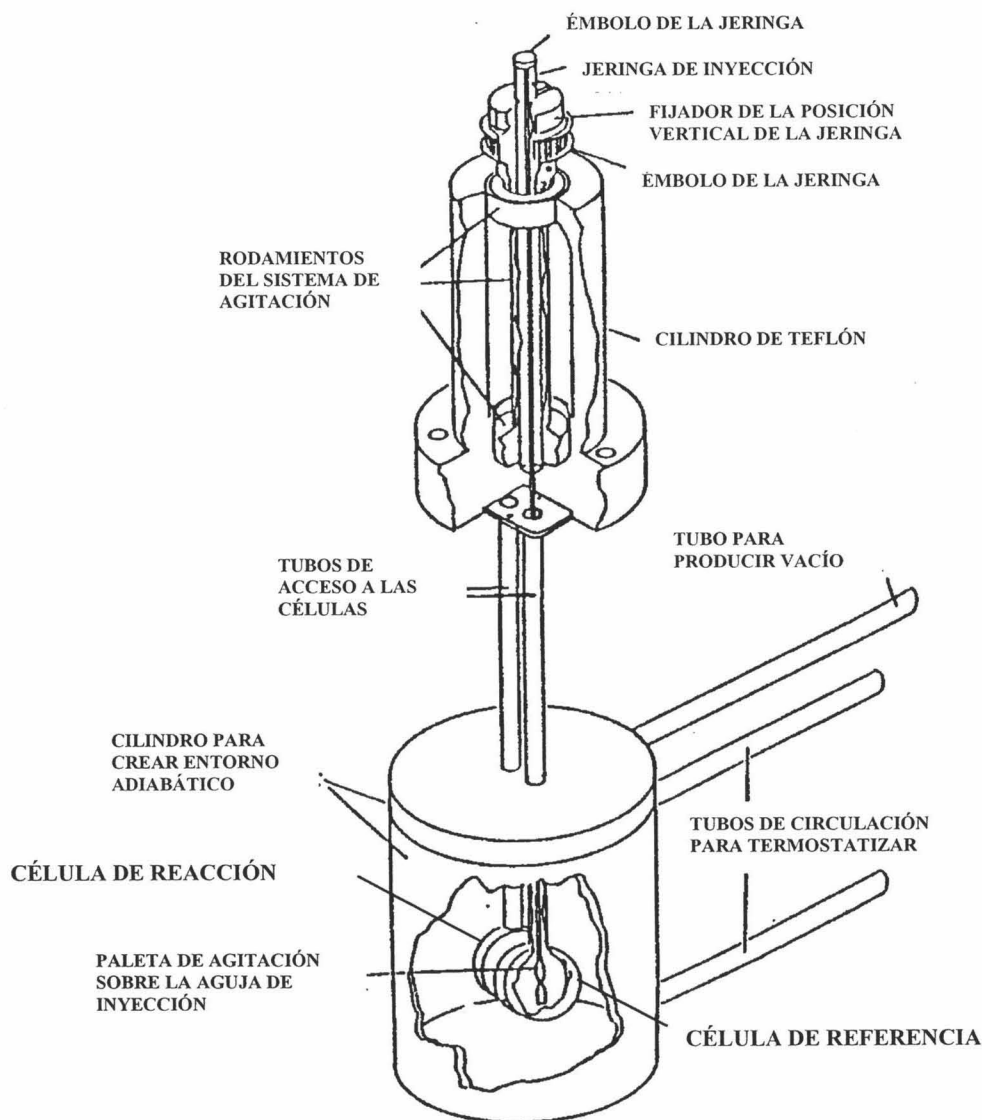


Fig. 4.3.1.: Representación esquemática del interior de un calorímetro isotérmico de titulación como el que se ha empleado para llevar a cabo los experimentos descritos en este trabajo. En este esquema se aprecian las células calorimétricas, cilindro adiabático y el conjunto agitador / inyector de un calorímetro de titulación basado en el principio de medida por compensación del efecto térmico, en un entorno adiabático.

Este calorímetro funciona por *compensación* del efecto térmico generado en la *célula de muestra* en un entorno adiabático. Se trata de un calorímetro diferencial que hace un *uso pasivo* de la *célula de referencia*, esto es, la célula de referencia sólo se llena de agua ultrapura, mientras que la célula de muestra se llena de forma completa con la disolución de macromolécula normalmente, de modo que tras cada adición de disolución de ligando, aparece un volumen sobrante, que rebosa desde la célula hasta un reservorio exterior. Así, el volumen de “mezcla reaccionante” no varía a lo largo del experimento. Ambas células calorimétricas están fabricadas en una aleación metálica

denominada comercialmente “*hastelloy-C*”, de carácter inerte frente a un gran número de compuestos químicos si exceptuamos los ácidos fuertes. Las células tienen forma de moneda, y sobre sus caras externas se extienden finas termoláminas; sus caras internas se encuentran en íntimo contacto térmico con un elemento Peltier de 264 uniones PN de cristales de bismuto.

En un experimento, se disipa una pequeña potencia constante en la termolámina de la célula de referencia y se activa el sistema de compensación, que consigue igualar la temperatura de ambas células. Esto es lo que origina la *línea base instrumental*.

Cualquier efecto térmico transitorio, ya sea endo o exotérmico, aparta momentáneamente la potencia de compensación del valor estacionario y da lugar a un pico característico sobre la línea base de cuya integración extraeremos el calor implicado en ese proceso. Las células se encuentran suspendidas exclusivamente por sendos tubos, a través de los cuales se accede al interior de las mismas, en el interior de un cilindro. Para que las células se encuentren inmersas en un entorno adiabático la temperatura en el interior de dicho cilindro se encuentra siempre finamente controlada para que, en todo momento, esté a una temperatura tan próxima a la de las células como sea posible. A tal efecto, el sistema cuenta con una termopila constituida por 20 uniones bimetal que mide de forma continua la diferencia de temperatura entre las células y el cilindro donde se encuentran contenidas éstas y un sistema de control en *lazo cerrado* actúa sobre la termolámina que se encuentra uniformemente distribuida por la superficie del cilindro. Además, el calorímetro dispone de un sistema de circulación de agua procedente desde un baño externo, que actúa como foco frío en el sistema de control de temperatura. Para acentuar aún más si cabe la adiabaticidad del sistema y eliminar la condensación del vapor de agua, que es importante cuando se trabaja a temperaturas por debajo de la ambiente, en el cilindro se ha hecho el vacío.

Una parte esencial del calorímetro de titulación es el sistema de inyección, ya que de la fiabilidad de los volúmenes de inyección, la eficacia de la homogenización de la mezcla reaccionante y un bajo nivel de ruido, necesario por otro lado para que la sensibilidad del instrumento sea lo suficientemente elevada como para detectar efectos térmicos que usualmente son de unas pocas decenas de microcalorías, depende el correcto funcionamiento de dicho sistema. Las jeringas son de vidrio de alta precisión y

están provistas de largas agujas de acero inoxidable que presentan su extremo terminal aplanado en forma de paleta, para agitar la disolución presente en la célula, al mismo tiempo que inyectan y se encuentran fijadas a un dispositivo de rodamiento de muy baja fricción con una rueda estroboscópica que mantiene constante la velocidad de giro del motor de agitación mediante un dispositivo electrónico de control y que además sigue la velocidad de rotación de forma continua. Finalmente es importante hacer notar que el sistema se encuentra conectado, a través del dispositivo MCS-2 de control, a un ordenador PC estándar desde el que mediante un software adecuado, proporcionado por la propia casa comercial en origen, se pueden establecer todas las variables experimentales dependientes del instrumento, tales como la temperatura, el número de inyecciones y volumen de cada una de las mismas, velocidad del sistema de agitación, tiempo entre inyecciones y de muestreo del instrumento..., etc., de tal manera que el experimento finalmente transcurre de forma totalmente automática.

En un microcalorímetro isotérmico de titulación, la reacción se produce, tras una inyección de un cierto volumen de uno de los reactivos (por lo general el ligando) sobre el otro de los reactivos que se encuentra en el interior de la célula de reacción (que suele ser la macromolécula). La señal asociada al efecto térmico de la reacción, siempre que no sea demasiado lenta presenta un pico con la forma típica de la respuesta de un sistema de segundo orden a un pulso de potencia de corta duración (García-Fuentes et al., 1998), tal y como se muestra en la figura siguiente, fig. 4.3.2.:

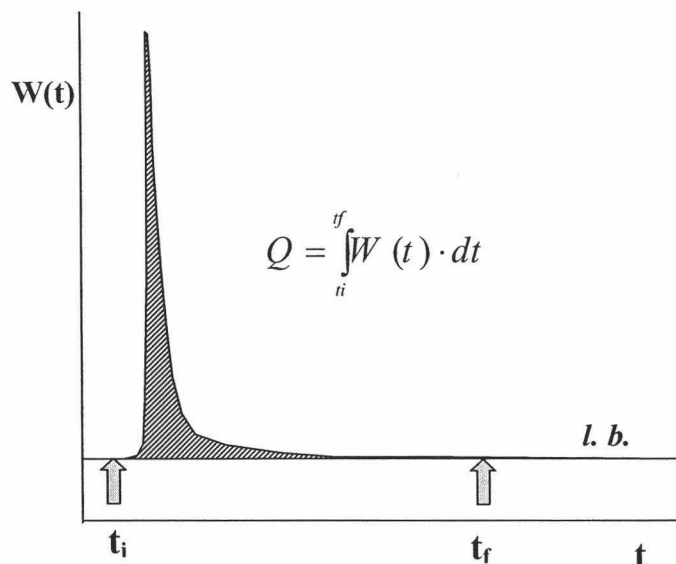


Fig. 4.3.2.: Pico característico de respuesta a una inyección de un reactivo (ligando) sobre otro que llena la célula calorimétrica (proteína). El calor generado en la reacción se obtiene integrando la función $W(t)$ sobre la línea base, l.b.

En esa misma figura, fig. 4.3.2., se indica también el calor correspondiente a la interacción entre los dos reactivos y que es el responsable del pico que aparece. Este calor puede obtenerse como el área delimitada por el pico y la línea base interpolada entre la señal estacionaria previa y posterior a la inyección.

4.3.3. Formulación general y análisis de un experimento de CIT.

Tanto el diseño del experimento de interacción macromolécula-ligando como el análisis de los datos experimentales se realizan de acuerdo a un modelo de dicha interacción. Para el caso más sencillo, en el que la proteína carece de diferentes tipos de sitios de unión para el ligando y además no existen efectos alostéricos de ningún tipo, el comportamiento del sistema se puede describir adecuadamente mediante el modelo de **unión de un ligando a una macromolécula con “n” sitios idénticos e independientes**. De esta definición hay que considerar dos aspectos importantes:

- *Idénticos*, que implica la misma constante de unión microscópica para cualquiera de los “n” sitios.
- *Independientes*, con lo que la unión a un sitio cualquiera, no modifica la afinidad de los restantes.

Podemos expresar, según un análisis termodinámico estadístico, la función de partición del proceso de unión, que describe las poblaciones de los diferentes estados accesibles al sistema (Wyman, 1990); (Gill et al., 1990) como sigue:

$$Z = (1 + k [L])^n \quad (4.3.3.)$$

En esa función, k es la constante microscópica aparente del equilibrio de unión, $[L]$ es la concentración de ligando libre y n es el número de sitios de unión de la macromolécula para ese ligando. El cociente entre la concentración de ligando unido, $[L]_b$, y la concentración de macromolécula total, $[M]_T$, se denomina *parámetro de unión* y se relaciona con la función de partición de la siguiente manera:

$$\bar{v} = \frac{[L]_b}{[M]_T} = \frac{\partial \ln Z}{\partial \ln [L]} \quad (4.3.4.)$$

En esa ecuación, $[L]$ representa a la concentración de ligando libre en equilibrio con las demás especies moleculares presentes en el sistema que interacciona, como pueden ser M , ML , ML_2 , ..., ML_n . Podemos pues representar la concentración de ligando unido por mol de macromolécula para un sistema que sigue un modelo de n sitios idénticos e independientes a través de la siguiente ecuación:

$$\bar{v} = \frac{nk [L]}{1 + k [L]} \quad (4.3.5.)$$

Podemos decir que un experimento común de CIT consiste en una serie de inyecciones de un volumen concreto de disolución de ligando, ya sean constante o variable, de tal manera que se encuentran separadas entre sí por un espacio de tiempo suficiente como para asegurarse de que se ha vuelto a alcanzar el equilibrio y de que se

ha transferido o compensado todo el calor liberado o absorbido antes de la siguiente inyección. La disolución de la macromolécula llena toda la célula de muestra y se agita de forma continua por acción de la paleta de la aguja de inyección, a una velocidad constante. Si aceptamos que no tienen lugar otros procesos concomitantes con el de unión como podría ser la ionización del tampón de la muestra, en una inyección cualquiera de la serie, el calor que se libera o se absorbe vendrá expresado por la ecuación siguiente:

$$q_i = \Delta H_b \left(\frac{\text{kcal}}{\text{mol } L_b} \right) \cdot \Delta(\text{moles } L_b) \quad (4.3.6.)$$

En esta ecuación, L_b es el ligando unido y ΔH_b es el cambio de entalpía por mol de ligando unido. Pero esta ecuación puede expresarse de una manera mucho más explícita considerando el volumen de la célula de muestra, V_c , que coincide con el volumen inicial de la muestra, y que se mantiene constante a lo largo del experimento como ya se ha explicado con anterioridad:

$$q_i = \Delta H_b \cdot V_c \cdot ([L]_{b,i} - [L]_{b,i-1}) = \Delta H_b \cdot V_c \cdot (\bar{v}_i \cdot [M]_i - \bar{v}_{i-1} [M]_{i-1}) \quad (4.3.8.)$$

Debido a esto, podemos considerar que el volumen efectivo de la reacción es el que llena la célula de muestra, de manera que las concentraciones de macromolécula y de ligando sólo han de corregirse por las pequeñas cantidades de ambas especies que se ven desplazados hacia el exterior de la célula tras cada inyección de ligando, así la concentración real de macromolécula en la célula ($[M]_i = [M] + [ML] + [ML_2] + \dots$), así:

$$[M]_i = [M]_{i-1} \cdot \frac{V_c - V_{in}}{V_c} \quad (4.3.9.)$$

y así también, la concentración total de ligando en la célula de reacción, será:

$$[L]_{T,i} = \frac{(V_c - V_{in})[L]_{T,i-1} + V_{in} \cdot [L]_0}{V_c} \quad (4.3.10.)$$

donde V_{in} es el volumen de inyección y $[L]_0$ es la concentración de la disolución de ligando en la jeringa de inyección. De este modo, el calor acumulado después de un número N de inyecciones, vendrá dado por:

$$Q = \sum_{i=1}^N q_i = V_C \cdot [M]_N \cdot \Delta H_b \cdot \bar{v}_N = V_C \cdot [M]_N \cdot \Delta H_b \cdot \frac{nk[L]}{1+k[L]} \quad (4.3.11.)$$

En un experimento de estas características, la concentración de ligando libre, $[L]$, no se conoce, por lo que será preciso expresarla en función de las variables experimentales $[L]_T$ y Q , así:

$$[L] = [L]_T - [L]_b = [L]_T - \frac{Q}{V_C \Delta H_b} \quad (4.3.12.)$$

Si ahora sustituimos $[L]$ en la ecuación 4.3.11. por la expresión anterior, ec. 4.3.12., se llega a una ecuación de segundo grado para el calor Q, cuya solución se expresa como:

$$Q = \frac{V_C \Delta H_b}{2k} \cdot \left[1 + k[L]_T + nk[M]_T - \sqrt{(1 + k[L]_T + nk[M]_T)^2 - 4nk^2[M]_T[L]_T} \right] \quad (4.3.13.)$$

La ecuación anterior relaciona el calor total acumulado tras N inyecciones con las variables experimentales V_C , $[L]_T$ y $[M]_T$ y los parámetros k y ΔH_b que se han de determinar en el análisis de los datos de un experimento convencional de CIT. Además, la ecuación 4.3.12. se puede expresar también como sigue:

$$[L] = [L]_f - [L]_b = [L]_f - [M]_f \cdot \frac{nk[L]}{1+k[L]} \quad (4.3.14.)$$

Si ahora despejamos $[L]$, podemos expresar esta concentración libre de ligando como función de los parámetros n , k , $[L]_T$ y $[M]_T$, así:

$$[L] = \frac{1}{2k} \cdot \left[-(1 + nk[M]_f - k[L]_f) + \sqrt{(1 + nk[M]_f - k[L]_f)^2 + 4k[L]_f} \right] \quad (4.3.15.)$$

Derivando la ecuación 4.3.13. con respecto a $[L]_T$ obtendremos una expresión del calor por mol de ligando añadido asociado a cada inyección:

$$\frac{1}{V_c} \cdot \frac{dQ}{d[L]_f} \approx \frac{1}{V_c} \cdot \frac{\Delta Q}{\Delta[L]_f} = \frac{\Delta H_b}{2} \left[1 - \frac{1 + k[M]_f \theta - nk[M]_f}{\sqrt{(1 + k[M]_f \theta - nk[M]_f)^2 - 4nk^2[M]_f^2 \theta}} \right] \quad (4.3.16)$$

donde θ es la *fracción de saturación* y se define como:

$$\theta = \frac{[L]_f}{[M]_f} \quad (4.3.17.)$$

Las figuras siguientes, fig. 4.3.4. y 4.3.5. se corresponden con una simulación de un experimento convencional de CIT, en el que se realizan veinte inyecciones de 5 μ L de una disolución de ligando de concentración 5mM sobre un volumen de 1.35mL de una disolución de macromolécula, cuya concentración inicial es de 0.18mM, con un único sitio de unión para el ligando, o sea, que n es unidad. La simulación se ha llevado a cabo considerando cuatro posibles valores para la constante de unión: $2.5 \cdot 10^6$, $2.5 \cdot 10^5$, $2.5 \cdot 10^4$ y $2.5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$, que supone cubrir el intervalo de afinidades, desde una relativamente alta hasta una baja. Así:

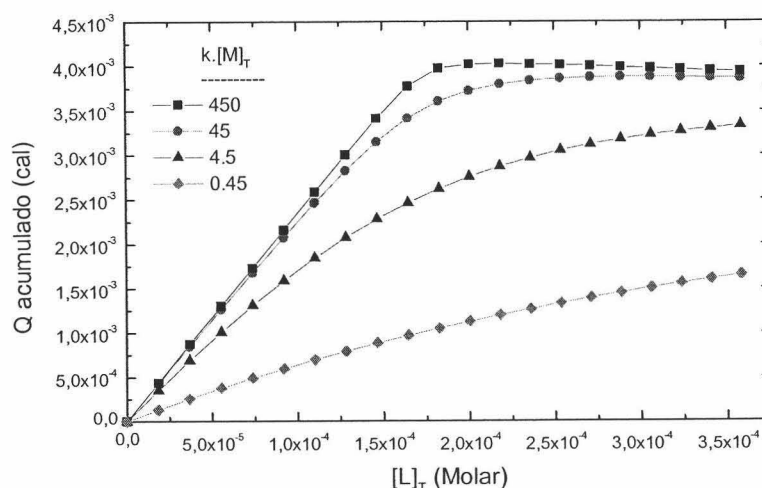


Fig. 4.3.4.: Simulación del calor acumulado para un experimento ITC con los siguientes parámetros experimentales: $V_C = 1.35$ mL; $[M]$ inicial en célula = 1.8×10^{-4} M; 20 inyecciones de $5 \mu\text{L}$; $[L]$ en la jeringa de inyección = 5 mM; un solo sitio de unión para el ligando, $n = 1$ y cuatro posibles valores de la constante de unión, 2.5×10^6 , 2.5×10^5 , 2.5×10^4 y 2.5×10^3 M^{-1} .

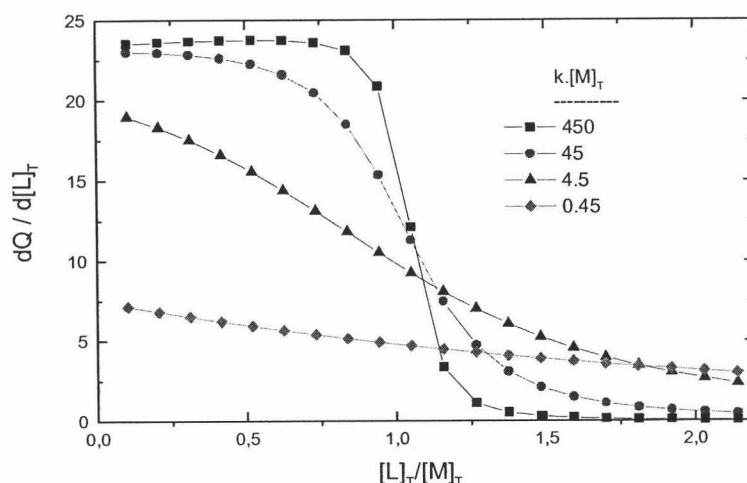


Fig. 4.3.5.: Simulación del calor por mol de ligando añadido asociado a cada inyección para un experimento ITC con los siguientes parámetros experimentales: $V_C = 1.35$ mL; $[M]$ inicial en célula = 1.8×10^{-4} M; 20 inyecciones de $5 \mu\text{L}$; $[L]$ en la jeringa de inyección = 5 mM; un solo sitio de unión para el ligando, $n = 1$ y cuatro posibles valores de la constante de unión, 2.5×10^6 , 2.5×10^5 , 2.5×10^4 y 2.5×10^3 M^{-1} .

Las ecuaciones anteriores se emplean para diseñar los experimentos que se desean llevar a cabo y para ello se consideran parámetros ya medidos anteriormente como pueden ser la estequiometría del proceso, la afinidad de la unión, etc. Dichos parámetros se pueden haber predicho previamente a partir de la estructura mediante el uso de algún tipo de algoritmo o simplemente se emplean para el diseño valores

esperados por analogía con sistemas moleculares semejantes. Es preciso considerar siempre un valor de $[M]_T$ que de lugar a una isoterma óptima (Wiseman et al., 1989). Estas mismas ecuaciones se emplean para ajustar los datos experimentales obtenidos en un experimento de CIT, mediante un ajuste no lineal por mínimos cuadrados para determinar los parámetros termodinámicos del experimento, esto es, n , k , ΔH_b .

Existen dos formas de tratar los datos experimentales obtenidos, pero sólo la que considera el *calor por mol de ligando añadido asociado a cada inyección* tiene la ventaja de evitar la propagación de errores experimentales que se produce en la otra forma de análisis, la de *calores acumulados*, por lo que la primera resulta ser la forma más adecuada para el análisis de la isoterma experimental.

Es bastante frecuente que ocurra un intercambio de iones H^+ entre el tampón y el complejo ML_n que se está formando. La protonación o desprotonación del tampón constituye una contribución al calor medido que en algunos casos puede ser incluso superior a la de la propia interacción macromolécula-ligando. Para evitar este efecto, que podría enmascarar el verdadero valor de ΔH_b consiste en usar un tampón de muy bajo calor de ionización, como el cacodilato o el glicerol-2-fosfato. Sin embargo, y debido a que en ocasiones esto no es posible porque estos tampones pueden interferir en la unión, compitiendo con el ligando por la macromolécula o bien porque el pH de trabajo se encuentra fuera del intervalo de tamponamiento efectivo de estos tampones, es preciso seguir otra estrategia de trabajo consistente en repetir las titulaciones calorimétricas en tres o más tampones de entalpía de ionización suficientemente diferente y, o bien se extrapolan linealmente las entalpías aparentes obtenidas a entalpía de ionización del tampón nula o bien se incluye en la función de ajuste no lineal la contribución de la protonación o desprotonación del tampón, de forma explícita, según las ecuaciones siguientes:

El cambio de entalpía global por mol de ligando unido será:

$$\Delta H = \Delta H_b + p \cdot \Delta H_i \quad (4.3.18)$$

Aquí, ΔH_b es la entalpía de unión por mol de ligando unido, p es el número de moles de protones por mol de ligando unido tomados ($p > 0$) o cedidos ($p < 0$) por el complejo ML_n a saturación. De esta manera, el calor liberado o absorbido tras cada inyección, será ahora:

$$q_i = V_C (\Delta H_b + p \cdot \Delta H_i) (\bar{v}_i [M]_i - \bar{v}_{i-1} [M]_{i-1}) \quad (4.3.19.)$$

Y por lo tanto, el calor acumulado tras N inyecciones, vendrá dado por la expresión siguiente:

$$Q = \sum_{i=1}^N q_i = V_C \cdot [M]_N (\Delta H_b + p \cdot \Delta H_i) \cdot \frac{nk[L]}{1+k[L]} \quad (4.3.20.)$$

Y finalmente, el calor por mol de ligando añadido, que se asocia a cada inyección, se expresa como sigue:

$$\frac{1}{V_C} \cdot \frac{\Delta Q}{\Delta[L]_r} = \frac{(\Delta H_b + p \cdot \Delta H_i)}{2} \left[1 - \frac{1 + k[M]_r \theta - nk[M]_r}{\sqrt{(1 + k[M]_r \theta - nk[M]_r)^2 - 4nk^2 [M]_r^2 \theta}} \right] \quad (4.3.21.)$$

que es la ecuación final de ajuste considerando el efecto de ionización del tampón.



4.4. Espectroscopia de Fluorescencia.

4.4.1. Introducción a la espectroscopia de fluorescencia.

Por lo general, cuando se habla de fluorescencia desde un punto de vista bioquímico, se comienza discutiendo la *fluorescencia de proteínas*, debido a que las proteínas presentan una fluorescencia intrínseca única entre todos los biopolímeros. De hecho, los lípidos, las membranas y los polisacáridos por lo general carecen de fluorescencia y en el caso del DNA, su fluorescencia intrínseca es demasiado débil como para que resulte útil. En el caso de las proteínas, los tres residuos aromáticos, fenilalanina (phe, F), tirosina (tyr, Y) y triptófano (trp, W) contribuyen a su emisión de fluorescencia en la región ultravioleta del espectro (Konev, 1967); (Weinryb, 1971); (Demchenko, 1981); (Permyakov, 1993). Afortunadamente, estos tres aminoácidos son relativamente poco abundantes en proteínas, lo cual facilita la interpretación de los datos espectrales desde un punto de vista estructural. Una característica importante de la fluorescencia de proteínas es la **alta sensibilidad** del triptófano a los cambios en su entorno próximo, de tal manera que se pueden observar cambios en los espectros de emisión de triptófano como respuesta a *transiciones conformacionales* de la proteína, a fenómenos de *asociación de subunidades*, a procesos de *unión de ligandos* y a la propia desnaturalización de la proteína. Todos estos procesos pueden afectar el entorno del anillo indólico del triptófano y, como consecuencia, provocar cambios en su fluorescencia intrínseca, de ahí su utilidad.

Cuando un cromóforo es irradiado con luz, su energía ($h\nu$) se invierte en promover electrones desde su estado inicial hasta otro excitado de mayor energía. En la mayoría de los cromóforos, los *niveles de energía vibracional* de los estados inicial y excitado se encuentran solapados, de manera que los “electrones excitados” regresan a su estado inicial a través de transiciones **no radiativas** (calor). No obstante, existen otros cromóforos, como es el caso de los fluoróforos presentes en proteínas mencionados anteriormente, cuya rigidez molecular (anillo aromático) hace que dichos niveles no solapen, de modo que cuando este tipo de cromóforos absorbe luz, no pueden regresar a su nivel elemental simplemente cediendo su exceso de energía en forma de

calor, sino que lo hacen mediante un *proceso radiativo*, de manera que parte de la energía absorbida se reemite en forma de luz. No obstante, y dado que buena parte de la energía absorbida por el electrón, durante su tiempo de vida en el estado excitado, se pierde en transiciones entre niveles vibracionales (relajación) la energía de la radiación emitida es siempre menor que la que se absorbe, con lo que su longitud de onda es siempre superior a la de absorción.

La emisión de las proteínas está dominada por el triptófano, que es capaz de absorber a mayor longitud de onda que los otros dos fluoróforos y presenta un coeficiente de extinción mayor, por lo que su fluorescencia es mucho más intensa. Además, por el hecho de absorber a longitudes de onda mayores, con frecuencia la energía absorbida por fenilalanina y tirosina se transfiere a los residuos triptófano de la misma proteína. La fenilalanina presenta las longitudes de onda de emisión y absorción más bajas, tiene una emisión bastante homogénea con un máximo cercano a 282 nm. La emisión de la tirosina en agua tiene su máximo a 303 nm y es relativamente poco sensible a la polaridad del disolvente. El máximo de emisión del triptófano en agua se encuentra próximo a 350 nm y es muy dependiente de la polaridad y/o de su entorno local, tal y como se adelantó anteriormente.

La emisión de fluorescencia de proteínas se excita por lo general a un máximo de absorción cercano a 280 nm o incluso a longitudes de onda mayores, por lo que la fenilalanina no se excita normalmente en un experimento de emisión convencional. Más aún, el *rendimiento cuántico* de la fenilalanina en proteínas es pequeño (aproximadamente 0.03) (Chen, 1967) y además la fenilalanina es capaz de transferir su fluorescencia a los otros dos residuos fluoróforos, dado que el triptófano y la tirosina absorben energía alrededor de 280 nm, que es la región en la que emite la fenilalanina. Merced a estos factores la fluorescencia de la fenilalanina rara vez se observa, de modo que la absorción de las proteínas a 280 nm se debe esencialmente a las tirosinas y a los triptófanos. A longitudes de onda superiores a 295 nm, la absorción se debe principalmente al triptófano, que puede ser excitado de forma selectiva a longitudes de onda entre 295 y 305 nm, por lo que con frecuencia se emplea una longitud de onda de 295 nm para la excitación con objeto de evitar la excitación de la tirosina. De forma similar a como tiene lugar la transferencia de energía entre la fenilalanina y los otros dos fluoróforos, también puede tener lugar una transferencia de energía desde la tirosina

hasta el triptófano mediante procesos no radiativos, con lo que la emisión de las tirosinas también se puede ver afectada (Penzer, 1980); (Cantor, 1980); (Eftink, 1991), pero para que esto ocurra, es preciso que ambos residuos se encuentren en la misma proteína y orientados de forma favorable en el espacio.

Las medidas de fluorescencia se llevan a cabo en un instrumento denominado **espectrofluorímetro**, del cual se representa un sencillo esquema en la figura siguiente, fig. 4.4.1.:

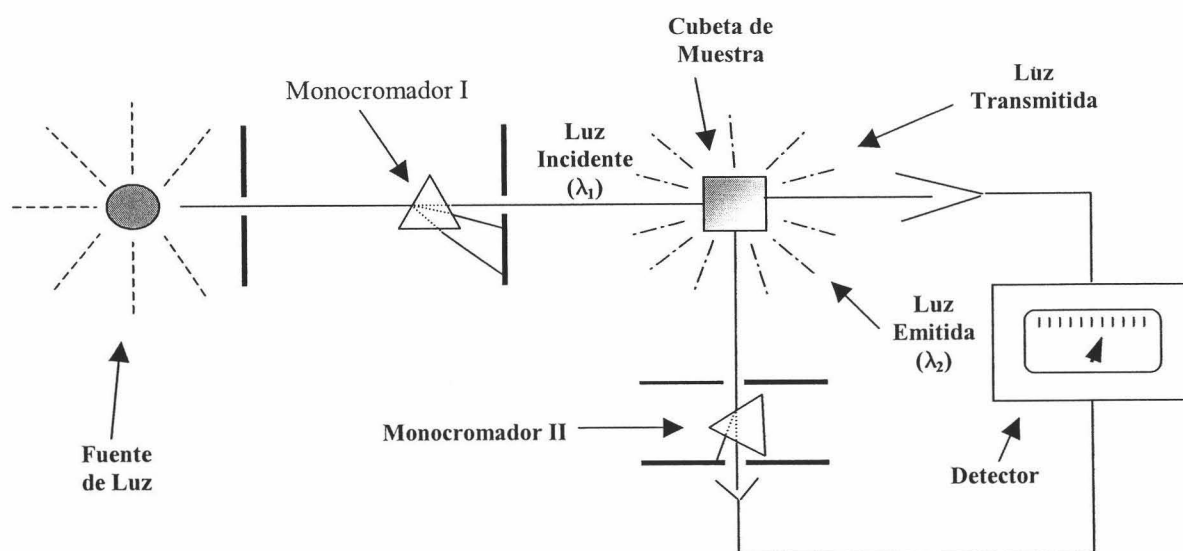


Figura 4.4.1.: Esquema sencillo de un espectrofluorímetro Ultravioleta-Visible.

En él se hace pasar un rayo de luz incidente, que pasa por un primer monocromador, a través de una cubeta de muestra que contiene el fluoróforo. A ciertos valores de longitud de onda, la luz es absorbida por la muestra y la molécula fluoresce. Se emite entonces radiación desde la muestra en todas las direcciones. La radiación emitida, que tiene como ya hemos adelantado, una longitud de onda superior a la del rayo incidente, se hace pasar a través de un segundo monocromador y se detecta en un tubo fotomultiplicador. Su diseño es, en esencia al menos, similar al de un *espectrofotómetro ultravioleta-visible*, pero presenta varias diferencias con respecto a aquél, como pueden ser que la radiación emitida se detecta a 90° con respecto a la dirección del rayo incidente y que se requiere un segundo monocromador para seleccionar las diferentes longitudes de onda del haz de luz que se emite. Como

consecuencia de la disposición del instrumento, las cubetas usadas en fluorescencia han de tener las cuatro caras transparentes, mientras que las empleadas usualmente en medidas de absorbancia tienen dos de sus caras esmeriladas u oscurecidas.

4.4.2. Empleo de la espectroscopia de fluorescencia para el estudio de los procesos de asociación Proteína-Ligando.

Tradicionalmente se ha venido empleando la fluorescencia intrínseca de las proteínas para estudiar procesos de unión de ligandos a las proteínas. En algunas ocasiones dichos ligandos poseen fluorescencia propia, y dicha fluorescencia cambia cuando se unen a una proteína (Daniel, 1966; Anderson, 1969; Condie y Quay, 1983). Sin embargo, es importante notar que se puede seguir el proceso de unión de un cierto ligando a una proteína aún cuando dicho ligando sea espectroscópicamente *silencioso*, esto es, a pesar de que carezca de fluorescencia propia (Zukin, 1979). Esto es posible debido a que la unión de ligandos a las proteínas normalmente provoca cambios en la estructura tridimensional de las mismas. Si dicho cambio estructural supone un efecto en el entorno de un fluoróforo intrínseco o extrínseco a la proteína, supondrá también por consiguiente una variación en el espectro de fluorescencia de la misma. Tales cambios de fluorescencia a una longitud de onda determinada (ΔF), pueden emplearse para obtener la constante de disociación (K_d) de la proteína para ese ligando, donde K_d no es sino una medida de la afinidad de la proteína por el ligando.

En el caso más sencillo de una proteína con un único sitio de unión para el ligando, como es el caso del dominio SH3 cuyo estudio se recoge en esta Memoria, el equilibrio de unión podría definirse de la siguiente manera:



$$K_d = \frac{[M] \cdot [L]}{[ML]} \quad (4.4.1.)$$

donde $[M]$ y $[L]$ son las concentraciones de las especies proteína y ligando libres y $[ML]$ es la concentración del complejo proteína-ligando. En el apéndice *VI* se detalla el modelo y el desarrollo de las ecuaciones del mismo, que se han utilizado para el análisis de los datos de los experimentos de titulación realizados en este trabajo.

Los estudios de fluorescencia asociados a la unión de ligandos a proteínas resultan ser también potencialmente útiles en el estudio de fenómenos de competición en los que un cierto fluoróforo compite con otros ligandos por la unión a la proteína. Finalmente podemos decir que las medidas de fluorescencia, tanto de fluoróforos intrínsecos como extrínsecos de la proteína, son útiles para estimar los valores de K_d para la unión de ligandos a las proteínas y, dada la gran sensibilidad de la técnica, resulta útil como complemento de otras técnicas como la *CIT*. En el caso de los estudios de unión del ligando p41 al dominio SH3 de espectrina recogido en esta memoria, el empleo de la espectroscopia de fluorescencia resultó esencial como estudio preliminar discriminatorio de las mutaciones del dominio con mayores afinidades por el ligando p41, previo al estudio de afinidad realizado mediante *CIT*.

4.4.3. Experimentos de titulación de SH3-Spc con p41.

Metodología.

Los diferentes experimentos de titulación seguidos por espectroscopia de fluorescencia de cada una de las variantes del dominio SH3-Spc con el decapeptido de síntesis p41, se han llevado a cabo de dos maneras diferentes. Por un lado, y de manera preliminar, se realizaron titulaciones adicionando volúmenes variables de una disolución madre de péptido p41 sobre una disolución de proteína, siguiéndose la señal de intensidad de fluorescencia tras cada adición y por otro lado, se prepararon disoluciones diferentes para cada grado de saturación deseado de la proteína y se midió la misma a cada disolución así preparada. A continuación, se describen brevemente ambas metodologías.

4.4.3.1. Titulaciones por adición de volúmenes variables.

En este procedimiento, se parte de una disolución de proteína, dializada de forma extensiva frente al tampón correspondiente, a la que se denomina disolución “madre” de proteína, de una concentración aproximada en torno a 20-25 μM . Por otro lado se prepara una disolución “madre” o “stock” de péptido p41 de una concentración aproximada en torno a 2mM empleando el tampón de cambio de diálisis de la proteína para su disolución. Se reajustó el pH de la disolución de péptido así preparada, al valor correspondiente, 3 ó 7, empleando disoluciones diluidas de HCl o NaOH según el caso. Dado el elevado coste del péptido de síntesis p41 y para no gastar demasiado, se utilizó una microcubeta de cuarzo para la muestra con un volumen mínimo de uso de sólo 80 μL . En ella se introducen 150 μL de la disolución madre de proteína y sobre ella se van adicionando, empleando jeringas Hamilton de volumen variable, volúmenes crecientes de la disolución stock de p41, para alcanzar grados de saturación cada vez más elevados, en la misma cubeta de fluorimetría. Tras cada adición de disolución de p41, la disolución de muestra se agita convenientemente con una pipeta automática, para conseguir su homogenización. Se recogen posteriormente los espectros de emisión de fluorescencia de la disolución de proteína sola y de las sucesivas mezclas obtenidas tras cada una de las adiciones.

En la siguiente figura, fig. 4.4.2., se representan el esquema básico de un experimento de titulación con adición de volúmenes crecientes de disolución de péptido sobre una disolución de proteína como los que se han llevado a cabo en esta memoria:

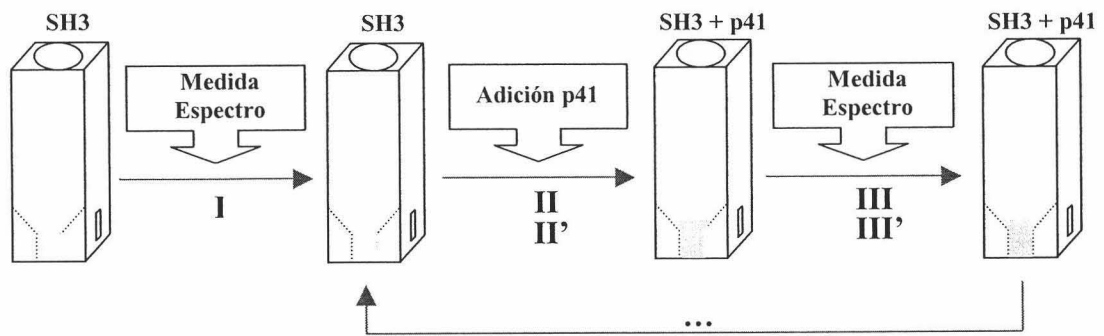


Figura 4.4.2.: Representación esquemática de un experimento típico de titulación de cualquiera de las variantes del dominio SH3-Spc con adición de volúmenes crecientes de disolución stock de p41 sobre una disolución madre de proteína. Los pasos notados con prima ('), se refieren a sucesivas adiciones de disolución stock de p41 sobre mezclas previas SH3 + p41.

En todos los experimentos de titulación llevados a cabo de esta manera, se procuró emplear siempre la misma pipeta automática, con la misma punta, para minimizar los posibles errores derivados de retirar algo de disolución cada vez que se agitaba la misma para homogeneizarla. Esta metodología presenta la desventaja de que los errores volumétricos que se pueden cometer en cada adición, se van sumando, resultando el error global algo mayor que el que se cometería preparando disoluciones independientes, sin embargo, la gran ventaja del ahorro que supone en la cantidad de péptido necesario para llevar a cabo la titulación completa de la proteína compensa con creces este inconveniente.

4.4.3.2. Titulaciones con disoluciones independientes.

A pesar de las ventajas ya indicadas de la realización de los experimentos de titulación por adición de volúmenes crecientes para las diferentes variantes del dominio SH3-Spc con el péptido p41 por la baja afinidad de la unión, se consideró conveniente repetir dichos experimentos de titulación de la forma usual, esto es, preparando disoluciones independientes para cada grado de saturación de la proteína, manteniendo constante la concentración de la misma en cada una de ellas, de manera que en este caso, la concentración de la proteína en la muestra deja de ser una variable, aún y a pesar del considerable incremento en la cantidad de péptido necesario para saturar la misma cantidad de proteína, al menos para el mutante del dominio de mayor afinidad,

que sería el que posteriormente emplearíamos para completar el estudio del proceso de unión del dominio con el p41, usando otras técnicas experimentales, como el CIT, la CDB o el IHD seguido por RMN y para la forma natural del dominio, WT, que usaríamos como referencia.

De esta manera se prepararon diferentes disoluciones para distintos grados de saturación de la proteína, que oscilaron entre el 0 y el 95% aproximadamente. La concentración de proteína en cada una de ellas se mantuvo constante en torno a 20 μM en todos los casos, tanto del mutante como de la forma natural del dominio. Para conseguir esto último se completó el volumen final de cada una de las disoluciones preparadas, en las que la cantidad de disolución stock de p41 adicionado fue diferente, con volúmenes variables de tampón hasta un volumen final de 1 mL. Por supuesto también en este caso se procuró que la disolución resultante estuviese perfectamente homogeneizada si bien en este caso, lógicamente, para evitar contaminaciones de unas disoluciones en otras, la agitación se realizó empleando puntas diferentes para la pipeta automática.

Una vez preparadas las diferentes disoluciones, se registraron los espectros de emisión de fluorescencia de cada una de ellas de forma similar a como se registraron para las muestras obtenidas por adiciones sucesivas de disolución stock de p41 sobre la muestra inmediatamente anterior.

4.5. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

4.5.1. Introducción a la RMN.

A mediados de la década de los treinta, Gorter, predijo por primera vez el fenómeno de la *Resonancia Magnética Nuclear* (RMN), (Gorter, 1936), sin embargo, no fue hasta la década posterior (Bloch, 1946), cuando se consiguió detectar la primera señal de RMN. Desde entonces, la técnica no ha parado de desarrollarse y, muy especialmente desde la aparición de la RMN de *transformada de Fourier* (Ernst, 1966) y la introducción de la espectroscopía bi- y multidimensional, ha llegado a convertirse en una herramienta esencial en los estudios de moléculas orgánicas y biopolímeros. Precisamente en el campo que nos ocupa, la espectroscopía de RMN se ha revelado como un potente y útil instrumento para el estudio de la dinámica molecular y la estructura tridimensional de las macromoléculas biológicas, con importantes ventajas sobre las demás técnicas espectroscópicas y cristalográficas. Así por ejemplo, sus *tiempos de relajación* relativamente largos posibilitan el estudio de procesos dinámicos moleculares que serían demasiado lentos para ser estudiados mediante otra técnica espectroscópica. Además, y en lo que a determinación estructural se refiere, la RMN permite la resolución de estructuras tridimensionales de macromoléculas en disolución acuosa con resoluciones a nivel atómico, sin necesidad de cristalización previa de la sustancia como ocurre con la *difracción de Rayos*, lo cual no siempre es posible. No debemos olvidar tampoco que la disolución acuosa es el “estado fisiológico” de las macromoléculas biológicas en el interior de los organismos vivos.

No obstante y a pesar de estas notables ventajas, la espectroscopía de RMN presenta ciertas limitaciones que irán reduciéndose a medida que la técnica se vaya desarrollando, así, su todavía baja *sensibilidad* hacen que precise de elevadas cantidades o concentraciones de muestra, algo que es especialmente problemático en el caso de los biopolímeros, dada su relativamente reducida disponibilidad y/o solubilidad. Además, la baja *dispersión de líneas espectrales* inherente al fenómeno de la RMN, limita su operatividad imposibilitando actualmente la resolución de estructuras de macromoléculas de peso molecular superior a unos 40kDa, aunque afortunadamente

muchas proteínas globulares y la mayoría de los dominios de proteínas, no superan ese tamaño y sus espectros multidimensionales pueden resolverse con relativa facilidad.

4.5.2. El fenómeno: breves fundamentos de la RMN.

Los núcleos atómicos poseen un momento angular, L , denominado *espín nuclear* que sólo puede tomar ciertos valores discretos, esto es, el espín se encuentra *cuantizado* a través del *número cuántico de espín*, I , de modo que, podemos expresar el módulo del vector *espín* como sigue:

$$|L| = \hbar \cdot \sqrt{I(I+1)} \quad (4.5.1.)$$

$$\eta = \frac{h}{2\pi} \quad (\hbar \text{ es la constante de Planck reducida}) \quad (4.5.2.)$$

Según los postulados del electromagnetismo clásico y por tratarse de partículas cargadas en movimiento, estas partículas presentan un *momento magnético*, μ , asociado al espín expresado como sigue:

$$\mu = \pm g \cdot \mu_B \cdot \frac{L}{\hbar} = \gamma \cdot L \quad (4.5.3.)$$

donde e es la carga elemental, m la masa de la partícula considerada, μ_B es el *magnetón de Böhr* y g es el llamado *factor de Landé*. γ es la *relación giromagnética* que es característica para cada núcleo. Dado que el espín, L , y el momento magnético, μ , se encuentran directamente relacionados, éste último también se encuentra cuantizado. El número cuántico de espín, I , viene determinado principalmente por el número de protones y neutrones desapareados en el núcleo.

La componente del momento magnético en la dirección del eje Z, μ_z , se encuentra también cuantizada a través del número cuántico magnético m_I según la expresión siguiente:

$$\mu_z = \gamma \cdot \hbar \cdot m_I \quad (4.5.4.)$$

donde m_I puede tomar $2I+1$ valores:

$$m_I = I, I-1, I-2, \dots, 2, 1, 0, -1, -2, -I+2, -I+1, -I.$$

Desde un punto de vista práctico, los núcleos de mayor interés en espectroscopía de RMN (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{29}Si , ^{31}P esencialmente), presentan un I igual a $1/2$, con lo que su m_I podrá tomar dos valores: $+1/2$ y $-1/2$.

En ausencia de un campo magnético externo, todas las posibles orientaciones del espín I de un núcleo aislado presentan la misma energía, esto es, los niveles de energía se encuentran degenerados. Ahora bien, si se aplica un campo magnético externo intenso, \mathbf{B}_0 , se produce entonces una interacción entre éste y el momento magnético del núcleo, μ , que origina un *par de fuerzas* cuyo momento, Γ , se expresa como sigue:

$$\Gamma = \mu \times \mathbf{B}_0 \quad (4.5.5.)$$

Si consideramos que el eje Z de coordenadas coincide con la dirección del campo magnético externo, dado que la componente z del momento magnético, μ_z , está cuantizada, el ángulo θ formado entre el momento magnético y el campo aplicado no cambia sino que, merced a ese par de fuerzas, se origina una *precesión* del momento magnético en torno al eje Z definido por la dirección del campo externo aplicado. La velocidad de precesión depende de la intensidad del campo externo \mathbf{B}_0 y la energía puesta en juego en esta interacción viene dada por:

$$E = -\mu \cdot \mathbf{B}_0 = -\mu \cdot \mathbf{B}_0 \cdot \cos\theta = -\mu_z \cdot \mathbf{B}_0 = -\gamma \cdot \hbar \cdot m_I \cdot B_0 \quad (4.5.6.)$$

De esta forma, podremos considerar $2I+1$ niveles de energía no degenerados que se van a corresponder con los $2I+1$ valores que puede tomar m_I . Dichos niveles de energía se encuentran separados por un salto equivalente a $\gamma \cdot \hbar \cdot B_0$, tal y como se aprecia en la figura siguiente, para el caso de un núcleo de espín $I = \frac{1}{2}$, fig. 4.5.1.

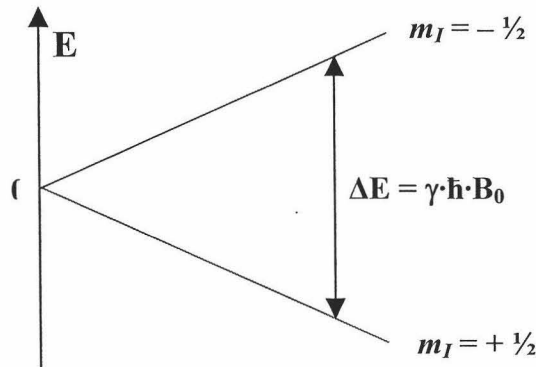


Fig. 4.5.1.: Niveles de energía para un núcleo simple con espín $I = \frac{1}{2}$.

De modo que la separación entre niveles energéticos depende de la naturaleza del núcleo en cuestión y de la intensidad del campo magnético aplicado.

Una radiación electromagnética cuya energía asociada sea igual a ese ΔE que separa a dos niveles, puede inducir transiciones entre ellos según la *regla de selección* que establece que Δm_I ha de ser igual a ± 1 , en cuyo caso la **condición de resonancia** para que tenga lugar esa transferencia de energía entre la radiación electromagnética incidente y núcleo vendrá dada por:

$$\Delta E = h \cdot \nu = \gamma \cdot \hbar \cdot \Delta m_I \cdot B_0 \quad (4.5.7.)$$

Y por lo tanto, la frecuencia de la radiación electromagnética que induce esa transición será igual a:

$$\nu_0 = \frac{\gamma}{2\pi} \cdot B_0 \quad (4.5.8.)$$

A esta ecuación se la conoce como *Ecuación de Larmor*. Si agrupamos términos en la ecuación anterior, nos queda que:

$$\Omega_0 = \gamma \cdot B_0, \text{ en donde } \omega_0 = 2\pi \cdot \nu_0 \quad (4.5.9.)$$

A la frecuencia angular ω_0 se la denomina *frecuencia de resonancia de Larmor*.

4.5.3. La señal de RMN. Atenuación libre de la inducción (FID).

Un conjunto macroscópico de núcleos idénticos se caracteriza por un momento magnético por unidad de volumen, que es la suma vectorial de los momentos magnéticos individuales, que se denomina *magnetización*, \mathbf{M} :

$$\mathbf{M} = \sum_i \mu_i \quad (4.5.10.)$$

En ausencia de un campo magnético externo \mathbf{B}_0 , los momentos magnéticos individuales se orientan al azar y así la magnetización neta sería nula ($\mathbf{M}=0$). Sin embargo, al aplicar un campo magnético externo, \mathbf{B}_0 , en la dirección del eje Z, tras un cierto tiempo, se alcanzará una situación de equilibrio en la que, a temperaturas no demasiado elevadas, los núcleos con una componente μ_z positiva predominarán sobre los que la tuvieran nula o negativa, ya que la componente negativa supone una mayor energía que la positiva. Dado que no hay orientación preferente de los momentos magnéticos en los ejes X e Y (es decir, los momentos magnéticos μ precesionan alrededor del eje Z sin coherencia de fases) las componentes en los ejes X e Y de la magnetización neta, \mathbf{M}_x y \mathbf{M}_y serán nulas. El resultado es una magnetización neta en la dirección del eje Z denominada *magnetización longitudinal*, \mathbf{M}_z , tal y como se muestra en la figura siguiente, fig. 4.5.2-A..

En los modernos espectrómetros de RMN, las transiciones entre niveles de energía se realizan mediante la aplicación de pulsos de radiación electromagnética en la región del espectro de las radiofrecuencias producidos por una bobina de excitación (*transmisor*) orientada de forma que la componente magnética de la radiación, $\mathbf{B}_1(t)$, sea

perpendicular al campo magnético externo \mathbf{B}_0 (fig. 4.5.2-B). $\mathbf{B}_1(t)$ es por lo tanto un campo magnético oscilante de frecuencia ω .

Un campo magnético oscilante puede descomponerse en dos vectores rotacionales que giran en sentidos opuestos, $+\omega$ y $-\omega$. Si la frecuencia de la componente $+\omega$ coincide con la *frecuencia de Larmor*, entonces se dice que la radiación aplicada está en *resonancia* con la precesión del conjunto de núcleos considerados. Es entonces cuando dichos núcleos absorben energía de la radiación, y se incrementa así la población de núcleos con una componente μ_z negativa, de mayor energía. Es importante remarcar que la absorción de energía radiante por un núcleo dado sólo puede tener lugar si dicho núcleo precesiona en fase con la componente $+\omega$ del campo magnético oscilante de la radiación aplicada. Para ese conjunto de núcleos que precesionan en *coherencia de fase*, las componentes μ_x y μ_y de sus momentos magnéticos ya no se anulan y como consecuencia, la magnetización \mathbf{M} presenta un cierta componente neta en el plano XY, \mathbf{M}_{xy} , denominada *magnetización transversal* originada por el par de fuerzas $\mathbf{M}_z \times \mathbf{B}_1(t)$, así se aprecia en la figura siguiente, fig. 4.5.2.

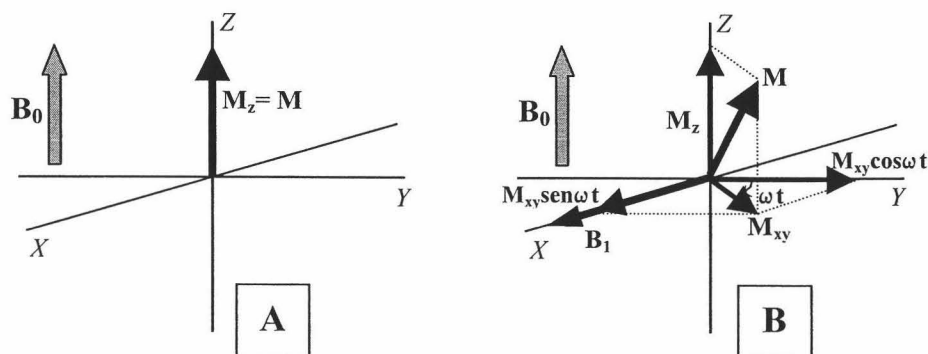


Figura. 4.5.2.: Comportamiento de la magnetización macroscópica en el sistema de laboratorio

Esa \mathbf{M}_{xy} originada tras la aplicación del pulso de radiofrecuencia, precesiona en torno al eje Z, e induce una fuerza electromotriz sobre la bobina de detección, que constituye la señal de RMN. La señal es preamplificada en un amplificador de radiofrecuencias. La salida de ese amplificador se conecta a uno o dos detectores sensibles a la fase (dependiendo del método empleado para la *detección en cuadratura*) y la señal de salida de los detectores citados es lo que se denomina *atenuación libre de*

la inducción, normalmente conocida por su acrónimo en inglés, **FID**, “*Free Induction Decay*”, que es la que contiene la información de la frecuencia característica. Existen numerosas fuentes en las que se pueden encontrar descritos los detalles del procedimiento de detección de la señal de RMN (Sadqi, 2000), (Derome, 1997).

En ausencia de perturbaciones posteriores, se producirá la *relajación* y el sistema tenderá a alcanzar de nuevo la situación de equilibrio anterior a la aplicación del pulso de radiofrecuencia, restituyéndose así la distribución inicial de poblaciones entre los niveles de energía y anulándose la magnetización transversal, M_{xy} , por lo que, en la situación más simple de un único núcleo, la FID será una oscilación amortiguada en el *dominio del tiempo* con una envolvente que será una atenuación *exponencial simple*, tal y como se aprecia en la figura siguiente, fig. 4.5.3.:

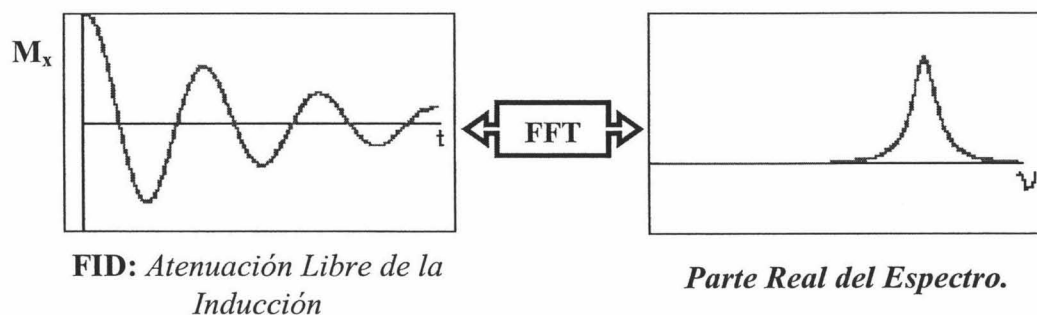


Fig. 4.5.3. Representación de la Atenuación Libre de la Inducción, señal de RMN. Procesamiento de la señal y Espectro resultante.

Para poder llegar a obtener el espectro final es necesario operar matemáticamente sobre la FID obtenida; así, se puede filtrar para mejorar la relación señal-ruido o la resolución (apodizar), transformarla al *dominio de la frecuencia* mediante un algoritmo FFT (transformada rápida de Fourier) y corregir la fase y las distorsiones de línea base. A este conjunto de operaciones matemáticas se le conoce como *procesamiento de la FID*. Existen descripciones en la bibliografía de cómo procesar las FIDs obtenidas para obtener finalmente la señal (Müllen y Pregosin, 1976), (Shaw, 1984), (Derome, 1997).

4.5.4. El Desplazamiento Químico (δ).

Sabemos que la frecuencia a la que resuena un núcleo se encuentra determinada principalmente por el valor de su razón giromagnética y por la intensidad del campo magnético aplicado, \mathbf{B}_0 . Sin embargo, existe aún otro factor del que depende la frecuencia de resonancia y es este hecho precisamente el que hace a la RMN una técnica fundamental para la obtención de información sobre la estructura química de las moléculas.

Cuando se aplica un campo magnético externo, \mathbf{B}_0 , los diferentes núcleos de una molécula perciben un *campo magnético efectivo* que es ligeramente diferente al aplicado, como consecuencia del fenómeno del *apantallamiento nuclear*, cuyo origen se encuentra en la generación de corrientes electrónicas inducidas por el campo magnético aplicado, \mathbf{B}_0 , así como por campos locales producidos por grupos químicos vecinos y por las moléculas de disolvente. Dichas corrientes dan lugar a *campos magnéticos inducidos* que se oponen (apantallamiento) o refuerzan (desapantallamiento) a \mathbf{B}_0 . Además, y considerando ya el caso concreto de la RMN de ^1H , la formación de enlaces de hidrógeno también da lugar a fenómenos de desapantallamiento de los núcleos de hidrógeno que forman parte de este tipo de enlaces.

El campo magnético efectivo, \mathbf{B}_{eff} que perciben los núcleos, podemos expresarlo de la siguiente manera:

$$\mathbf{B}_{\text{eff}} = \mathbf{B}_0 - \mathbf{B}_{\text{sh}} = \mathbf{B}_0(1 - \sigma) \quad (4.5.11.)$$

En esta ecuación, \mathbf{B}_{sh} es el campo magnético inducido, proporcional al campo externo aplicado, \mathbf{B}_0 , y σ es un factor de proporcionalidad denominado *constante de apantallamiento*, que describe cómo el entorno electrónico local de un núcleo determinado influye en el campo magnético que percibe y por lo tanto, en su frecuencia de precesión. De acuerdo con esto, podemos expresar la frecuencia de resonancia de un espín como sigue:

$$\omega = \gamma \cdot \mathbf{B}_0 \cdot (1 - \sigma) \quad (4.5.12.)$$

Es habitual utilizar un parámetro relativo independiente del valor de B_0 , denominado *desplazamiento químico* y definido como sigue:

$$\delta = \frac{\omega - \omega_{ref}}{\omega_{ref}} \cdot 10^6 \quad (4.5.13)$$

El desplazamiento químico se expresa en “partes por millón” y viene definido a partir de las frecuencias de resonancia del núcleo de interés, ω , y la del núcleo de una sustancia referencia, ω_{ref} . En la práctica, y para el caso de la RMN de ^1H , se suele emplear como sustancia de referencia un compuesto con protones muy desapantallados, que resuenen a frecuencias particularmente elevadas, entre ellos tenemos por ejemplo, el caso del *tetrametilsilano* (TMS) si se emplean disolventes orgánicos y el *2,2-metil-2-silapentano-5-sulfonato sódico* (DSS), para el caso de disoluciones acuosas. Es precisamente este último uno de los compuestos empleados como referencia en los experimentos de RMN de los mutantes de SH3 estudiados en este trabajo.

4.5.5. Acoplamiento Escalar.

Cuando se observa un espectro de RMN con detalle, aún en el caso de que se trate del de una molécula sencilla, se puede apreciar cómo los picos de resonancia de los diferentes núcleos de la molécula se encuentran desdoblados en diversos picos de intensidades y espaciados característicos, formando los llamados *multipletos*. La respuesta al porqué de esta multiplicidad se encuentra en la interacción o *acoplamiento* que se establece entre los distintos momentos magnéticos presentes en la molécula. Es preciso sin embargo, distinguir entre dos tipos de acoplamiento: dipolar y escalar. El *acoplamiento dipolar* se observa en la *RMN de estado sólido* y fundamenta los *procesos de relajación*. En este caso, el desdoblamiento es consecuencia de la superposición sobre un núcleo concreto del campo externo aplicado, B_0 , y el campo creado por el momento dipolar de otros núcleos próximos. En el caso de moléculas en fase líquida la cambiante reorientación espacial de las mismas promedia a cero esta interacción, que no se observa directamente en los espectros. En líquidos la causa del desdoblamiento de las

señales es el *acoplamiento espín-espín*, *acoplamiento escalar* o *acoplamiento J*. Este tipo de acoplamiento se establece entre los momentos magnéticos de diferentes núcleos unidos por enlaces y se encuentra mediado por una fuerte interacción isotrópica entre los momentos magnéticos de núcleos y de los electrones, que se conoce como *interacción de contacto de Fermi*. El acoplamiento escalar depende del número de enlaces que separan a los núcleos acoplados, ya que el proceso se transmite a través de los electrones de los enlaces (Ramsey y Purcell, 1952).

El acoplamiento escalar puede ser tanto *homonuclear* como *heteronuclear*, o lo que es lo mismo, puede tener lugar entre núcleos de la misma especie isotópica o de especies distintas. En el caso más sencillo posible, en el que la diferencia de desplazamiento químico entre los dos núcleos acoplados sea mucho mayor que los espaciados entre las bandas que se desdoblan, se habla de *espectro de primer orden*, tal y como ocurre en el caso de acoplamientos heteronucleares aunque no siempre en los homonucleares. Si se cumple esta condición, dos núcleos acoplados A y B, con números cuánticos de espín I_A e I_B no nulos, la señal del núcleo A se desdobla en $2I_B+1$ líneas de igual intensidad y la del núcleo B se desdobla con igual espaciado en $2I_A+1$ líneas.

La separación entre dos líneas de una señal múltiple, expresada en Hz, se conoce con el nombre de *constante de acoplamiento*, J , y puede ser tanto positiva como negativa. Estas constantes dependen, como ocurre con el desplazamiento químico, del entorno químico que rodea a los núcleos acoplados por lo que tiene una enorme utilidad en la determinación de estructuras. Las constantes de acoplamiento, a diferencia de lo que ocurre con el desplazamiento químico, no dependen del campo externo aplicado, sino de la geometría o disposición relativa de los enlaces que unen al par de núcleos acoplados (Karplus, 1959).

4.5.6. El Efecto Nuclear Overhauser (NOE).

El *efecto nuclear Overhauser* (NOE) aparece como consecuencia del *acoplamiento dipolar* entre espines próximos en el espacio y está relacionado con los procesos de *relajación nuclear*. El efecto NOE consiste en un cambio observable en la

intensidad de la señal de resonancia de un núcleo, cuando las poblaciones de los niveles de energía de otro núcleo, próximo en el espacio y, por tanto, acoplado dipolarmente con él, han sido perturbadas por una excitación selectiva.

Para explicar el efecto NOE en estado estacionario de forma sencilla, vamos a considerar un diagrama de niveles de energía para el caso más sencillo de dos núcleos I y S, de número cuántico de espín $\frac{1}{2}$, acoplados dipolarmente y no acoplados escalarmente.

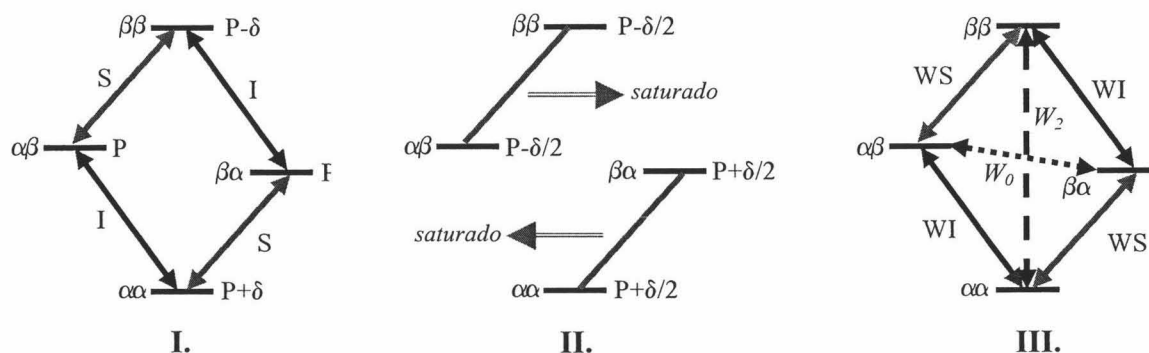


Fig. 4.5.4.: I.) Diagrama de niveles de energía para un sistema de espines idénticos I y S acoplados dipolarmente. II.) Mismo diagrama pero mostrando la variación poblacional de los niveles con respecto a la situación inicial por irradiación del espín S. III.) Posibles transiciones para volver a la situación inicial de equilibrio.

Cuando se satura el espín S por irradiación selectiva, las poblaciones de los niveles energéticos para los dos estados del espín S se igualan, pero esto supone una modificación en las poblaciones relativas de los niveles de energía del espín I, tal y como se aprecia en la figura (fig. 4.5.4.II.). Como es lógico, después de la irradiación el sistema tiende inmediatamente a relajarse a la situación de equilibrio y, por esa razón, tienen lugar en él transiciones que posibiliten recuperar las diferencias de población originales (fig. 4.5.4. III.). La vuelta al equilibrio tiene lugar a través de los tránsitos de frecuencias W_2 y W_0 . Esto es posible si los espines I y S se encuentran próximos en el espacio y, por tanto existe un acoplamiento dipolar entre dichos espines. A ese fenómeno se le conoce como *relajación dipolar* o *relajación espín-red*.

El acoplamiento dipolar depende mucho del movimiento molecular, y dado que la frecuencia de tránsito W_2 es mayor que la de W_0 , cuanto más rápido sea dicho movimiento molecular, más predominará la relajación por medio del mecanismo W_2 sobre el de W_0 . Si las condiciones en las que se encuentra el sistema, ya sea por que se

trate de moléculas pequeñas, porque el disolvente sea poco viscoso o porque la temperatura sea elevada, suponen un rápido movimiento molecular, predominarán las transiciones de frecuencia W_2 . Antes de la irradiación, la diferencia poblacional entre los dos niveles más alejados, o sea el superior y el inferior, era de 2δ y entre los niveles centrales esa diferencia era nula, tras la saturación del espín S, dichas diferencias de población son ahora de sólo δ , y así, el sistema se verá obligado a realizar transiciones de frecuencia W_2 en el sentido nivel superior a inferior. Este hecho supone un incremento en la diferencia de población entre los niveles de energía del tránsito W_1 , y así aumenta la intensidad de la señal del espín I. De forma similar se puede seguir un razonamiento para el tránsito de frecuencia W_0 .

Dependiendo de que el mecanismo de relajación predominante sea W_2 o W_0 , el signo y la intensidad del efecto NOE variarán. Así, el mecanismo W_2 da lugar a efectos NOE positivos y aparece en moléculas de pequeño tamaño. Por el contrario, cuando las moléculas tienen un peso molecular elevado, se relajan mediante el proceso W_0 , con lo que el NOE será entonces negativo.

Dado que el efecto nuclear Overhauser depende de la interacción entre dipolos magnéticos, dicha interacción será tanto más efectiva cuanto menor sea la distancia que los separa. Así por ejemplo, la velocidad de crecimiento del NOE (en un *experimento NOE transitorio* y no en el estado estacionario) depende tanto del movimiento molecular como de la distancia internuclear. En general, se puede observar un efecto NOE en ausencia de otros factores distintos de la distancia, siempre que los dos núcleos interaccionantes se encuentren estén a una distancia inferior a 5Å el uno del otro. Gracias a esta dependencia del efecto NOE con la distancia que separa a dos núcleos en el espacio, se puede extraer información estructural del efecto NOE. De hecho, este tipo de información es la de mayor importancia en la determinación de la estructura de biopolímeros y en general de todo tipo de moléculas.

4.5.7. La Resonancia Magnética Nuclear Bidimensional (RMN-2D).

Para el caso de una molécula real con multitud de núcleos en ambientes químicos diferentes y muchos de ellos acoplados entre sí, el FID que se mide en un experimento simple de RMN es una combinación de todas sus frecuencias, intensidades y decaimientos, incluso si se reduce el estudio de esos núcleos sólo al protón (^1H). Para el caso de las macromoléculas este problema se agrava, dada la gran cantidad de protones que presentan, lo que complica enormemente los espectros monodimensionales, provocando fenómenos de solapamiento que hacen su análisis muy complejo.

Para solventar este problema, en principio podríamos pensar en incrementar la resolución espectral, empleando imanes con campos extremadamente elevados, pero esto resulta ser muy poco práctico. En su lugar, lo que se hace es concentrar el estudio en los fenómenos de interacción (acoplamiento escalar, NOE, etc.) que se establecen entre los diferentes tipos de núcleos de las macromoléculas y observar la evolución de los mismos en dos o más dimensiones, esto es, haciendo uso de la RMN multidimensional.

Dado que el trabajo que aquí se presenta ha hecho uso exclusivamente de la RMN bidimensional (2D) de protón, sólo se van a describir aquí brevemente algunas de las técnicas de RMN-2D y que emplean secuencias específicas de pulsos de radiofrecuencia para manipular la evolución de la magnetización de una muestra concreta. Supongamos que se realiza una secuencia de pulsos como la esquematizada en la figura siguiente, fig. 4.5.5.:

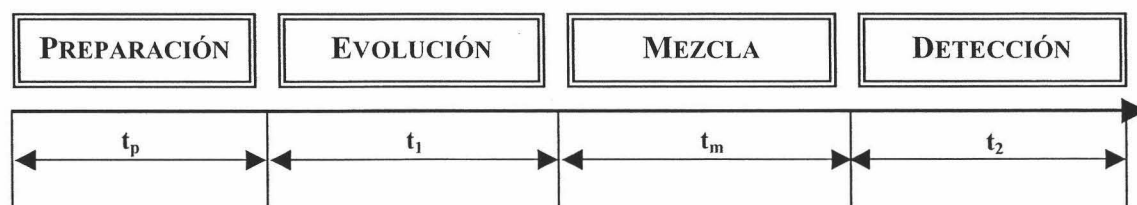


Fig. 4.5.5.: Secuencia general de pulsos para la obtención de un espectro bidimensional (2D) de RMN.

El *periodo de preparación*, t_p , es un tiempo de retardo con el que se pretende que la magnetización alcance de nuevo el equilibrio (la magnetización longitudinal pasa a ser transversal) antes de repetir la secuencia de pulsos en el proceso acumulativo que se sigue normalmente para mejorar la relación señal/ruido. Dicho periodo termina con la aplicación de uno o más pulsos de radiofrecuencia que crean coherencia de fase entre los espines. El *periodo de evolución*, t_1 , se corresponde con la segunda dimensión (F1) de los espectros bidimensionales y en él, la coherencia evoluciona hasta alcanzar un estado que depende del valor de t_1 . El *periodo de mezcla*, t_m , incluye uno o varios pulsos de radiofrecuencia junto con tiempos de retardo y se diseña para transferir coherencia entre espines diferentes. La variación de la señal durante el *tiempo de detección*, t_2 , es lo que se conoce como FID y su transformada de Fourier da lugar a la señal de frecuencia característica (dimensión F2 del espectro bidimensional).

En un experimento de RMN-2D real, los tiempos de preparación, mezcla y detección se mantienen fijos mientras que el tiempo de evolución t_1 se incrementa a intervalos regulares entre medidas. En un experimento de estas características, habrá por tanto una matriz de datos donde cada fila contiene un FID variable con t_2 para cada valor fijo de t_1 y cada columna contiene un FID variable con t_1 para cada valor fijo de t_2 . La doble transformada de Fourier de la matriz de datos $S(t_1, t_2)$, dará lugar al espectro bidimensional donde cada resonancia a una determinada frecuencia en una dimensión se relaciona con otras resonancias a ciertas frecuencias en la otra dimensión, dando lugar a los llamados *picos de cruce o picos de correlación*.

Existen diferentes tipos de experimentos, y por tanto de espectros, de 2D-RMN dependiendo del tipo de información que se desee obtener. Los experimentos más empleados se clasifican en función del tipo de correlación que se establece entre los núcleos, así:

- Correlación por acoplamientos escalares homonucleares.
- Correlación por acoplamientos escalares heteronucleares.
- Correlación por acoplamiento dipolar (NOE).

Si en la secuencia que aparece en la figura anterior, fig. 4.5.5., se introduce un mayor número de periodos de evolución y mezcla, se obtienen, por razonamiento análogo, espectros *multidimensionales*: tri y tetradimensionales, en la práctica.

4.5.7.1. Experimentos bidimensionales de correlación escalar: COSY y TOCSY.

a) COSY: (CO)related SpectroscopY:

Se trata de uno de los experimentos bidimensionales más simples y de mayor utilidad (Jeener et al., 1979); (Aue et al., 1976). Este experimento permite realizar una transferencia de magnetización entre protones acoplados escalarmenete, pero para que la correlación entre ellos sea efectiva, el acoplamiento no debe distar más de tres enlaces. En la figura siguiente, fig. 4.5.6., se muestra la secuencia de pulsos clásica de un experimento COSY:

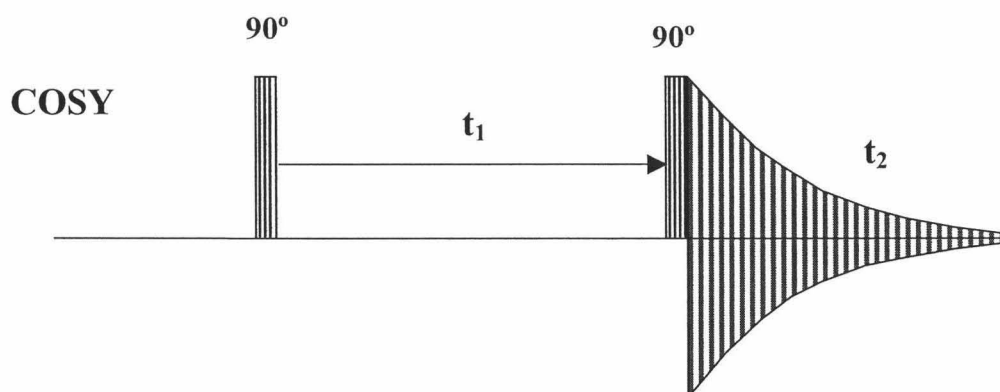


Fig. 4.5.6.: Esquema de pulsos de un experimento bidimensional tipo COSY

El espectro COSY presenta señales tanto en la diagonal como fuera de ésta y distribuidos simétricamente con respecto a ella. Son los llamados *picos de cruce*, consecuencia de la transferencia de magnetización entre núcleos acoplados

escalarmente. Se puede demostrar que las fases de los picos de cruce y los de la diagonal en un experimento COSY difieren en 90° . Lo habitual es ajustar la fase de manera que los picos de cruce aparezcan en *absorción* y los de la diagonal en *dispersión*.

La *constante de acoplamiento activa*, que es la que origina la correlación, hace que la separación de las componentes en antifase de la señal sea mayor o menor. Los acoplamientos pasivos, de cada uno de los protones con otros, dan lugar a desdoblamiento en fase en la dimensión correspondiente a cada protón. La forma antifase de las señales de un espectro COSY provoca la cancelación parcial en el centro del multiplete que aumenta la separación de las componentes, con lo que la constante de acoplamiento aparenta ser mayor de lo que en realidad es (Bruix, 1993; Bruix, 1997). A pesar de ello, se han desarrollado variantes del experimento COSY con objeto de determinar cuantitativamente los valores de dichas constantes de acoplamiento. La cancelación a la que se hacía referencia anteriormente, puede llegar a ser completa en los casos en los que la anchura de la señal y la constante de acoplamiento sean del mismo orden o cuando se den ciertas combinaciones de acoplamientos activos y pasivos.

La información inmediata que se puede extraer de este experimento son los desplazamientos químicos de los protones de un mismo *sistema de espín*, es decir, de cada conjunto de protones acoplados escalarmente entre sí. Así, para el caso de una proteína será posible correlacionar un protón amídico con el protón del carbono α del mismo resto, este a su vez con los protones del carbono β unido a él y así sucesivamente. Los anillos de las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos, dado que forman un sistema de espín diferente, no pueden asignarse a un par NH-C α H determinado haciendo uso únicamente del experimento COSY. De forma similar, tampoco podrán correlacionarse protones de distintos residuos. El problema de la posible cancelación de picos COSY junto con la aparición de solapamiento en zonas de protones α y de cadenas laterales, se soluciona en parte con un nuevo tipo de experimento, el TOCSY, al que nos referiremos posteriormente.

Existe aún una variante del experimento COSY, denominada COSY con *filtro de doble cuanto*, **DQF-COSY**, cuya secuencia de pulsos aparece en la figura siguiente, fig. 4.5.7., y que presenta tanto los picos de cruce como los de la diagonal,

en modo absorción en antifase, con lo que se elimina el problema de la “colas” dispersivas de las señales de la diagonal y reduce la diferencia de intensidad entre los dos tipos de señales.

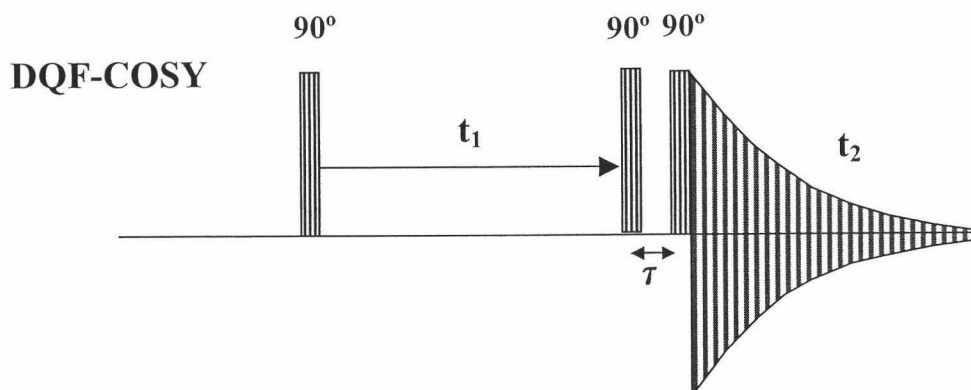


Fig. 4.5.7.: Secuencia de pulsos para un experimento COSY con filtro de doble cuanto, DQF-COSY.

En esta secuencia se aprecia la existencia de un tercer pulso a 90° , que sigue a la secuencia convencional del COSY, tras un pequeño tiempo de retardo, τ , del orden de unos pocos μs . Se trata de una técnica sensible a la fase.

b) TOCSY: (TOtal Correlation SpectroscopY):

Inicialmente, este experimento se denominó **HOHAHA**, como acrónimo de su denominación en inglés: **HO**monuclear **HART**mann **HA**hn, pero actualmente TOCSY y HOHAHA se usan como sinónimos (Braunschweiler et al., 1983); (Bax y Davis, 1985). Como ocurría en el caso del COSY, el experimento TOCSY se basa en la transferencia de magnetización entre núcleos acoplados escalarmente, sin embargo en el caso del TOCSY se consigue que la transferencia tenga lugar entre todos los espines de un sistema, lo cual facilita muchísimo la asignación de señales pertenecientes al mismo sistema de espines. La secuencia de pulsos de un experimento TOCSY se esquematiza en la figura siguiente, fig. 4.5.8.:

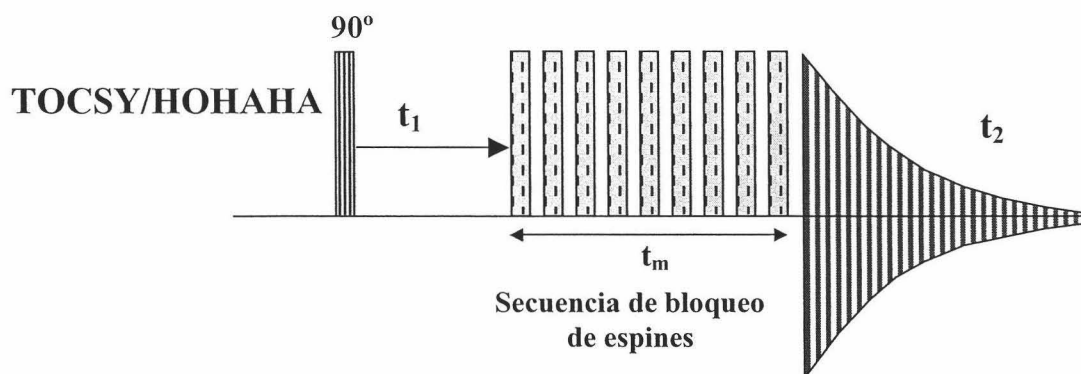


Fig. 4.5.8.: Secuencia de pulsos de radiofrecuencia de un experimento TOCSY/HOHAHA. El tren de pulsos de periodo τ_m tiene como objeto bloquear la magnetización.

Como en el caso de otros experimentos bidimensionales, la secuencia de pulsos comienza con un pulso de 90° con el que la magnetización longitudinal se transforma en transversal, que evoluciona durante el tiempo variable t_1 . El tiempo de mezcla en este tipo de experimento, t_m , está constituido por una serie de repetitiva (*tren*) de pulsos de radiofrecuencia, de elevada potencia, con ciertas longitudes y fases. Hay diferentes trenes de pulsos que cumplen el mismo fin (MLEV-17, WALTZ-16, DIPSI-2, ...). El objetivo principal de este tren de pulsos es bloquear la magnetización transversal a lo largo de un eje, por ejemplo el eje y , haciéndola precesionar alrededor de dicho eje de manera análoga a como lo haría el campo externo B_0 alrededor del eje z . se dice que en estas condiciones la magnetización se encuentra bloqueada. El efecto de este bloqueo es convertir un sistema de espines débilmente acoplados en un sistema de espines fuertemente acoplados, lo que recibe el nombre de *bloqueo de espines*. En las condiciones del bloqueo de espines las diferencias de desplazamientos químicos entre ellos se hacen muy pequeñas, el acoplamiento escalar predomina y la coherencia de un espín está “en resonancia” con la de otros espines del sistema (incluso con los que no se encuentran acoplados de forma directa) y la magnetización se comporta como la de un sistema de espines fuertemente acoplados que evolucionan prácticamente como un espín único. Durante el periodo de bloqueo de espines, se puede transferir magnetización entre todos los protones pertenecientes a un mismo sistema de espín y , por tanto, escalarmente acoplados.

En los espectros TOCSY, tanto las señales de la diagonal como los picos de correlación son señales de absorción y se encuentran en fase. Este experimento permite agrupar todos los protones pertenecientes a un mismo sistema de espín, sin más que analizar la zona correspondiente a los protones amida. Dado que el experimento TOCSY no permite distinguir entre correlaciones directas e indirectas, su análisis debe realizarse junto con el espectro COSY.

4.5.7.2. Experimentos bidimensionales de correlación dipolar: NOESY y ROESY.

a) NOESY: Nuclear Overhauses Effect Spectroscopy:

Como indica su nombre, esta técnica de RMN-2D se basa en el efecto NOE, ya descrito, su origen está en los fenómenos de relajación nuclear por interacción dipolar directa (Macura y Ernst, 1980). Es una técnica muy importante en estudios de determinación estructural porque con estos experimentos se obtiene información sobre las distancias entre protones próximos en el espacio (Neuhaus y Williamson, 1989). La secuencia de pulsos básica de un experimento de este tipo se representa en la figura siguiente, fig. 4.5.9.:

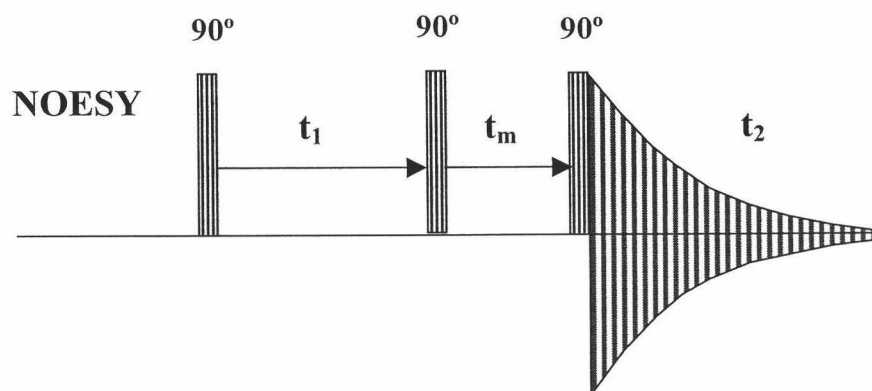


Fig. 4.5.9.: Secuencia de pulsos básica de un experimento NOESY.

El pulso inicial crea magnetización transversal que evoluciona libremente durante t_1 . El segundo pulso convierte una porción de esa magnetización en magnetización longitudinal de *no equilibrio*, diferente para cada espín, que será

proporcional a la componente correspondiente sobre el eje Y en el momento de aplicar este segundo pulso. En el tiempo de mezcla, cada espín trata de alcanzar de nuevo la situación de equilibrio por interacción con el entorno (*relajación espín-red*) y por interacción dipolar directa con otros espines próximos en el espacio, conocida por *relajación cruzada*, que es el mismo mecanismo que da lugar al efecto NOE. Por este último mecanismo se produce la transferencia de magnetización durante el tiempo de mezcla. El tiempo de mezcla concluye con el tercer pulso de 90° que convierte la magnetización longitudinal existente en ese momento, en magnetización transversal observable durante t_2 . Una vez realizada la doble transformada de Fourier se obtiene un espectro bidimensional en el que las frecuencias de distintos núcleos cercanos en el espacio se encontrarán correlacionadas. La magnetización no transferida también se detecta y da lugar a picos en la diagonal.

Las señales de un espectro NOESY se encuentran en absorción pura y en fase. Su intensidad depende de la duración del tiempo de mezcla, t_m , y de la velocidad de los procesos de relajación anteriormente mencionados. Por esa razón el experimento NOESY se basa en NOEs *transitorios* y no en NOEs *de estado estacionario*. Esto hace posible que se pueda aplicar la aproximación de velocidad inicial de crecimiento del NOE (Neuhaus y Williamson, 1989), de modo que se puede relacionar la intensidad del NOE con la inversa de la sexta potencia de la distancia que separa a ambos núcleos. Para que se pueda considerar dicha aproximación como válida, es preciso que los tiempos de mezcla sean cortos. En general, si se quiere determinar la distancia de separación entre dos núcleos acoplados dipolarmente, se hace uso de la intensidad del pico de cruce y la intensidad de una señal de referencia cuyos núcleos se encuentran a una distancia conocida. La intensidad y el signo del NOE dependen del tamaño molecular, dada la dependencia del NOE con el tiempo de correlación. El NOE positivo no puede ser mayor a un 50% de la intensidad original de la señal, pero el negativo puede llegar a alcanzar valores del 100%; por esto el experimento NOESY es valiosísimo para moléculas de elevado peso molecular o para tiempos de correlación largos.

Las moléculas de tamaño medio, por otro lado, pueden dar lugar a NOEs próximos a cero. Además, el NOESY conlleva el problema adicional de la presencia

en él de picos de cruce por *difusión de espín*, de manera que pueden aparecer correlaciones entre dos núcleos distantes entre sí en el espacio pero próximos a un tercero. Si se emplean tiempos de mezcla excesivamente largos, la perturbación de las poblaciones de un espín se puede propagar de núcleo a núcleo a lo largo de la molécula, generándose picos de cruce en el espectro que no implican necesariamente la proximidad espacial de los núcleos correlacionados. Para poder distinguir entre NOEs directos e indirectos, causados por la difusión de espín, o para determinar NOEs en moléculas de tamaño intermedio, se emplea un segundo tipo de experimento bidimensional basado en acoplamiento dipolar, el CAMELSPIN (*Cross-relaxation Appropriate for Mini-Molecules Emulated by Locked SPINs*), también denominado ROESY (Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy).

4.5.8. RMN de protones (^1H -RMN) de proteínas.

Como ya se ha establecido con anterioridad, de los cuatro isótopos de $I=1/2$ de mayor importancia en los biopolímeros (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P), el ^1H es, por su abundancia relativa y el elevado valor de su constante giromagnética, el de mayor sensibilidad tanto absoluta como relativa para su estudio por RMN. Por eso la mayor parte de los estudios de RMN de biopolímeros se basan en espectros de protones, a pesar de que las técnicas que emplean varios núcleos y muestras enriquecidas en los demás isótopos (RMN heteronuclear multidimensional) están adquiriendo importancia creciente hoy día. No obstante aquí nos vamos a referir de forma exclusiva a ^1H -RMN de proteínas.

4.5.8.1. ^1H -RMN de aminoácidos.

El primer paso que se debe seguir para realizar un estudio de RMN de proteínas es la asignación de las resonancias de la molécula en estudio. Para el caso de péptidos, el proceso es relativamente sencillo, pero la complejidad del problema se incrementa enormemente cuando se decide estudiar proteínas. Esto se debe especialmente a la gran cantidad de protones presentes en las mismas y a que tan sólo existen 20 aminoácidos que forman parte de la estructura primaria de las proteínas, con lo que su *variabilidad*

natural es baja y esto da lugar a repeticiones en la secuencia y por consiguiente, a la aparición de solapamientos espectrales. En la siguiente figura, fig. 4.5.10., se representan las regiones de desplazamientos químicos en las que generalmente podemos encontrar a los diferentes tipos de protones de un aminoácido (Bundi y Wuthrich, 1979).

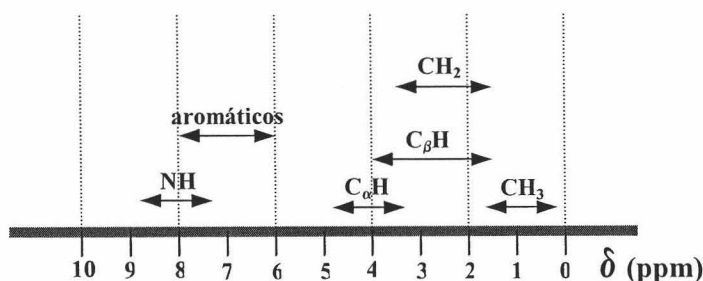


Fig. 4.5.9.: Intervalos aproximados de desplazamientos químicos donde resuenan los diferentes tipos de protones de aminoácidos en péptidos con estructura al azar.

El concepto de *sistema de espín* es muy útil para el análisis de los complejos espectros de 1H -RMN de proteínas; las diferentes líneas espectrales observadas se pueden clasificar en conjuntos que se corresponden con sistemas completos de espín, que no son otra cosa sino conjuntos de espines acoplados escalarmenete. De esta manera, las líneas de resonancia y la red de conectividades a través de acoplamientos escalares forman patrones característicos para cada tipo de aminoácido, que se conservan cuando se encuentran formando parte de proteínas. De este modo, los veinte aminoácidos presentes en las proteínas se agrupan en diversas categorías según el *sistema de espín* que formen sus diferentes protones, desde el más sencillo, la glicina, hasta los complejos aromáticos, y se clasifican según una nomenclatura estandarizada (Pople et al., 1959). Sólo la metionina y los aminoácidos que presenta una cadena lateral aromática (histidina, fenilalanina, tirosina y triptófano) se encuentran constituidos por más de un sistema de espín, el resto disponen de uno único.

4.5.8.2. ^1H -RMN de proteínas.

El espectro de RMN de una proteína desnaturalizada en conformación de cadena estadística puede considerarse aproximadamente como la suma de las líneas de resonancia de los restos aminoácidos que constituyen la cadena polipeptídica (McDonnald y Phillips, 1967). No obstante, cuando se trata de espectros de proteínas nativas o con alta proporción de estructura plegada se aprecia por una parte una mayor dispersión de los desplazamientos químicos debida a la variedad de entornos químicos en que se encuentra cada espín y, por otra, un ensanchamiento de las líneas espectrales que aparece como consecuencia del elevado peso molecular de las proteínas, tal y como se observa en la figura siguiente, fig. 4.5.11.:

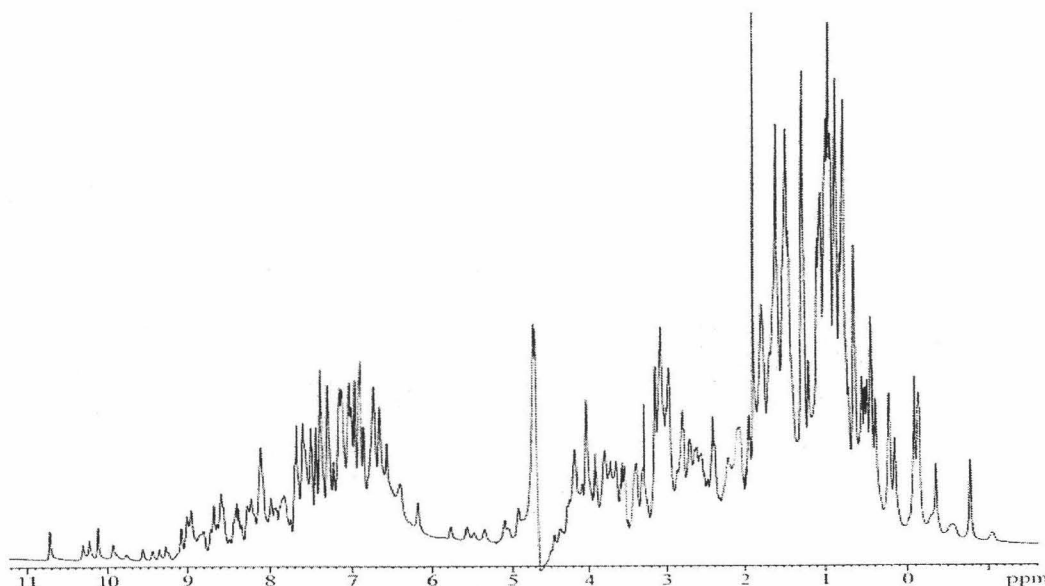


Fig. 4.5.11.: Espectro de ^1H de RMN monodimensional de lisozima a pH 5.3 obtenido en un espectrómetro de 600 MHz.

El agua constituye un problema añadido pues resulta ser una importante interferencia en los espectros de RMN ya que la elevada concentración relativa de ^1H en agua (110M) supone que en los espectros de disoluciones acuosas de proteínas aparezca una intensa banda entre 4.6 y 4.8ppm que podría enmascarar todas las señales de la proteína. Una forma de solventar el problema consiste en *presaturar* la señal de los protones del agua, es decir, se irradia de forma prolongada la muestra con una radiofrecuencia que satura los espines que resuenan a la frecuencia del agua, antes de

obtener el espectro definitivo. Con esta técnica no se consigue eliminar la señal del agua de forma completa pero se reduce considerablemente haciendo visibles el resto de las señales.

Por otro lado, también se suelen registrar espectros de disoluciones de proteína en agua “pesada” (D_2O) en lugar de en agua “ligera”, con lo que se elimina una gran parte de la señal del agua a 4.8ppm. Además, debido al fenómeno de intercambio isotópico, por el que los protones lábiles de los aminoácidos se intercambian con los deuterones del disolvente, las líneas de resonancia de dichos protones así como sus correspondientes acoplamientos escalares con otros protones no lábiles, simplemente desaparecen simplificando los espectros. Este fenómeno de intercambio isotópico, como se detalla en el Apartado 4.6 y a lo largo de toda esta Memoria, constituye un objeto de estudio en sí mismo debido a la gran cantidad de información que puede proporcionar, tanto cinética como termodinámica, sobre los cambios conformacionales y las interacciones en proteínas.

En apartados posteriores se detallan los parámetros experimentales empleados para registrar los espectros bidimensionales de RMN realizados en este trabajo, así como la manera en que éstos han sido procesados.

4.5.9. Adquisición de los espectros de RMN.

Como es lógico, antes de registrar ningún espectro, ya sea mono o bidimensional de RMN hay que realizar una serie de ajustes previos en el espectrómetro. Será preciso primero estabilizar el campo magnético B_0 (“lock”), para lo que es necesario que la muestra contenga una pequeña proporción (5-10%) de algún disolvente deuterado. Posteriormente hay que ajustar las bobinas (“shims”) que rodean la sonda del espectrómetro, donde se aloja la muestra, para que el campo magnético estático sea lo más homogéneo posible y obtengamos de esa manera mejor resolución en el espectro. También es necesario sintonizar (“tunning”) el receptor de radiofrecuencias a la frecuencia del transmisor de pulsos de excitación de la misma y ajustar su sensibilidad (“matching”).

Otro factor importante que hay que controlar durante la adquisición de un espectro de RMN es la temperatura, ya que el desplazamiento químico es fuertemente dependiente de ella. Los dos espectrómetros de RMN empleados para realizar el trabajo de esta Memoria disponen de sendos controles de temperatura, ambos con una precisión de $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$, el espectrómetro AMX 500 de *Bruker* dispone de una unidad BVT2000 Eurotherm de *Bruker*, mientras que el espectrómetro AVANCE 750 de *Bruker* emplea una unidad BVT3000 Eurotherm del mismo fabricante. Los dos controles de temperatura emplean como foco térmico una corriente de aire frío filtrado y deshumidificado. Dado que todos los experimentos se realizaron a una temperatura próxima a 25°C sólo se calibró la temperatura con el estándar de etilén-glicol al 85% en 20% d_6 -DMSO proporcionado por el fabricante del espectrómetro. En el caso del AMX 500, esa temperatura calibrada se corrigió de acuerdo con una ecuación empírica de calibración obtenida previamente mediante la realización de medidas directas de temperatura de la muestra (Sadqi, 2000), por su parte, en el caso del AVANCE 750, la calibración de la temperatura es automática, empleando para ello una rutina de ordenador denominada “batman”, proporcionada por el propio fabricante.

4.5.9.1. Parámetros de adquisición de los espectros.

Todos los experimentos, a excepción de los relativos a la titulación del mutante R21A del dominio SH3 de α -espectrina con el decapeptido p41, se realizaron en un espectrómetro *Bruker* AMX 500, de 500MHz (11.744T de intensidad de campo), controlado por una estación de trabajo Aspect X32 con el programa *UXNMR* de *Bruker*. Por su parte los experimentos de titulación del dominio mutante R21A se realizaron en un espectrómetro *Bruker* AVANCE 750, de 750MHz (17.616T de intensidad de campo) controlado a su vez por una estación HP Visualize P-Class, con el programa *XWinNMR*.

En todos los casos, se registró inicialmente un espectro monodimensional para establecer la anchura espectral y para fijar la frecuencia del transmisor. En el caso de los espectros recogidos en el AMX 500, la anchura espectral fue de 6024.096 Hz mientras que en el caso del AVANCE 750, la anchura espectral fue de 9765.625 Hz. Posteriormente se procedió a calibrar la duración del pulso de 90° , o de otros pulsos en

el caso de los experimentos TOCSY, lo que resulta esencial para que los resultados obtenidos sean óptimos.

Los experimentos COSY en el AMX 500 se registraron en el modo sensible a la fase y con detección en cuadratura con incremento de fase proporcional al tiempo (TPPI, “Time Proportional Phase Increment”) (Bodenhausen et al., 1980); (Marion y Wuthrich, 1983). Se acumularon por lo general 32 barridos de 2048 puntos para la dimensión F2 y 640 incrementos de t_1 para la dimensión F1. La señal del agua fue atenuada por presaturación selectiva a baja potencia (Hore, 1989). Para los experimentos DQF-COSY, empleados para identificar picos de cruce próximos a la diagonal, se emplearon idénticos parámetros.

Para verificar y depurar la asignación de señales, se registraron espectros TOCSY de 32 barridos de 2048 x 640 puntos también, con un tiempo de mezcla de 80ms aprox. Para provocar el bloqueo de espines se empleó la secuencia de pulsos MLEV-17 (Bax y Davis, 1985). En condiciones similares a las empleadas para registrar los espectros TOCSY, se recogieron también espectros NOESY (Jeener et al., 1979); (Kumar et al., 1980) de 32 barridos, con tiempos de mezcla de 150ms.

Por su parte, en el Brüker AVANCE 750 se registraron se registraron espectros TOCSY sensibles a la fase, de 8 barridos de 4096 x 1024 (F2 x F1) puntos, con un tiempo de mezcla de 76ms empleando la secuencia de pulsos DIPSI2. La señal del agua se redujo mediante una secuencia de pulsos 3-9-19 con gradientes (Sklenar et al., 1993); (Piotto et al., 1992). Los espectros NOESY registrados en el Avance 750, en condiciones similares a las empleadas a los TOCSY, con 16 barridos y empleando tiempos de mezcla de 120ms.

4.5.9.2. Procesamiento de los espectros de RMN.

Tanto los FIDs como los parámetros experimentales de adquisición, se almacenaron temporalmente en la estación de trabajo a la que se encuentra asociado cada uno de los espectrómetros empleados, ya sea ASPECT, para el caso del AMX 500, o HP Visualize P-Class, para el caso del AVANCE 750. Posteriormente los datos se

procesan en ordenadores del laboratorio. Así, los espectros monodimensionales se procesaron con el programa MestRec-C (Cobas, 1999) y los espectros bidimensionales se procesaron con el paquete de software NMRPipe (Delaglio et al., 1995) en una estación de trabajo Silicon Graphics O2 o en un ordenador PC bajo Linux.

El procesamiento de los datos incluyó: llenado de ceros en las dos dimensiones, apodización con ventanas seno cuadrado, transformación de Fourier y corrección de fase tanto de orden cero como de primer orden sucesivamente. Eventualmente, se corrigió línea base en los espectros con un polinomio de 5º grado. En el caso de los experimentos COSY de una serie de intercambio H/D, los parámetros correctos de procesamiento se determinaron a partir del primero de los espectros de la serie. En este caso no fue preciso corregir línea base. Los desplazamientos químicos de los espectros bidimensionales se calibraron tomando como referencia la señal del C β H $_3$ del resto alanina 55. El desplazamiento químico de dicha señal, para cada una de las variantes del dominio estudiadas en esta tesis, se ajustó en los espectros monodimensionales tomando como referencia el valor del desplazamiento químico del dioxano, 3.741ppm, o del DSS, 0 ppm..

4.5.9.3. Reasignación de la “huella dactilar” de los espectros de RMN.

La reasignación de las señales de la zona de la “huella dactilar” de cada una de las variantes del dominio (correlaciones COSY intrarresiduo CH $_{\alpha}$ -NH) y la determinación de la intensidad de las señales en las serie de experimentos COSY de intercambio H/D se realizó con el programa NMRView (Johnson y Blevins, 1994). Partimos de la asignación que de la forma WT del dominio realizada por Blanco et al. (Blanco et al., 1997), a pH 3.5 y 25°C. Esencialmente se han reasignado las señales correspondientes a la zona de la huella dactilar de los espectros bidimensionales, ya que son las intensidades de los picos de cruce CH $_{\alpha}$ -NH de los espectros COSY los observables que se han seguido durante los experimentos de intercambio H/D.

La reasignación de los espectros se realizó en todos los casos en las mismas condiciones, pH 3.0 y 27.1°C de temperatura, en tampón 20mM glicina-d $_5$ preparado en

90% H₂O y 10% D₂O. Para llevarla a cabo se registraron y analizaron los siguientes espectros bidimensionales:

- DQF-COSY sensible a la fase.
- TOCSY con un tiempo de mezcla de 80ms.
- NOESY con un tiempo de mezcla de 150ms.

En los casos en los que la resignación se hizo más compleja, como en el de aquellas señales enmascaradas por la señal del agua, se hizo uso también de espectros COSY sensibles a la fase de los experimentos de intercambio H/D, en idénticas condiciones salvo por el disolvente, que en este caso fue 100% D₂O.

Para el procedimiento de reasignación se siguió una estrategia comparativa entre cada una de las señales o picos de cruce de la zona de la huella dactilar del espectro DQF-COSY para cada variante del dominio en estudio y la lista de desplazamientos químicos de la variante WT ya publicada (Blanco et al., 1997). Asimismo, se identificaron sistemas de espín empleando los espectros TOCSY y se comprobó el esquema de NOEs secuenciales y de estructura secundaria (Blanco et al., 1997). La lista de desplazamientos químicos de los picos de cruce CH_α-NH de los espectros de cada una de las variantes del dominio estudiadas a 27.1°C y pH 3.0 en tampón 20mM glicina-d⁵ (H₂O:D₂O, 9:1) aparece en el apéndice I.

La asignación así obtenida se empleó como base para identificar los picos de cruce CH_α-NH en las condiciones en las que se llevaron a cabo los experimentos de intercambio H/D, esto es, en 100% D₂O. Se emplearon para ello los primeros espectros COSY sensibles a la fase adquiridos durante cada experimento de intercambio H/D.

4.6. Intercambio Hidrógeno-Deuterio (IHD).

4.6.1. El fenómeno del IHD.

4.6.1.1. Introducción al fenómeno del IHD .

Las proteínas en disolución acuosa tienen la capacidad de intercambiar algunos de sus hidrógenos (hidrógenos lábiles) con los del disolvente en una escala de tiempo concreta, así se indica en la figura siguiente, fig. 4.6.1:

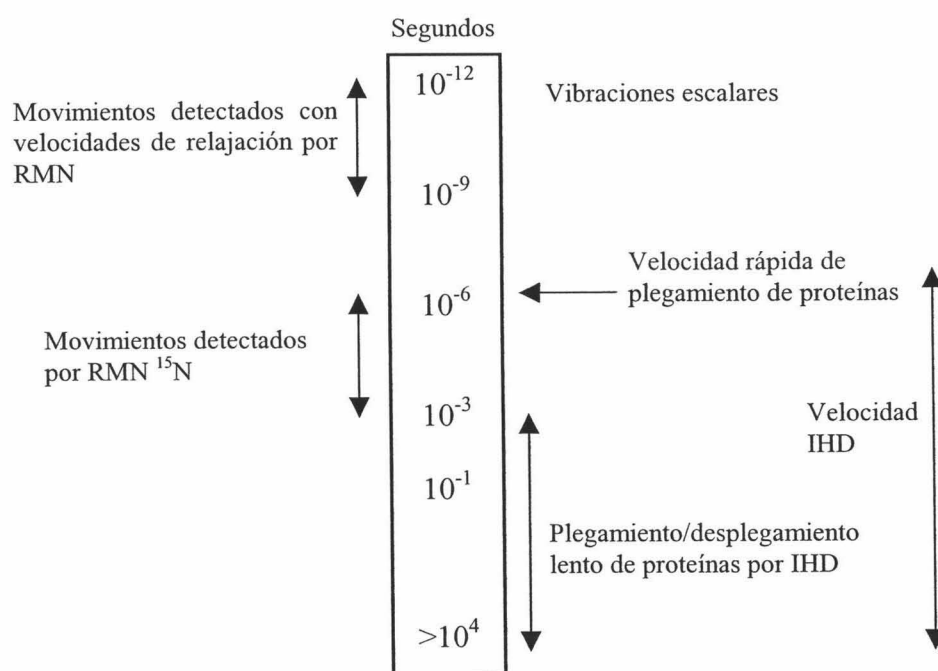


Fig. 4.6.1.: Escala de tiempos para varios procesos relacionados con la dinámica de las proteínas.

La velocidad con la que tiene lugar ese intercambio de un hidrógeno se relaciona directamente con el entorno local en el que se encuentra, de manera que se puede decir que las propiedades estructurales de las proteínas están cifradas en clave de dichas velocidades de intercambio, de ahí el interés en el estudio e interpretación de este fenómeno en las proteínas.

Fue Linderstrøm-Lang en la década de los 50 quién sentó las bases de las medidas de estas velocidades de intercambio (Linderstrøm-Lang, 1955) y a partir de

entonces se han desarrollado multitud de métodos para tratar de caracterizar la estructura y la dinámica de las proteínas y sus interacciones con otras moléculas.

En polipéptidos podemos distinguir entre tres grandes familias de hidrógenos de acuerdo con la manera con la que se intercambian con los hidrógenos del disolvente, tal y como se aprecia en la figura siguiente, fig. 4.6.2.:

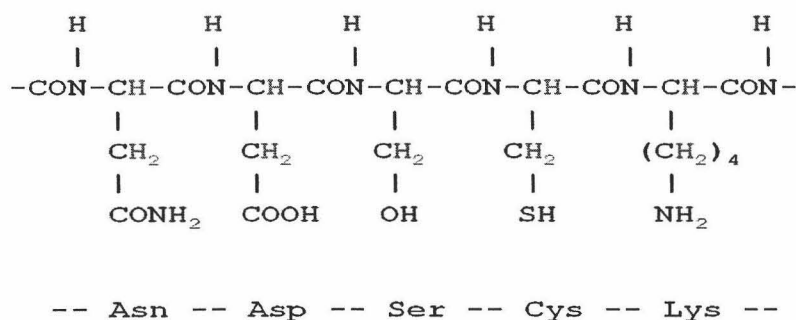


Fig. 4.6.2.: Tipos de hidrógenos en las cadenas polipeptídicas.

- a) Los hidrógenos unidos covalentemente a átomos de carbono (verde) presentan un intercambio tan lento que salvo en raras ocasiones, como en el caso de los C-H en cadenas laterales de histidina, no son observables.
- b) Los hidrógenos de las cadenas laterales unidos a oxígeno (grupos OH hidroxílicos, fenólicos o carboxílicos) o a nitrógeno (grupos amino, guanidinio, amida primaria, imidazol e indol), (en azul) presentan un intercambio muy rápido y no se suele estudiar, salvo ciertos estudios de intercambio con hidrógenos indólicos.
- c) Los hidrógenos unidos al nitrógeno del enlace peptídico de la cadena principal, formando aminas secundarias (en rojo), que tienen una velocidad de intercambio intermedia y cuyas velocidades de intercambio tienen la peculiaridad de variar de forma notable según el entorno que los rodea. La vida media del intercambio de estos

hidrógenos en proteínas lo hace asequible a la técnica de RMN y además su distribución homogénea por toda la cadena polipeptídica los hace idóneos para estudios estructurales.

4.6.1.2. El intercambio intrínseco en las cadenas polipeptídicas. Concepto de factor de protección.

En esta Memoria se recogen exclusivamente estudios de intercambio hidrógeno-deuterio (IHD) que se refieren a los hidrógenos amida peptídicos, en los que se observa el intercambio entre dichos hidrógenos y los deuterios proporcionados por el disolvente en el que la proteína se disuelve y que es una disolución tampón preparada usando el “agua pesada” u óxido de deuterio (D_2O).

El proceso por el que tiene lugar el IHD se representa en la figura siguiente, fig. 4.6.3.:

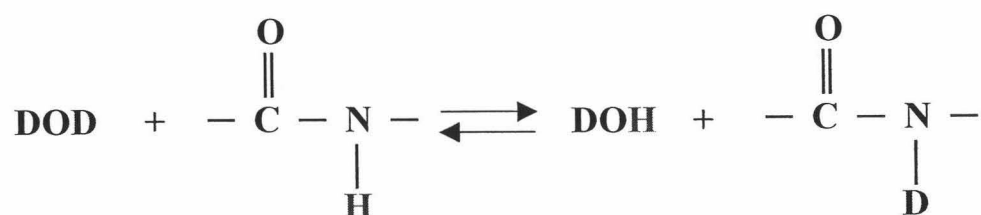


Figura 4.6.3.: Equilibrio químico del proceso de intercambio de un H amida por un D del disolvente.

La velocidad del proceso directo de IHD que tiene lugar cuando un polipéptido se disuelve en una disolución tampón deuterada, a un pD concreto, viene dada por la ecuación de velocidad siguiente, ec. 4.6.1.:

$$-\frac{d[H]}{dt} = k_{int} \cdot [H] \quad (4.6.1.)$$

donde [H] es la concentración de protones que no han intercambiado todavía, t es el tiempo que ha pasado desde la disolución del polipéptido en el disolvente deuterado y

k_{int} es la constante de velocidad de pseudoprimer orden del proceso de intercambio denominada *constante de velocidad intrínseca* o simplemente *constante intrínseca*. Se demuestra que en disolución acuosa el proceso depende del pH (o del pD) ya que está catalizado por los iones H^+ (o D^+) y OH^- (u OD^-) así como por el H_2O (o D_2O), por lo que la constante intrínseca de intercambio depende a su vez de las constantes de velocidad de los procesos catalizados por ácido (k_a), por base (k_b) o por el agua (k_w), ec. 4.6.2.:

$$k_{\text{int}} = k_a[\text{D}^+] + k_b[\text{OD}^-] + k_w \quad (4.6.2.)$$

La representación gráfica del $\log(k_{\text{int}})$ frente al pD da lugar a curvas en forma de V (chêvron) como la de la figura siguiente, fig. 4.6.4., que representan las catálisis ácida y básica de la ecuación anterior. El hecho de que la catálisis básica sea mucho más eficiente que la ácida, sitúa el mínimo de la curva (pD_{min}) en valores de pH bajos, cercanos a 3.0. Las pendientes de la curva a ambos lados del pD_{min} son +1 y -1 debido a las catálisis por D^+ y OD^- que por otro lado son las únicas relevantes, en primera aproximación al menos ((Berger et al., 1959); (Englander, 1969); (Englander, 1972)) aunque a altas temperaturas el agua parece tener una contribución importante (Gregory et al., 1983).

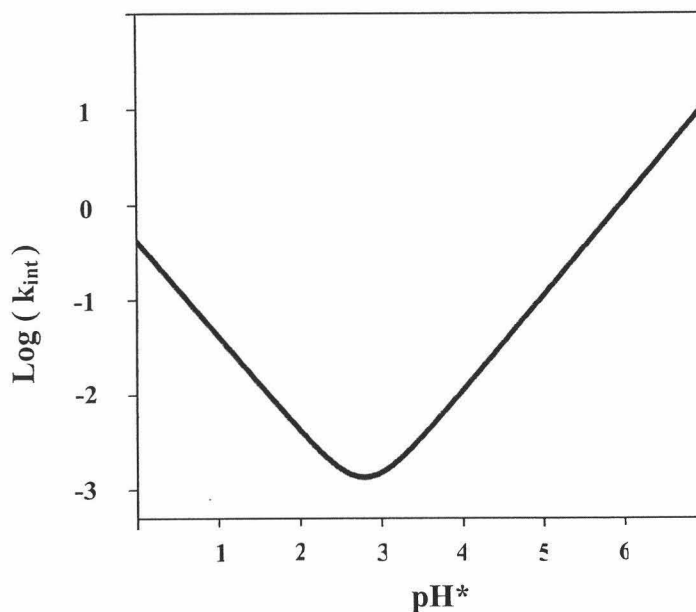


Fig. 4.6.4.: Gráfico de chevron en el que se muestra la dependencia de la constante de velocidad intrínseca de intercambio del hidrógeno amida con el pH^* (Zhang, 1995).

El pH^* indicado en la figura anterior representa a la lectura directa de un electrodo de vidrio, sin corregir el *efecto isotópico*, pero de forma aproximada se puede determinar el valor del pD según la relación (Glasoe y Long, 1960):

$$\text{pD} = \text{pH}^* + 0.4 \quad (4.6.3.)$$

Mediante el empleo de RMN monodimensional, Englander y colaboradores han estudiado de forma exhaustiva la dependencia de la velocidad del proceso de IHD de los hidrógenos amida con diversos factores como el pH, la temperatura y la fuerza iónica, empleando para ello péptidos modelo, que resultan ser modelos adecuados para el estudio del IHD en polipéptidos en conformación de cadena estadística. Así, emplearon como referencia péptidos de poli-DL-alanina y obtuvieron diferentes valores para las constantes de velocidad para los tres tipos de mecanismos de catálisis del proceso en determinadas condiciones de temperatura y fuerza iónica.

Las constantes obtenidas cuando el hidrógeno amida que intercambia está rodeado por otras cadenas laterales diferentes a la de la alanina varían ligeramente con

respecto a aquéllas debido fundamentalmente a *efectos electrónicos inductivos* ((Molday et al., 1972); (Bai et al., 1993)), *electrostáticos* ((Kim y Baldwin, 1982)) y de *accesibilidad por efectos estéricos* ((Tuchsen y Woodward, 1985)).

Se han estudiado, calibrado y tabulado dichos efectos empleando péptidos modelo de diferentes secuencias (Bai et al., 1993) y han resultado ser aditivos, por lo que se han podido corregir los valores de referencia de k_a , k_b y k_w correspondientes a polipéptidos de alanina en determinadas condiciones de temperatura y fuerza iónica, mediante un factor multiplicador para cada cadena lateral diferente a la de la alanina que rodea al hidrógeno amida que intercambia. Así pues, haciendo uso de este criterio y aplicando la ecuación 4.6.2., se puede calcular la constante intrínseca de intercambio, k_{int} , para cualquier hidrógeno peptídico de una secuencia. En nuestro caso se ha hecho uso de un programa de ordenador elaborado a partir de los datos de IHD de péptidos modelo publicados (Bai et al., 1993) para el cálculo de las constantes de velocidad intrínsecas (Sadqi, 2000).

Como es lógico, cualquier tipo de estructura de la cadena polipeptídica supondrá un obstáculo al intercambio que no está presente en el caso de una conformación al azar y que será particularmente notable en el caso de la estructura nativa de las proteínas. En ella, hay hidrógenos situados en el interior de la misma, para los que el acceso del disolvente es mucho más complicado. No obstante, el factor más importante en la ralentización del intercambio de un determinado hidrógeno, es su participación en un enlace de hidrógeno, aún y cuando dichos enlaces de hidrógeno sean superficiales ((Englander y Kallenbach, 1983); (Tuchsen y Woodward, 1985; Tuchsen y Woodward, 1985)). La mayor parte de los hidrógenos de intercambio lento, participan en enlaces de hidrógeno.

Esas restricciones al intercambio para un determinado hidrógeno amida que impone la estructura de la proteína quedan reflejadas en el *factor de protección* (FP) que no es sino la relación entre las constantes de velocidad intrínseca esperada para una conformación en cadena estadística y la constante de velocidad observada cuando hay estructura, tal y como se indica en la ecuación siguiente, ec. 4.6.4.:

$$FP = \frac{k_{int}}{k_{obs}} \quad (4.6.4.)$$

4.6.1.3. Estudios de IHD en proteínas.

Los estudios de IHD en proteínas presentan muchas aplicaciones y permiten analizar sistemas y obtener información que no es accesible a otras técnicas experimentales. Se aplica en estudios estructurales, en estudios cinéticos de plegamiento y de estabilidad de proteínas (Woodward, 1994; Englander et al., 1996) y para estudiar cambios conformacionales e intermedios de plegamiento (Roder et al., 1988; Udgaonkar y Baldwin, 1988; Roder, 1989) a nivel de residuo. Asimismo, se emplea este tipo de estudios para identificar enlaces de hidrógeno en la estructura secundaria (Wüthrich, 1986), localizar sitios de unión de ligandos (Woodward y Hilton, 1979) y determinar las constantes de unión (Schreier y Baldwin, 1976).

La combinación de técnicas de IHD con el empleo de agentes desnaturalizantes físicos o químicos, permite también identificar estados intermedios de plegamiento (Mayo y Baldwin, 1993; Bai et al., 1995). Junto con el enfoque clásico de esta técnica, la aplicación del llamado “etiquetado de pulso” o *pulse-labelling* (Schmid y Baldwin, 1979; Kim y Baldwin, 1980) permitió la realización de estudios cinéticos de plegamiento, inicialmente de procesos lentos y posteriormente, tras la combinación de dispositivos de mezcla rápida y técnicas de RMN bidimensional, se ha podido estudiar procesos que tienen lugar en el intervalo de unos pocos milisegundos (Roder et al., 1988; Bycroft et al., 1990).

Mediante estudios de IHD se ha podido determinar también la estructura secundaria residual en estados parcialmente plegados y en condiciones en las que las proteínas forman “glóbulos fundidos” (Chyan et al., 1993) o incluso para identificar interacciones entre diferentes subunidades de grandes complejos proteicos (Paterson et al., 1990; Mayne et al., 1992).

4.6.2. Mecanismos de IHD en proteínas nativas.

4.6.2.1. Modelo de dos procesos.

Las proteínas nativas intercambian con el disolvente a una velocidad mucho menor que a la que lo hacen los polipéptidos en conformación al azar, en las mismas condiciones experimentales. Para explicar este hecho se han propuesto varios modelos entre los que se encuentra el de *modelo de dos procesos* (Woodward et al., 1982), según el cual, el intercambio de un hidrógeno amida de una proteína con un deuterio del disolvente, acontece a través de dos mecanismos, que dependen de la temperatura de manera diferente.

En condiciones nativas, el intercambio de muchos de los hidrógenos amida de las proteínas presenta cinéticas de baja energía de activación ($20 < E_a < 40 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$), con lo que ese intercambio tiene lugar a través del estado nativo ordenado de las mismas, pero para que se produzca, es preciso que el catalizador (D^+ , OD^- o D_2O) acceda a dicho hidrógeno. Así se propuso que dicho acceso tenía lugar por la formación de pequeños canales en la estructura de la proteína, que fluctuaba levemente. Este es el llamado *modelo de penetración*.

En contraste, en condiciones desestabilizantes, la mayor parte de los hidrógenos amida intercambian mediante un proceso de alta energía de activación ($60 < E_a < 120 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) en el que tiene lugar el desplegamiento global de la proteína y por el cual, los hidrógenos se exponen al disolvente. En la figura siguiente, fig. 4.6.5., se esquematizan brevemente los dos tipos de mecanismos.

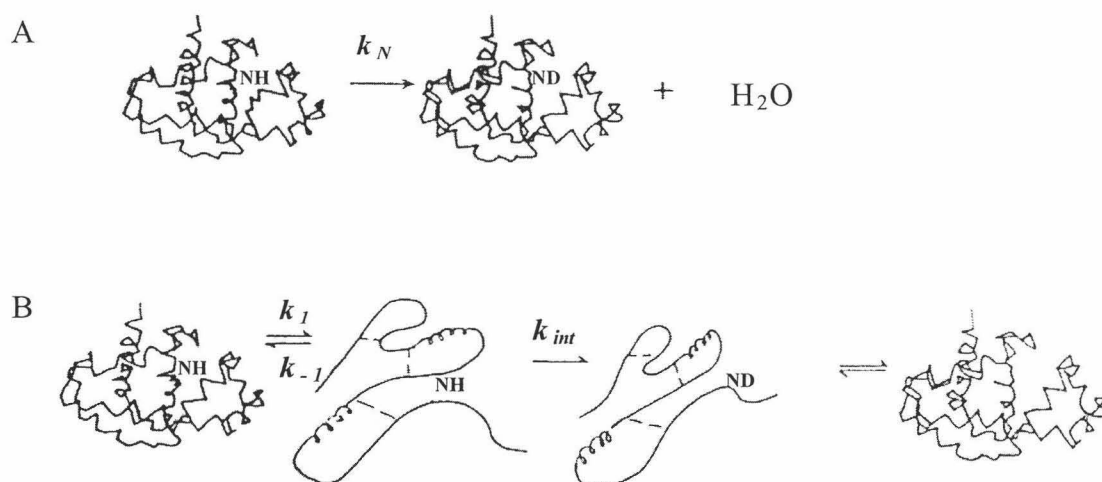


Fig. 4.6.5.: Esquema del modelo de "dos procesos" para el intercambio de los hidrógenos amida de una proteína desde el estado nativo. A) Proceso de baja E_a , y B) Proceso de alta E_a .

De esta manera, en unas condiciones experimentales dadas, la velocidad del proceso de intercambio observada será suma de las contribuciones de los dos procesos anteriormente descritos y así, la constante de velocidad observada será:

$$k_{obs} = k_N + k_D \quad (4.6.5.)$$

donde k_N es la constante de velocidad del intercambio desde el estado nativo y k_D es la del proceso cuando acontece por desplegamiento global.

Del análisis cinético del proceso de alta energía de activación, considerando el estado desplegado como una especie de estado estacionario, se obtiene fácilmente la expresión siguiente para la constante de intercambio de primer orden observada:

$$k_{obs} = \frac{k_1 \cdot k_{int}}{k_{-1} + k_{int}} \quad (4.6.6.)$$

Finalmente, según esa expresión y según sea la relación entre las velocidades de los procesos de repliegamiento de la proteína, k_{-1} , y de intercambio intrínseco desde el estado desplegado, k_{int} , se pueden distinguir dos situaciones extremo:

En primer lugar, tenemos el llamado *límite EX2* en el que las fluctuaciones estructurales de la proteína son mucho más rápidas que el fenómeno de intercambio intrínseco, con lo que k_{-1} es mucho mayor que k_{int} y así:

$$k_{obs} ; \frac{k_1}{k_{-1}} \cdot k_{int} = K_{ap} \cdot k_{int} \quad (4.6.7.)$$

donde K_{ap} es la constante de desplegamiento de la proteína. Esta situación cinética límite, denominada *reacción de intercambio bimolecular* (Hvidt, 1966) y es la que tiene lugar en proteínas de rápido plegamiento y cuyas velocidades de intercambio intrínsecas no son demasiado elevadas (pH no muy alcalino). Por lo general, se prefiere esta situación a la hora de diseñar un experimento de intercambio ya que es precisamente K_{ap} la magnitud de interés, porque contiene información de la estabilidad de la proteína. Según la relación entre K_{ap} , ΔG_{ap} y las constantes cinéticas de intercambio, observada e intrínseca, se deducen la ecuaciones siguiente, ec. 4.6.8.:

$$\Delta G_N^D = \Delta G_{ap} = -RT \cdot \ln(K_{ap}) = -RT \cdot \ln\left(\frac{k_{obs}}{k_{int}}\right) = RT \cdot \ln FP \quad (4.6.8.)$$

en esa ecuación todas las magnitudes pueden determinarse y por tanto se puede obtener ΔG_{ap} .

En el otro extremo, se sitúa el llamado *límite EX1*, en el que el intercambio intrínseco es mucho más rápido que las propias fluctuaciones estructurales de la proteína, con lo que k_{-1} es mucho menor que k_{int} y queda que:

$$k_{obs} ; k_1 \quad (4.6.9.)$$

En este caso, el proceso recibe el nombre de *reacción de intercambio monomolecular* y así, el intercambio tiene lugar para cada apertura estructural con lo que la constante de intercambio experimental otorga directamente la constante de desplegamiento de la proteína. Esta situación aparece en condiciones de pH alcalino, en

las que el intercambio intrínseco es rápido, o en condiciones muy desestabilizantes, en las que el proceso de repliegamiento no tiene lugar o es muy lento.

4.6.2.2. Proceso de baja energía de activación. El modelo de “penetración” frente al de “desplegamiento local”.

Existen dos posturas bien diferenciadas acerca de cómo tienen lugar las fluctuaciones estructurales que permiten a los hidrógenos amida de una proteína plegada, ser accesibles al disolvente e intercambiar. Una de las corrientes, considera que el intercambio de hidrógeno tiene lugar a través de pequeñas y rápidas fluctuaciones conformacionales que posibilitan el acceso del disolvente hasta varias decenas de Å en el interior hidrofóbico de la proteína (Woodward y Rosenber.A, 1971); (Ellis et al., 1975); (Woodward et al., 1982), con lo que dicho proceso de intercambio tendría lugar en el propio estado nativo de la proteína. La constante cinética del proceso sería entonces:

$$k_{obs} = k_b = b \cdot k_{int} \quad (4.6.10.)$$

donde b representa a la probabilidad de que el disolvente penetre en el interior de la proteína para que tenga lugar el intercambio. Si se tiene en cuenta que k_{obs} tiene dos contribuciones (ec. 4.6.5.) y que el intercambio en las proteínas estables ocurre según el mecanismo EX2, entonces se demuestra que:

$$k_{obs} = (K_{ap} + b) \cdot k_{int} \quad (4.6.11.)$$

ecuación ésta de la que se puede volver a deducir que pueden considerarse dos situaciones extremo:

- Puede ocurrir que $b \ll K_{ap}$, con lo que el intercambio tiene lugar a través del estado desplegado de la proteína.
- Si por el contrario, $b \gg K_{ap}$, entonces el intercambio ocurre directamente desde el estado nativo.

Por otro lado, existe también otra corriente que considera que el proceso de baja energía de activación se produce según un modelo de *desplegamiento local* (Hvidt, 1966); (Englander y Kallenbach, 1983); (Englander, 1975). Según este modelo, la proteína sufre fluctuaciones conformacionales locales que provocan una ruptura temporal de los enlaces de hidrógeno de los que participan los hidrógenos amida de la cadena polipeptídica y así el hidrógeno se expone al disolvente y tiene lugar el intercambio. Es lógico pues suponer, que aquellos hidrógenos situados en una misma sub-región de la proteína intercambien aproximadamente con la misma velocidad debido a la existencia de *cooperatividad estructural* por la que los hidrógenos de una misma *unidad estructural* se exponen al disolvente al mismo tiempo.

En este modelo, el esquema cinético del proceso de baja energía de activación es idéntico al de alta energía de activación, la constante de velocidad de intercambio observada, k_{obs} , se define según la ecuación 4.6.6. pero ahora, k_I y k_{-I} son las constantes de velocidad de los procesos conformacionales de apertura y cierre respectivamente de la sub-región de la proteína en la que está el hidrógeno amida que intercambia. En este caso, en el límite EX2, K_{ap} representa la constante de equilibrio del proceso de apertura-cierre local (fluctuación) y también es posible determinar a partir de ella, el ΔG_{ap} del cambio conformacional local.

4.6.2.3. *Generalización termodinámico-estadística del modelo de despliegamiento.*

Debido a la gran variabilidad que se encuentra en las velocidades de intercambio en una proteína, se ha generalizado el modelo de *desplegamiento local* de manera que se propone que el intercambio del hidrógeno amida de un residuo de aminoácido concreto de una proteína puede ocurrir por:

- a) fluctuaciones locales en las proximidades del residuo cuyo hidrógeno amida se intercambia.
- b) despliegamiento de un subdominio o región de la proteína que contiene a dicho residuo.

c) desplegamiento global de la proteína.

En la figura siguiente, fig. 4.6.6., se esquematizan brevemente las tres situaciones descritas anteriormente:

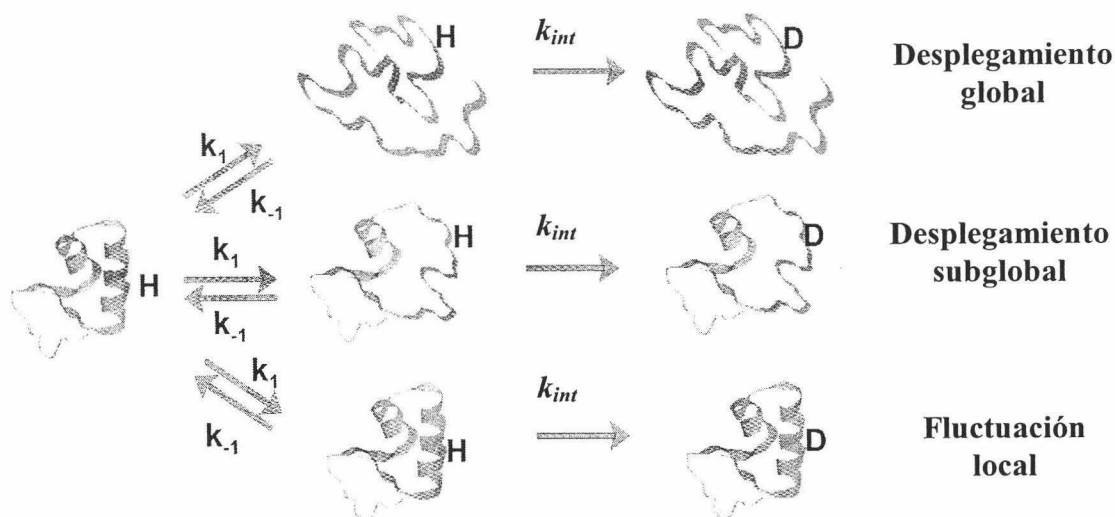


Fig. 4.6.6.: Esquema de los diferentes cambios conformacionales que puede sufrir una proteína para dar lugar a la exposición al disolvente de un determinado hidrógeno amida peptídico para su posterior intercambio.

La generalización del modelo de desplegamiento local, sin considerar priorizada ninguna de las tres vías anteriores por las que puede tener lugar el intercambio de un cierto hidrógeno amida, pasa por considerar a la constante de apertura-cierre de la región en la que se localiza ese hidrógeno amida como la razón entre las probabilidades, P_i , de que la proteína se encuentre en estados conformacionales en los que dicho hidrógeno amida en particular se encuentre expuesto, $j(ex)$, o no expuesto, $j(n-ex)$, al disolvente (Hilser y Freire, 1996; Hilser et al., 1996; Hilser et al., 1996);(Hilser y Freire, 1997; Hilser et al., 1997) y (Hilser et al., 1998), tal y como se expresa en la ecuación siguiente, ec. 4.6.12.:

$$K_{ap} = \frac{\sum_{i,j(ex)} P_i}{\sum_{i,j(n-ex)} P_i} \quad (4.6.12.)$$

La probabilidad de un cierto estado conformacional, cuya energía libre de Gibbs, con respecto al estado nativo, es ΔG_i , vendrá dada por la expresión siguiente, ec. 4.6.13.:

$$P_i = \frac{e^{\left(\frac{-\Delta G_i}{RT}\right)}}{Z} \quad (4.6.13.)$$

donde Z es la función de partición, definida en la ecuación siguiente, ec. 4.6.14., y en la que la sumatoria se extiende a todos los estados de ΔG_i , accesibles al sistema en estudio, la proteína.

$$Z = \sum_i e^{\left(\frac{-\Delta G_i}{RT}\right)} \quad (4.6.14.)$$

De este modo, si consideramos la concepción termodinámico-estadística del IHD, , la constante del proceso de “apertura” para la exposición de un cierto residuo j al disolvente viene dada por la ecuación siguiente, será la relación que existe entre las sumas de probabilidades de los estados que exponen, j -ex, y que no exponen, j -nex, dicho residuo j al disolvente. Así, nos queda la ecuación siguiente, ec. 4.6.15.:

$$K_{ap,j} = \frac{\sum_{i,j-ex} e^{-\Delta G_i/RT}}{\sum_{i,j-nex} e^{-\Delta G_i/RT}} \quad (4.6.15.)$$

y tomando logaritmos y multiplicando por “-RT”, queda finalmente la ecuación siguiente, ec. 4.6.16.:

$$\Delta G_{ap} = -RT \ln K_{ap,j} = -RT \ln \left(\frac{\sum_{i,j-ex} P_i}{\sum_{i,j-nex} P_i} \right) = -RT \ln \frac{\sum_{i,j-ex} e^{-\Delta G_i/RT}}{\sum_{i,j-nex} e^{-\Delta G_i/RT}} \quad (4.6.16.)$$

En esta ecuación se relacionan ΔG_{ap} , que se puede determinar experimentalmente a partir de los experimentos de intercambio para cada residuo j de la proteína, y ΔG_i , las energías de Gibbs para los estados en los que dicho residuo se expone (ex) o no se expone (n-ex) al disolvente. De las medidas de intercambio hidrógeno-deuterio se obtiene, por tanto, información de tipo termodinámico sobre los procesos conformacionales que sufren las proteínas en las condiciones de estudio y que llevan a la exposición al disolvente del hidrógeno amida de cada residuo de la cadena y, en consecuencia, a su intercambio.

Los métodos tradicionales, ya sean ópticos o calorimétricos, para caracterizar la estabilidad de una proteína, pasan por la determinación de la constante del equilibrio de desplegamiento global, K_D , mediante la desnaturalización de la proteína, es decir, en condiciones muy diferentes a aquéllas en las que habitualmente se encuentran las proteínas, como pueden ser elevadas temperaturas, altas concentraciones de agentes desnaturalizantes, etc. Además, los resultados que se obtienen suelen presentar ciertos problemas como las inclinaciones de línea base o el estrecho intervalo de condiciones en el que son válidos, lo que requiere largas extrapolaciones fuera del intervalo de medida (Nozaki y Tanford, 1970), (Pace, 1986) y, sobre todo, que en dichas condiciones, las proteínas suelen presentar irreversibilidad de algún tipo o sufren agregaciones.

Los resultados obtenidos mediante experimentos de IHD por el contrario, presentan la ventaja de que pueden proporcionar de forma directa los parámetros termodinámicos de estabilidad de las proteínas en estudio merced a que en condiciones de medida EX2 las velocidades de intercambio de los hidrógenos amida que están protegidos dependen de la constante de equilibrio de desplegamiento cada región de la estructura en las condiciones de estudio relevantes.

Así, las medidas de IHD en equilibrio en condiciones EX2 proporcionan información termodinámica con una resolución del residuo sobre los cambios conformaciones que sufren las proteínas en disolución. Además, si estas medidas se combinan con la variación de otras variables experimentales, como la concentración de agentes desnaturizantes (Bai et al., 1995), (Sadqi et al., 2002), temperatura (Sadqi et al., 2002) o presión, pueden determinarse propiedades termodinámicas de los diversos estados presentes en el equilibrio conformacional de la proteína e, incluso, deducir a partir de aquellas sus características conformacionales.

4.6.3. Procedimiento experimental.

En este apartado se describe la metodología seguida para la determinación experimental de las constantes de velocidad de intercambio de las diferentes variantes del dominio SH3 de α -espectrina, teniendo en cuenta que en todos los casos, las condiciones en las que se han llevado a cabo los experimentos han sido las mismas, a saber: muestras proteína de concentraciones en torno a 4.5mM, en tampón 20mM glicina-d₅, en 100% D₂O, pH* 3.0 (lectura directa en el pHmetro) y 27.10°C de temperatura.

4.6.3.1. Realización del experimento de intercambio.

En todos los experimentos de IHD realizados con cualquiera de las variantes del dominio SH3 estudiadas, se parte de una muestra de proteína liofilizada totalmente protonada, obtenida a partir de una disolución de a misma procedente de la purificación (ver apartado 4.8.1.). Dicha disolución se dializa extensivamente frente a agua acidificada a pH 3.0 con HCl y posteriormente se liofiliza. Posteriormente, el liofilizado se disuelve de nuevo en agua y se le ajusta el pH exactamente a 3.0 con HCl diluido, y se vuelve a liofilizar. De esta manera, se puede asegurar que el pH final de la muestra de intercambio, tras su disolución en el tampón correspondiente, será prácticamente 3.0.

Cada experimento de intercambio, a excepción del llevado a cabo con el complejo de R21A SH3-Spc con el decapeptido p41, se inicia disolviendo *in situ* unos 18 mg de liofilizado de la proteína en 500 μ l de tampón deuterado a temperatura ambiente. Ese momento será nuestro tiempo cero del proceso de intercambio. Inmediatamente, la disolución así obtenida se filtra a través de un filtro de un tamaño de poro de 0.45 μ m para eliminar restos no disueltos.

En el caso de la muestra del experimento realizado con el complejo de R21A SH3-Spc y p41, se prepara previamente una disolución de decapeptido p41 en el mismo tampón de intercambio. La concentración de p41 en esta disolución se calculó para alcanzar posteriormente una saturación de la proteína superior al 85%. A esta disolución de p41 se le reajustó el pH* a hasta 3.00 con DCl diluido, se centrifugó para eliminar cualquier resto sin disolver y se midió su concentración que resultó ser 7.4 mM. El experimento de intercambio se inició disolviendo aproximadamente la misma cantidad de liofilizado de proteína de los experimentos anteriores (unos 18 mg) en 500 μ l de la disolución concentrada de ligando p41.

Las muestras se pasan lo más rápidamente posible a un tubo de RMN de 5 mm de diámetro que se introduce en la sonda del espectrómetro, previamente termostaticado a la temperatura de estudio. Una vez introducida la muestra en el mismo, se reajustó la homogeneidad del campo magnético del instrumento y se establecieron los parámetros del propio experimento en sí, constituido por una serie de espectros COSY sensibles a la fase, consecutivos. El tiempo transcurrido entre la disolución de la muestra (tiempo cero, t_0) y el de comienzo de adquisición de los espectros (tiempo inicial, t_i) fue generalmente de unos 15 a 20 min.

Para lograr distribuir adecuadamente los puntos de las cinéticas de intercambio, de tal manera que un mayor número de ellos se localizara en la zona inicial de la escala de tiempo las mismas, que es donde tiene lugar el intercambio de la mayor parte de los hidrógenos poco protegidos, se ajustó la duración de los espectros COSY adquiridos durante el intercambio modificando el número de espectros promediados para cada incremento del tiempo t_i del espectro. El tiempo correspondiente a cada uno de los puntos de la cinética, se consideró como el transcurrido desde el tiempo cero de la

cinética a la mitad de la duración de la adquisición de cada espectro COSY (Sadqi, 2000).

Los espectros COSY se registraron en modo sensible a la fase, con una anchura espectral de 6024.096 Hz y con $2048(F2) \times 256(F1)$ puntos. La señal del agua residual se eliminó por presaturación a baja potencia (~ 70 dB) durante el tiempo de relajación de 1 s de los espines (Hore, 1989).

Los espectros COSY registrados se procesaron como se describe en el apartado 4.5.9.2. y la identificación y análisis de los picos de cruce CH_{α} -NH de la zona de la huella dactilar del espectro, se realizó empleando el programa NMRView (Johnson, 1994), el cual permite no sólo identificar dichas señales, sino determinar las intensidades de las mismas. Éstas son proporcionales a la fracción de ocupación por hidrógeno de un determinado grupo amida peptídico, durante el proceso de intercambio. Dado que cada señal de correlación COSY en modo sensible a la fase consta de cuatro componentes, como valor de intensidad de cada pico se tomó el valor promedio de la intensidad en valor absoluto de las cuatro componentes. La intensidad resultante se normalizó con respecto a la de la señal de correlación CH_{α} - $C_{\beta}H_3$ del resto alanina 55, que corresponde hidrógenos que no intercambian y además es fácil de localizar y está aislada en el espectro (Sadqi, 2000).

En algunas ocasiones y debido a la proximidad de algunas señales de correlación a la señal del agua residual o por solapamientos parciales entre señales diferentes, la medida de intensidad no pudo llevarse a cabo en la región del espectro situada por encima de la diagonal, donde se sitúan las correlaciones NH(F2)- CH_{α} (F1) sino que hubo de hacerse en la zona del espectro situada por debajo de la diagonal, donde se sitúan las correlaciones CH_{α} (F2)- NH(F1), (Sadqi, 2000).

Así, para cada residuo de la proteína que tenga un intercambio suficientemente lento para poder medirlo, se obtienen una serie de valores de intensidad relativa normalizada, I , proporcional a la fracción de hidrógenos que no han intercambiado aún, en función del tiempo central de cada experimento COSY, que es el tiempo de intercambio, t .

4.6.3.2. Obtención de los factores de protección.

De los 60 residuos con hidrógeno amida del dominio SH3, se han podido seguir las cinéticas de intercambio de entre 40 – 50 residuos dependiendo de la variante considerada. El ajuste de los datos de intensidad frente a tiempo se realizó empleando una ecuación cinética de primer orden, 4.6.17.:

$$I = I_0 \cdot e^{(-k_{obs} \cdot t)} + C \quad (4.6.17.)$$

donde I_0 , factor pre-exponencial, se corresponde con la intensidad de la señal normalizada a tiempo 0, es decir, antes de que comience el intercambio, t es el tiempo en segundos, k_{obs} es la constante de velocidad observada para el intercambio del hidrógeno amida de un residuo concreto y C es una constante que se identifica con la intensidad de la señal cuando el intercambio se ha completado, es decir, la intensidad del ruido del espectro COSY.

El ajuste de los datos experimentales se llevó a cabo mediante un procedimiento de mínimos cuadrados para obtener k_{obs} con el programa Origin 6.1, de Microcal Software Inc. (Sadqi, 2000), y así, se obtuvieron muy buenos ajustes para la mayor parte de los residuos del dominio.

Dado que los experimentos de intercambio se están llevando a cabo a pH ácido y teniendo en cuenta que las velocidades de plegamiento del dominio SH3 en estas condiciones son varios órdenes de magnitud superiores a las velocidades intrínsecas de intercambio, puede considerarse que las cinéticas de intercambio se sitúan en el **límite** cinético **EX2**, (Radford et al., 1992). Los valores de las constantes intrínsecas de intercambio, k_{int} , para cada uno de los residuos del dominio, se determina mediante el programa de ordenador descrito en el apartado 4.6.1.2. a partir de la secuencia de la proteína, el pH y la temperatura a la que se produce el proceso de intercambio. El factor de protección, FP , vendrá dado por la relación entre k_{int} y k_{obs} , según la ecuación 4.6.4. Finalmente, a partir de esos datos de factores de protección y haciendo uso de la ecuación 4.6.8., se determinan los valores de las energías de Gibbs aparentes, ΔG_{ap} , de los procesos conformacionales de apertura-cierre de la estructura para cada uno de los

residuos de la proteína. Dichos valores contienen la información termodinámica sobre la estabilidad de cada región estructural de la proteína.

4.7. Clonación de mutantes del dominio SH3-Spc.

4.7.1. Introducción.

La gran cantidad de estudios que se están llevando para la determinación de la estructura, la función o la utilidad de muchas proteínas requieren de grandes cantidades (del orden de miligramos) de muestras de alta pureza, lo cual no siempre es posible, especialmente si se tiene en cuenta que dichas proteínas se encuentran en pequeñas cantidades en las células. Además, muchos de estos estudios, requieren de la alteración de dichas proteínas para estudiar aspectos diversos de su función biológica y mecanismos de catálisis, su estabilidad y plegamiento, su estructura, su afinidad y especificidad por ciertos sustratos, etc. La *Ingeniería Genética* proporciona las herramientas moleculares necesarias para producir la cantidad y calidad de muestra necesarias para dichos estudios y además permite modificar los genes que codifican cualquier proteína de interés prácticamente de cualquier manera que se desee. Este tipo de alteraciones en el material genético incluyen cambios en la secuencia genética (mutaciones), eliminación de parte de la misma (deleciones) o introducción de fragmentos nuevos en la misma (inserciones). Todo esto ha permitido el nacimiento de lo que se ha venido a denominar como *Ingeniería de Proteínas*, que engloba a un conjunto de técnicas que permiten, entre otras cosas, la obtención de proteínas con alteraciones muy específicas en su secuencia de aminoácidos, que denominaremos *mutantes*. Dichos mutantes, facilitan el estudio de diversos aspectos de la estructura, función y estabilidad de las proteínas, como pueden ser los mecanismos de catálisis, su afinidad y especificidad por ciertos sustratos, su estabilidad y plegamiento, etc.

La técnica desarrollada para construir estos mutantes recibe el nombre de *Mutagénesis Dirigida* que engloba tres métodos diferentes: mutagénesis “en casete”, extensión de “primer” o cebador y los procedimientos basados en la *Reacción en Cadena de la Polimerasa* (RCP), este último método ha sido el que se ha escogido para la producción de los mutantes que se estudian en esta memoria, dadas sus ventajas con respecto a los otros dos, como se detalla en la sección 4.7.3. La estrategia general para la obtención de mutantes de proteínas por el método de la RCP, en sistemas de expresión bacterianos (Ausubel, 1992; Creighton, 1993), se detalla en la figura 4.7.1. y

consiste en utilizar como punto de partida o molde, la secuencia de ADN que codifica a la proteína natural (WT). Mediante el diseño de cebadores adecuados y el empleo de la RPC se consigue finalmente gran cantidad de copias de la secuencia de ADN que codifica a la proteína mutada, al que se denomina ADN *recombinante* por proceder de la “combinación” o *hibridación* de moléculas de ADN de distinto origen.

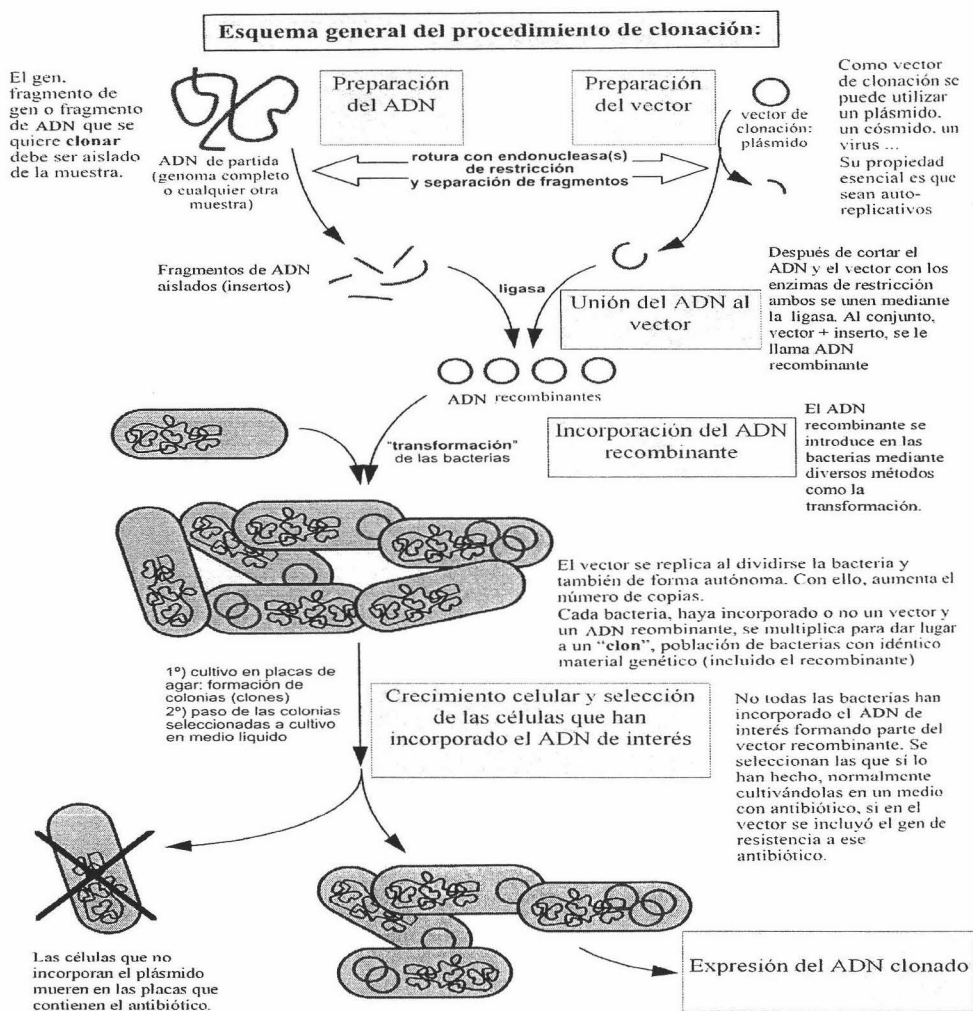


Figura 4.7.1. Esquema general del proceso de clonación mediante el empleo de técnicas de ADN recombinante. No se indica la técnica de la Reacción de la Polimerasa en Cadena (RPC), (fig. 4.7.2)

Los últimos pasos del proceso de clonación incluyen: la digestión del ADN obtenido con *enzimas de restricción* para obtener el fragmento del mismo que contiene exclusivamente la secuencia que codifica a la proteína mutada, al que se llama comúnmente *inserto*; la *ligación* de dicho fragmento a un vector de expresión adecuado, dando lugar al *plásmido mutante*; la introducción del mismo en células hospedadoras

adecuadas (en nuestro caso *Escherichia coli*) mediante un procedimiento denominado *transformación*. Las células así transformadas se hacen crecer en medios de cultivo adecuados que contienen un antibiótico frente al que, gracias a que contienen el plásmido mutante, presentan resistencia. Esto sirve por un lado para evitar en la medida de lo posible posibles contaminaciones del cultivo por otros microorganismos no resistentes al antibiótico en cuestión y por otro, evitar el crecimiento en dicho medio de aquellas células no transformadas que no serían capaces de producir la proteína deseada. Finalmente, los ensayos de expresión, en los que se emplea un agente inductor ya sea físico o químico, servirán para determinar si las células transformadas con el ADN mutante son capaces o no de producir la proteína en cantidades adecuadas.

4.7.2. Glosario de definiciones y conceptos básicos en ingeniería genética.

Antes de pasar al estudio detallado de las técnicas empleadas para la producción de las diferentes variantes del dominio SH3-Spc estudiadas en esta memoria es preciso introducir una serie de conceptos básicos que aparecerán más tarde y que se detallan a continuación:

- *ADN recombinante*: molécula de ADN formada por combinación o hibridación de segmentos precursores de ADN de distinto origen.
- *Cebador o "primer"*: Oligonucleótido que contiene la secuencia complementaria a cualquiera de los extremos de la doble cadena de ADN molde.
- *Célula hospedadora*: célula bacteriana en la que se introduce el plásmido que contiene el gen que codifica una determinada proteína.
- *Digestión o "restricción"*: proceso mediante el cual se corta un fragmento de ADN, en sitios específicos de su secuencia, por la acción de enzimas (endonucleasas) de restricción.
- *Endonucleasas de restricción*: enzimas capaces de reconocer ciertas secuencias de unos pocos pares de bases de la doble cadena de ADN, por las que son capaces de cortarla.

- *Inserto*: fragmento de ADN que contiene el gen de la proteína que se desea clonar.
- *Ligación*: mecanismo de formación de un enlace fosfodiéster entre dos bases separadas y por el que la ADN-ligasa es capaz de producir un plásmido a partir de un inserto y cierto vector preparado para ello.
- *Oligonucleótido*: fragmento de ADN monocatenario constituido por un número reducido de pares de bases (pb).
- *Plásmido*: pequeña molécula de ADN bicatenario circular presente en bacterias, con carácter autoreplicativo. Su secuencia codifica algunas de las proteínas de la bacteria y se usa para introducir en la célula huésped el gen que codifica la proteína que se desea clonar.
- *Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP)*: técnica empleada para la amplificación de secuencias concretas de ADN por un factor enorme, a través de una serie de ciclos repetitivos de desnaturalización, apareamiento y elongación por medio del enzima ADN-polimerasa.
- *Recombinación*: proceso por el cual dos moléculas de ADN diferentes se combinan para dar lugar a una nueva que contiene fragmentos de las dos moléculas precursoras por integración de una en otra, por intercambio de segmentos homólogos entre ellas o la sustitución de un segmento de una de ellas por otro de otra molécula diferente.
- *Transformación*: procedimiento por el que se introduce un plásmido en la célula bacteriana hospedadora.
- *Vector*: fragmento de ADN bicatenario y circular de varios miles de pb de longitud. Contiene un origen de replicación (Ori), sitios específicos para el corte del mismo con endonucleasas de restricción, comunes a los del inserto que se quiere introducir en él y varios genes más entre los que están los de resistencia a ciertos antibióticos u otros que permiten la selección de cepas bacterianas transformadas con dicho vector de otras que lo están con el plásmido (entendiendo al plásmido como el formado por el *vector* con el *inserto* del gen que codifica a la proteína en cuestión).

4.7.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP).

4.7.3.1. Introducción.

La reacción de la polimerasa en cadena, RPC, ha tenido y tiene un papel esencial en el desarrollo de las modernas técnicas de ingeniería genética. Podríamos decir que su relativamente fácil realización y poca duración así como su capacidad para originar un gran número de copias de una secuencia específica de ADN, la hacen ser una herramienta básica de la Biología Molecular.

La *Reacción en Cadena de la Polimerasa* (RCP) demostró desde que comenzó a desarrollarse, tener un enorme potencial para los métodos de mutagénesis (Scharf et al., 1986), así, las bases no complementarias (mutaciones) existentes entre el cebador de amplificación y la hebra de ADN molde, eran incorporadas a la secuencia del molde como consecuencia de dicho proceso de amplificación. Posteriormente se introdujeron modificaciones en el método inicial, que permitieron la introducción de mutaciones en un fragmento de ADN producido por RCP, en cualquier punto de su secuencia (Higuchi et al., 1988), lo que se describirá más adelante, apartado 4.7.4.

Desde un punto de vista general, la RCP se lleva a cabo de manera cíclica, en la que cada ciclo está constituido por tres pasos básicos (fig. 4.7.2) que se repiten:

a) **Desnaturalización térmica de la doble cadena de ADN parental:**

En este primer paso se desnaturaliza la molécula de ADN molde que se desea amplificar, separándose las dos cadenas complementarias que la conforman de manera completa por acción de la temperatura. Para ello, se calienta la mezcla de reacción a 94°C durante un tiempo que oscila entre 1 y 3 min.

Sin embargo, durante la repetición de este paso a lo largo del total de ciclos, es conveniente no mantener la temperatura de desnaturalización durante más de 1 minuto debido fundamentalmente a la pérdida de actividad del enzima ADN-polimerasa. En la descripción original del método (Mullis y Faloona, 1987), se empleaba el *fragmento de*

Klenow de la ADN-polimerasa, que no es resistente a la temperatura y por tanto, había de añadirse fresca en cada ciclo. Posteriormente, se introdujo la *ADN-polimerasa* de *Thermus aquaticus* (*Taq*) (Lawyer et al., 1989), que resulta ser resistente a las altas temperaturas y que por tanto, no tenía que reponerse fresca en cada ciclo (Erlich et al., 1988). Por otro lado, gracias a esa capacidad de la *Taq* polimerasa para resistir elevadas temperaturas se pudo automatizar el proceso y además no se comprometía la especificidad del proceso de hibridación del ADN ya que si la desnaturalización no se produce de forma adecuada porque la temperatura alcanzada sea demasiado baja, la doble cadena de ADN parental se reaparea rápidamente y así la hibridación (b) y elongación (c), no se dan adecuadamente o la RCP tiene lugar entre ellas mismas, con lo que aparecen falsos positivos. Si la proporción de citosinas (C) y guaninas (G) en la secuencia molde es mayor que la de adeninas (A) y timinas (T), también habrá que tenerlo en cuenta, ya que la temperatura y el tiempo de desnaturalización de la doble cadena parental será mayor.

b) Hibridación específica de los cebadores a sus secuencias complementarias respectivas de cada cadena de ADN parental:

En este segundo paso tiene lugar la hibridación de los oligonucleótidos cebadores a sus secuencias específicas complementarias de las dos cadenas de ADN parental. Como se discutirá más adelante, la temperatura a la que tiene lugar esa hibridación también es crítica, ya que de ella depende la especificidad del proceso de hibridación y ha de ser ajustada de forma empírica. Cuando la temperatura es muy elevada, no se produce la hibridación y si es demasiado baja, tiene lugar de forma inespecífica e incluso fenómenos de hibridación entre los propios cebadores si presentan secuencias complementarias entre sí. Por lo general, se suelen emplear temperaturas que oscilan en torno a los 55°C, tal y como se ha hecho en las RCPs realizadas en esta memoria. El tiempo de duración de esta etapa oscila en torno a 1 min.

c) Extensión de las cadenas de los cebadores por mediación de la ADN-polimerasa.

La hibridación de los cebadores a sus secuencias complementarias específicas en las cadenas de ADN parental tiene lugar en una orientación tal que sus cadenas se

elongan por mediación del enzima ADN-polimerasa en la región comprendida entre los dos cebadores, la región diana. El enzima ADN-polimerasa más empleado en la RCP es la Taq ADN-polimerasa, que como ya se ha establecido, es resistente a las altas temperaturas y que es la que se ha empleada en las RCPs realizadas en esta Memoria. Su temperatura óptima de funcionamiento se sitúa en torno a los 72°C, que es la temperatura a la que tiene lugar la extensión de los cebadores. A esa temperatura, el enzima es capaz de añadir 62 bases por segundo a la cadena que extiende.

No obstante, esta polimerasa carece de actividad correctora 3'-5' exonucleasa, lo que hace que a medida que el número de ciclos se incrementa, las posibilidades de que introduzca una o varias mutaciones en la secuencia de polinucleótido que está extendiendo, sean cada vez mayores. Para evitar este problema, en la medida de lo posible, se pueden emplear otras polimerasas termoestables que incorporan actividad correctora y por tanto, más fidelidad en el proceso de elongación (Cariello, 1991), (Mattila et al., 1991), (Lundberg et al., 1991). En cualquier caso, la fidelidad del proceso de amplificación puede asegurarse con posterioridad mediante la clonación, secuenciación y posterior comparación de moléculas amplificadas de manera independiente.

El tiempo de duración de esta etapa depende de la longitud del fragmento de ADN que se desea amplificar, si bien suele estar en torno a 1min para fragmentos del orden de mil pares de bases (1kb). Ahora bien, dado que la actividad del enzima va deteriorándose a medida que pasa el tiempo como consecuencia de las elevadas temperaturas a las que se ve sometida durante la etapa de desnaturalización, es conveniente incrementar el tiempo de extensión de los cebadores (c), entre 2 y 5 segundos por ciclo completado, a partir de los diez primeros ciclos de la RPC.

En la figura 4.7.2 se muestra detalladamente la reacción en cadena de la polimerasa, completa, durante varios ciclos de la misma. Como se puede apreciar, Tras realizarse esos tres saltos de temperatura, se completa el primer ciclo de la reacción, con lo que se obtienen dos nuevos fragmentos de ADN de longitud variable a partir de los parentales. Durante el segundo ciclo, que se desarrolla de forma análoga, las cadenas originales y las producidas en el primer ciclo, se separan, con lo que se generan así cuatro sitios adecuados para la hibridación de los cebadores. Los cebadores que se

hibridan a las nuevas cadenas generadas en el primer ciclo son extendidos por la polimerasa hasta el final de la cadena molde, dando lugar a una copia precisa de la región diana.

Finalmente, en un tercer ciclo, las moléculas de ADN de doble cadena producidas son exactamente idénticas en la zona de la región diana y, posteriormente, en ciclos sucesivos, se produce una amplificación exponencial en el número de fragmentos con la secuencia diana, hasta alcanzar las 2^{n-1} copias de esa secuencia diana, donde n es el número total de ciclos que normalmente suele estar en torno a 25-35.

Suele ser bastante común el realizar un último paso de extensión final, tras haber completado los ciclos programados, en el que las mezclas de reacción se mantienen entre 5 y 10 min a 72°C para asegurar la completa extensión de todas las cadenas de ADN producidas.

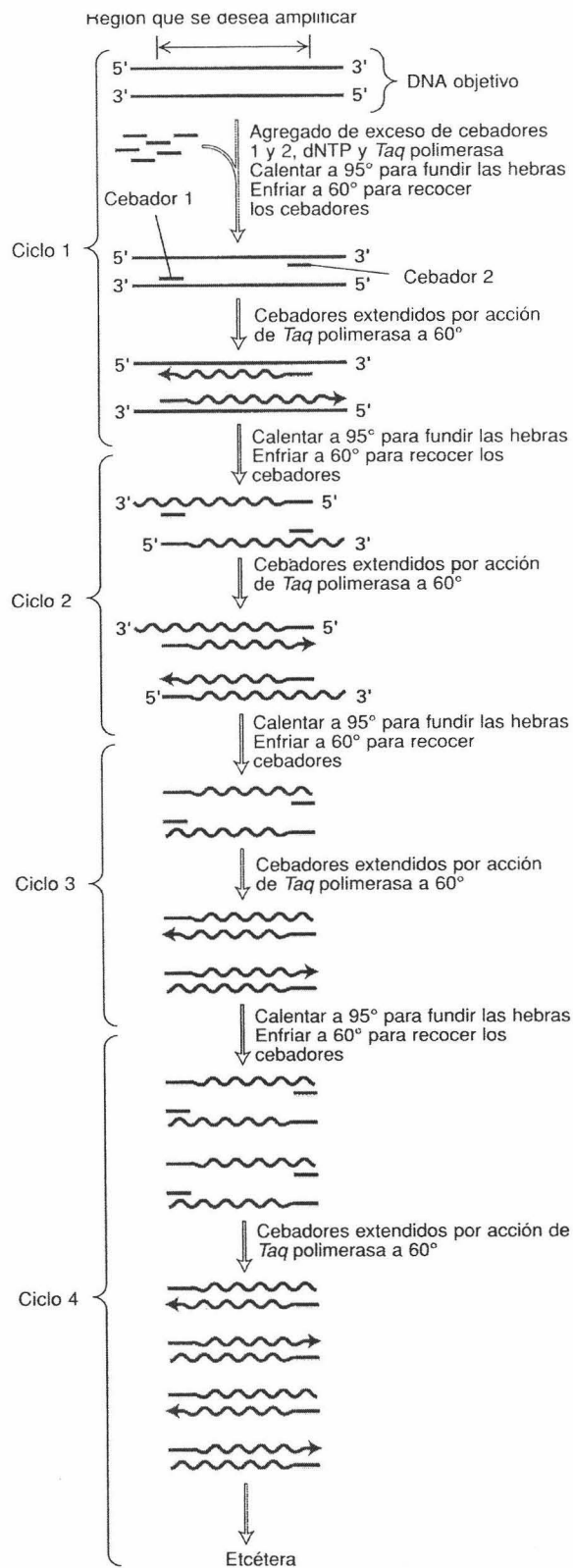


Figura 4.7.2. Esquema general de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP). En cada ciclo, las cadenas de ADN parental se separan, los cebadores se hibridan a los extremos de la región diana y la ADN-polimerasa los extiende en la región flanqueada por los mismos.

En la siguiente figura, fig. 4.7.3., se muestra el esquema de ciclos básico empleado para la realización de las RCPs necesarias para la obtención de los diferentes mutantes de SH3-Spc estudiados en esta Memoria. Tras completarse la RCP es conveniente guardar las mezclas de reacción en frío, a no más de 4°C, pero lo más deseable, para evitar su degradación, es congelarlas a -20°C hasta que se vaya a proseguir con el proceso de clonación.

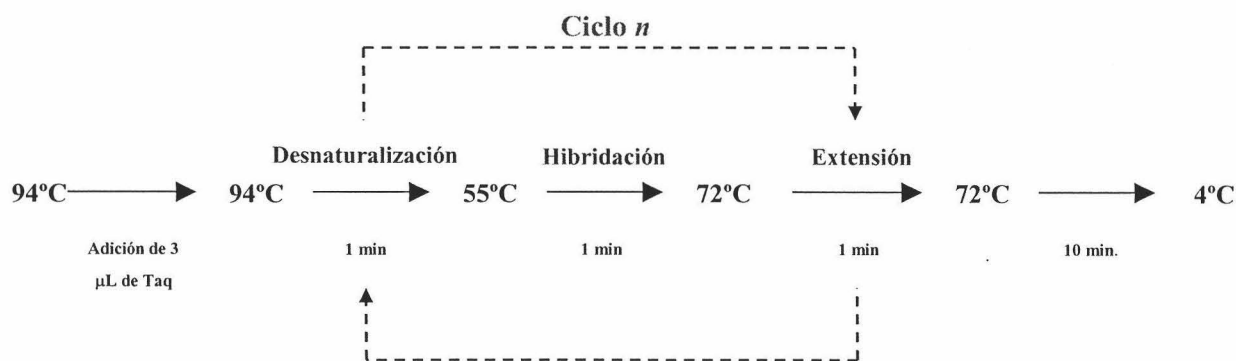


Fig. 4.7.3: Esquema general de los ciclos programados para la realización de las RCPs llevadas a cabo en esta memoria.

4.7.3.2. Puesta en práctica del método de la RCP.

Para poder poner en práctica el método, resulta necesario disponer de los diferentes componentes o reactivos que intervienen en la reacción enzimática descrita anteriormente, como son los *cebadores*, los *oligonucleótidos*, los *desoxinucleótidos trifosfato* o dNTPs, los *iones Mg²⁺*, la *polimerasa*, el *ADN parental o molde* y por supuesto una *disolución tampón* en la que se lleve a cabo el proceso.

Por lo general, tanto los oligonucleótidos como los cebadores (que también son oligonucleótidos) son sintéticos y se suelen suministrar liofilizados, en cantidades y purzas variables. Por esta razón, es preciso prepararlos antes de poder emplearlos en la RCP. Así, los liofilizados se disuelven perfectamente en unos 400µL de agua estéril, con agitación fuerte y continua durante al menos 10 minutos. Posteriormente, y con objeto de eliminar cualquier posible partícula de polvo o impureza que pudiese interferir en el correcto desarrollo de la RCP, se centrifuga la disolución obtenida en una centrífuga de mesa durante 10 minutos a velocidad máxima. El sobrenadante se recoge con cuidado y posteriormente se determina espectrofotométricamente la concentración

del oligonucleótido o cebador en la disolución preparada, que será la disolución *madre* o stock del mismo, a 260 nm, ya que es esa la longitud de onda a la que las moléculas de ADN presentan su máximo de absorción.

El coeficiente de extinción molar de un cierto fragmento de ADN se encuentra determinado por las bases nitrogenadas que lo componen, ya que todas absorben a esa longitud de onda en mayor o menor grado. Así, existe una relación empírica que permite determinar dicho coeficiente a partir de la secuencia nucleotídica del fragmento en cuestión. Dicha relación es la siguiente:

$$\epsilon_{260} = n_A \times 15.44 + n_T \times 9.7 + n_C \times 9.2 + n_G \times 11.4 \text{ (M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}\text{)} \quad (4.7.1.)$$

donde n_A , n_T , n_C y n_G representan al número total de adeninas (A), timinas (T), citosinas (C) y guaninas (G) que constituyen la molécula de ADN considerada. Una vez se ha determinado el coeficiente de extinción a 260 nm y se ha medido el espectro de absorción, se puede determinar sin problema la concentración del oligonucleótido en la disolución madre preparada, aplicando la ecuación de Lambert-Beer.

Como norma general, estas disoluciones madre de oligonucleótidos o cebadores están demasiado concentradas como para que se puedan usar directamente para realizar la RPC. Las concentraciones óptimas de los mismos en la mezcla de reacción deben encontrarse dentro de un intervalo comprendido entre 0.1 y 0.6 μM , ya que si las concentraciones de los mismos son demasiado elevadas pueden aparecer subproductos inespecíficos de reacción y si son demasiado bajas, la reacción no progresaría completamente o tendría un rendimiento bajo. Por esa razón, se suelen preparar disoluciones de oligonucleótido o cebador de una concentración aproximada a 10 μM , en agua estéril, a partir de las disoluciones madre ya preparadas. Todas estas disoluciones se pueden almacenar congeladas a -20°C durante periodos de tiempo razonablemente largos.

En cuanto a los desoxinucleótidos trifosfato, tienen dos funciones esenciales, por un lado aportan los eslabones de la cadena polinucleotídica que se sintetiza durante la RCP y que es copia de la cadena parental de ADN y, por otro lado, la energía

“contenida” en sus enlaces fosfodiéster es liberada cuando se hidrolizan y se emplea para establecer el enlace entre las diferentes unidades que componen la nueva cadena en formación. Usualmente se emplea una disolución que contiene una mezcla de los cuatro dNTPs en agua estéril: dATP (2'-desoxiadenosín-5'-trifosfato), dCTP (2'-desoxicitosín-5'-trifosfato), dTTP (2'-desoxitimidín-5'-trifosfato) y dGTP (2'-desoxiguanosín-5'-trifosfato). En nuestro caso se ha empleado una disolución mezcla de dNTPs de la casa comercial Roche Biochemicals. También en este caso existe un rango de concentraciones óptimo en la mezcla de reacción y que se sitúa entre 50 y 500 μM , si bien por lo general se suelen emplear concentraciones de 200 μM . Esta disolución de dNTPs también se almacena a -20°C .

Los iones Mg^{2+} son *cofactores* de la reacción y son necesarios ya que, al tener carga positiva, se asocian a los dNTPs y a la molécula de ADN parental, que tienen carga negativa, dando lugar a un complejo que constituye el sustrato de la ADN-polimerasa. Sus concentraciones óptimas en la reacción se sitúan normalmente entre 1 y 5 mM, aunque su concentración efectiva depende de los demás componentes de la reacción con los que interacciona, como son los dNTPs, los pirofosfatos libres (PPi) o el EDTA. Usualmente se emplean concentraciones de este ion en torno a 1.5 mM cuando la concentración de la mezcla de dNTPs es del orden de 200 μM . Un exceso de este ion en la mezcla provoca un descenso en la especificidad de la amplificación y con ello a la aparición de subproductos, mientras que una concentración excesivamente baja del mismo, puede dar lugar a que el rendimiento de la RPC sea significativamente más bajo.

Existen varios tipos de ADN-polimerasas, de diferente origen, que se distinguen entre sí esencialmente por su capacidad correctora y en su resistencia a la temperatura. La elección de una u otra se hará en función de las necesidades del momento, esto es la aplicación y longitud del fragmento de ADN obtenido. En nuestro caso, se ha empleado la *Taq ADN-polimerasa*, de uso general y bastante resistente a la temperatura, a pesar de que carezca de actividad correctora, como ya hemos visto. Está recomendada para la amplificación de fragmentos de una longitud inferior a los 3000 pb. Por lo general, se emplean cantidades que oscilan 0.5 y 2.5 U por cada 50 μL totales de mezcla de reacción. Al igual que en el caso de otros reactivos, si se pone en exceso se puede originar un descenso en la especificidad de la amplificación y, con ello, la aparición de

subproductos de reacción y si la cantidad añadida no es suficiente, el rendimiento de la reacción será bajo. La ADN-polimerasa que se ha utilizado en las RCPs realizadas en este trabajo fue de la casa comercial *Progenetic S.L.*, suspendida en glicerol y es importante tener en cuenta que no debe mantenerse durante más tiempo del estrictamente necesario a temperaturas superiores a -20°C para evitar que pierda actividad.

El ADN parental también debe añadirse a la mezcla de reacción en unas cantidades adecuadas para que el producto amplificado de la RCP se forme correctamente. Así, se recomienda añadir 500 ng como máximo de ADN genómico humano, entre 1 y 10 ng de ADN bacteriano y no más de 500 ng si se emplea como molde el plásmido completo, aunque la cantidad óptima de ADN molde dependerá siempre de la aplicación posterior y del error aceptado en el ADN amplificado por la RCP.

Finalmente es preciso indicar que para que la reacción tenga lugar correctamente el medio debe encontrarse tamponado a un pH que oscile entre 8.3 y 9.0, si bien en ocasiones aumentar el pH del mismo estabiliza el ADN molde y mejora así el resultado final de la reacción.

Una vez descritos los diferentes componentes de la RCP y su función, se describen a continuación los pasos a seguir para la preparación y realización de la RCP.

Todos los componentes de la mezcla de reacción, a excepción de la propia ADN-polimerasa, por la razón expuesta anteriormente, han de descongelarse previamente, pero siempre en baño de hielo, para evitar que se degraden por efecto de un incremento en la temperatura, especialmente en el caso de los dNTPs y el ADN molde. Para la realización de la RCP se han empleado tubos estériles de 200 μL de capacidad y en ellos se han preparado las mezclas, siguiendo un orden concreto a la hora de adicionar los componentes, para evitar reacciones cruzadas no deseadas entre los mismos. Las mezclas para las RCPs realizadas en este trabajo de investigación tienen un volumen total de 50 μL y se han preparado en el orden siguiente:

- 1º) 5 μL de tampón comercial de la Taq ADN-polimerasa, MgCl_2 15 mM.
- 2º) 1 μL de la disolución mezcla de dNTPs de concentración 10 mM.
- 3º) 5 μL de disolución de cada uno de los oligonucleótidos empleados, de concentración 10 μM .
- 4º) 0.1 – 0.2 μL de disolución de ADN plasmídico (molde) o una colonia de células transformadas con el plásmido (ver sección 4.7.3.6.) que será el ADN molde.
- 5º) Una gota de aceite mineral que sella la reacción y evita la evaporación de la mezcla cuando alcance temperaturas elevadas.
- 6º) Se añade agua destilada estéril hasta completar 50 μL .

Todas las mezclas de reacción se preparan en hielo y por supuesto en el ambiente más estéril posible, posteriormente se introducen los tubos en el *termociclador*, cuyo diseño permite programar la secuencia de ciclos y pasos de la RPC que se desean llevar a cabo, como ya se han descrito. Se comienza seguidamente el proceso y, una vez alcanzada la temperatura de 94°C, se añaden cuidadosamente unos 0.3 μL de ADN-polimerasa de 2U/ μL , procurando que llegue a la mezcla de reacción y que no se quede sobre el aceite mineral de sellado. Haciéndolo así, se consigue por un lado que la polimerasa esté el menor tiempo posible a temperaturas superiores a -20°C y por otro que cuando se añada a la mezcla de reacción las cadenas de ADN parental se encuentren ya desnaturalizadas (abiertas).

Una vez concluida la reacción es preciso comprobar que ésta ha transcurrido correctamente y para ello, se comprueban todas las RCPs mediante electroforesis en agarosa al 2%. Si las RCPs han sido positivas, se observarán las bandas correspondientes a los productos de la misma en el gel. Si se observa una banda única en la posición correcta de acuerdo con el tamaño molecular esperado del fragmento amplificado, entonces se puede decir que la reacción ha transcurrido sin formación de subproductos y, por tanto, el producto de la misma se puede purificar directamente desde la mezcla de reacción. Si por el contrario se observaran más bandas en el gel, entonces la reacción ha dado lugar a productos secundarios. Será pues preciso identificar, con ayuda de patrones de peso molecular, a cuál de las bandas observadas

corresponde el producto deseado y purificarlo a partir de ella, cortándola directamente del gel y empleando los protocolos pertinentes.

4.7.4. Mutagénesis Dirigida. Diseño e introducción de mutaciones en fragmentos de ADN.

Antes de proceder con la estrategia de mutagénesis, tras haber escogido qué mutaciones se desea realizar sobre el ADN parental, es preciso tener en cuenta qué posición ocupan dentro de la secuencia de bases del mismo, ya que dependiendo de que estén próximas o alejadas de los extremos de la cadena polinucleotídica, la metodología a seguir será ligeramente diferentes, como se describe más adelante. Así, en la figura 4.7.4. se representa la secuencia del gen que codifica a la forma natural, WT, del dominio SH3 de α -espectrina, que es la construcción base sobre la que se han diseñado el resto de las variantes del dominio estudiadas en esta Memoria.

En cualquier caso, lo primero que se ha de hacer es diseñar los oligonucleótidos para llevar a cabo la RCP y que flanquearán los extremos de las dos cadenas de ADN parental sobre la que se desea realizar la mutación. Para ello se han de respetar una serie de condiciones durante esta etapa de diseño, de manera que se consiga que la RCP que se llevará a cabo con estos oligonucleótidos sea mucho más eficiente.

En primer lugar, se ha de procurar que la longitud de los mismos no exceda de 20 a 30 pb, si bien es posible y no muy infrecuente que se diseñen oligonucleótidos de mayor longitud. En segundo lugar, la proporción de citosinas (C) y guaninas (G) debe estar entre un 40 y un 60%, dejando el resto a las adeninas (A) y timinas (T) y además es conveniente que las secuencias de los extremos de estos oligonucleótidos estén acotadas por G y C, cuando sea posible, porque en el apareamiento de estas dos bases se establecen más enlaces de hidrógeno que los que se forman cuando se aparean A y T, con lo que estas cadenas se aparearán con más eficiencia a sus complementarias del ADN parental, lo que supone una mejora del rendimiento de la RCP.

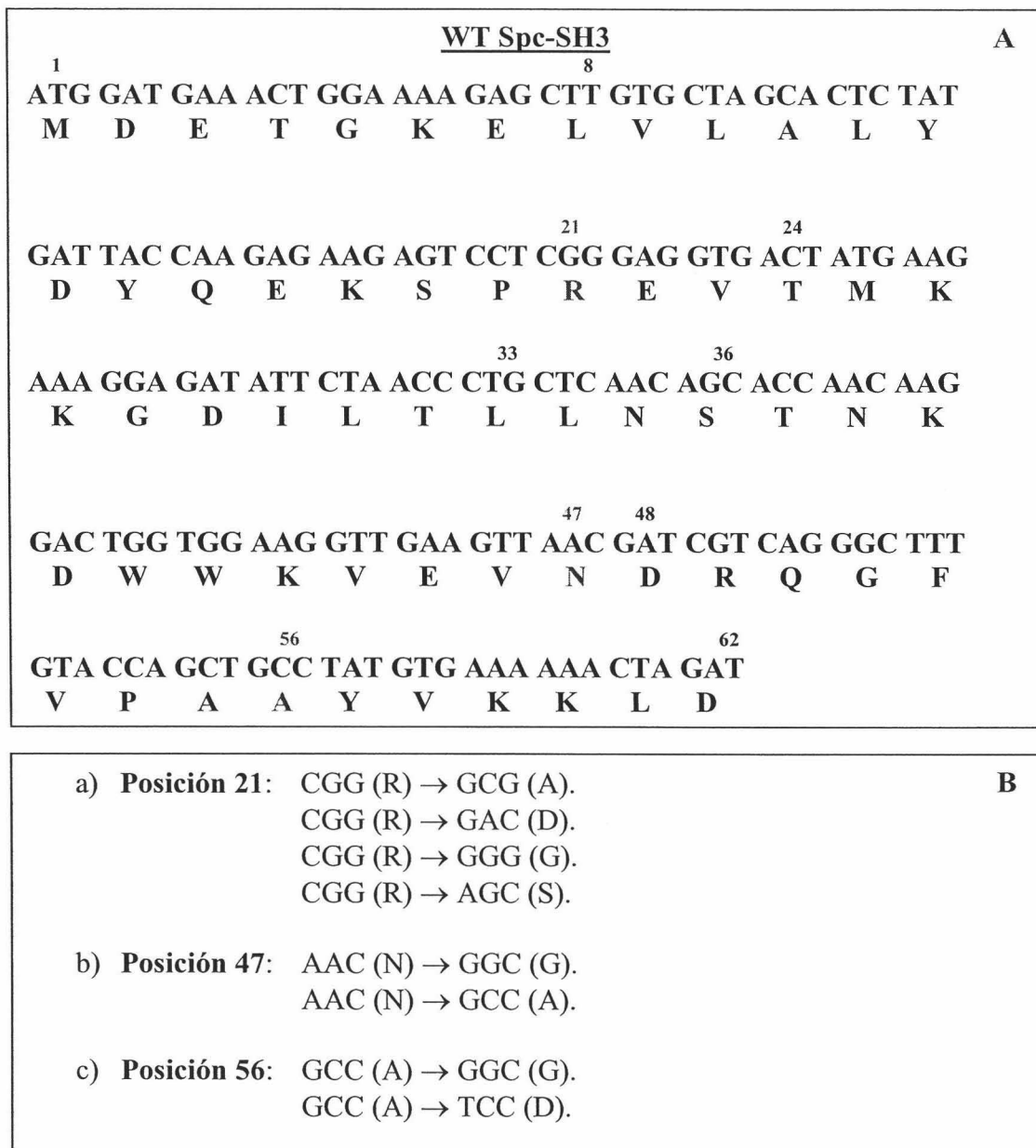


Figura 4.7.4.: Secuencia de ADN del gen que codifica a la forma natural del dominio SH3 de α -espectrina y su correspondiente traducción, según el mapa genético de E.Coli (panel superior, A). Se han resaltado en rojo las posiciones correspondientes a las mutaciones puntuales realizadas sobre él. En el panel inferior, B, se indican los codones que codifican al aminoácido presente originalmente en cada una de las posiciones así como los cambios de bases realizados en dichos codones, en cada caso (en azul); entre paréntesis se indica también la traducción de cada codón, original y mutado, en su aminoácido, según el orden de preferencia de codones para un mismo aminoácido, del organismo huésped, E.Coli.

Es preciso también estimar la temperatura de fusión, T_f , de cada oligonucleótido diseñado, que es la temperatura a la que se desnaturaliza la doble hélice mixta formada por el oligonucleótido y su hebra complementaria del ADN parental. El valor de esa T_f se determina a partir de la siguiente relación (Thein y Wallace, 1986):

$$T_f = [2 \times (n_A + n_T)] + [4 \times (n_C + n_G)] \text{ (}^\circ\text{C)} \quad (4.7.3.3.1.)$$

donde n_A , n_T , n_C y n_G representan al número de cada una de las bases correspondientes presentes en la secuencia del oligonucleótido que hibrida con el ADN molde correspondiente en la RCP. Se debe procurar que la T_f de los oligonucleótidos sea al menos, igual a la temperatura de hibridación de las cadenas, que normalmente se sitúa en torno a los 55 a 65°C.

Cada uno de los dos cebadores que se precisan para la realización de la RPC presenta una secuencia de pares de bases complementaria al extremo de una de las cadenas del ADN parental, e incluyen la secuencia de los sitios *diana* de los enzimas de restricción. Después de esta secuencia diana, debe seguir el codón (o triplete de nucleótidos) ATG, que codifica al aminoácido metionina (M) y que además es la señal de inicio de la *traducción* del ADN en cadena polipeptídica. En el caso que nos ocupa, el comienzo de la secuencia en la dirección 5'→3' se encuentra flanqueado por la secuencia diana del enzima de restricción *NcoI* (CCATGG), que emplearemos en etapas posteriores del proceso de clonación y que incluye en sí misma el codón de metionina y que es el comienzo del gen que codifica la proteína. En cuanto al segundo cebador, se construye sobre la cadena complementaria del ADN parental, y si se lee en su dirección 3'→5', se observa cómo incluye en su secuencia el codón (CTA) que codifica al aminoácido ácido aspártico, D, que es el último de la secuencia de la proteína, a continuación, se incluyen dos codones de terminación (ATCATC) para asegurarnos de que no se codifican nuevos aminoácidos añadidos a la secuencia original de la proteína. Este segundo cebador se encuentra flanqueado a su vez por la secuencias diana de otros enzimas de restricción, entre los que se encuentra *HindIII* (TTCGAA), que también emplearemos en pasos posteriores del proceso de clonación. Ambos cebadores se representan en la figura 4.7.5. El comienzo de la secuencia de cada uno de los dos cebadores, en la dirección 5'→3', son las secuencias de reconocimiento en las que el enzima ADN-polimerasa, se asienta para comenzar la replicación (GCG CGC).

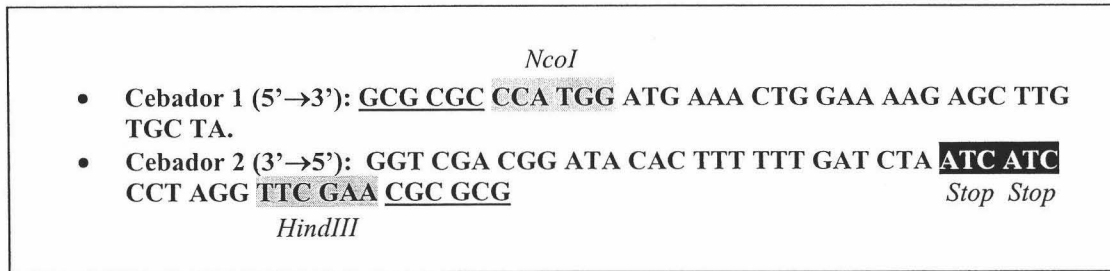


Fig. 4.7.5.: Secuencia de los dos oligonucleótidos cebadores empleados para realizar las RCPs encaminadas producir todos los mutantes estudiados en este trabajo de investigación. Se resaltan en gris, las secuencias diana correspondientes a los dos enzimas de restricción empleados (*NcoI*, CCATGG y *HindIII*, TTCGAA) para cortar específicamente el producto de amplificación y en negro se resaltan los dos codones de terminación (ATC ATC) de la traducción. Las secuencias de asentamiento de la ADN-polimerasa, GCGCGC se indican subrayadas.

Los oligonucleótidos por su parte, contienen el fragmento de secuencia del gen que presenta el fragmento de secuencia del gen (codón/-es) con la mutación/-es que se desea/-n realizar. Para diseñarlos por tanto, será preciso sustituir en la secuencia de ADN (gen) que codifica a la proteína, las bases correspondientes por otras apropiadas que codifiquen los nuevos aminoácidos en las posiciones seleccionadas. Un mismo aminoácido puede estar codificado por diferentes codones, esto es, diferentes combinaciones de tres bases nitrogenadas; esto es lo que se conoce como *degeneración del Código Genético*, pero los diferentes organismos tienen cierta “preferencia” a la hora de escoger un codón concreto para codificar un aminoácido (Ikemura, 1981b; Ikemura, 1981a; Kurland, 1987). Esto supone que, a la hora de diseñar los oligonucleótidos que precisaremos para realizar la mutación en la proteína, tendremos en cuenta cuál será el organismo huésped del material genético que se desea traducir por su secuencia de aminoácidos correspondiente y se procurará además, alterar mínimamente la secuencia original del gen de la proteína sólo cuando sea estrictamente necesario, para que el apareamiento entre las cadenas complementarias sea máximo y así optimizar la RCP.

En la figura 4.7.6. se han representado las secuencias de los oligonucleótidos diseñados para producir las mutaciones en posición 21 y 56 del dominio SH3 de α -espectrina, realizadas en este trabajo, en su dirección 5'→3'. Los clones de los mutantes en posición 47, sin embargo, no fueron diseñadas ni producidas en este trabajo, sino que fueron cedidas por el Dr. J.C. Martínez (Vega et al., 2000):

Oligonucleótidos diseñados para realizar las mutaciones sobre el Dominio SH3 de α -espectrina (5'→3').

- **Posición 21:**
 - **R21A-1:** GAG AAG AGT CCT GCG GAG GTG ACT ATG AAG.
 - **R21A-2:** CTT CAT AGT CAC CTC CGC AGG ACT CTT CTC.
 - **R21D-1:** CCA AGA GAA GAG TCC TGA CGA GGT GAC TAT GAA G.
 - **R21D-2:** CTT CAT AGT CAC CTC GTC AGG ACT CTT CTC TTG G.
 - **R21S-1:** GAG AAG AGT CCT AGC GAG GTG ACT ATG AAG.
 - **R21S-2:** CTT CAT AGT CAC CTC GTC AGG ACT CTT CTC.
 - **R21G-1:** GAG AAG AGT CCT GGG GAG GTG ACT ATG AAG.
 - **R21G-2:** CTT CAT AGT CAC CTC CCC AGG ACT CTT CTC.

- **Posición 56:**
 - **A56G:** ATC GAT AAG CTT GGA TCC CTA CTA ATC TAG TTT TTT CAC ATA GCC AGC TGG TAC AAA GCC.
 - **A56S:** ATC GAT AAG CTT GGA TCC CTA CTA ATC TAG TTT TTT CAC ATA GGA AGC TGG TAC AAA GCC.

Fig. 4.7.6.: Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para producir las mutaciones en el dominio SH3 de α -espectrina, cuyo estudio se ha realizado en este trabajo. Sólo se detallan los correspondientes a las mutaciones en posición 21 y 56 ya que los mutantes en posición 47 fueron cedidos por el Dr. J.C. Martínez (Vega et al., 2000).

El proceso de diseño de los oligonucleótidos necesarios para producir las mutaciones en la proteína se ha realizado con ayuda del software DNA Strider 1.2, que permite la modificación de las secuencias de ADN que se le introduzcan, traducirlas a secuencia de aminoácidos y seleccionar los fragmentos dentro de la misma, que servirán para el diseño de los oligonucleótidos y cebadores. Ambos tipos de fragmentos de ADN, esto es oligonucleótidos y cebadores, han sido obtenidos por síntesis química (Pharmacia).

En la figura anterior, fig. 4.7.6., se puede apreciar cómo mientras que para realizar las mutaciones en posición 21 se han diseñado dos oligonucleótidos por mutación, para el caso de las mutaciones en posición 56, tan sólo se ha diseñado uno. El motivo es simplemente la localización del aminoácido que se desea mutar, dentro de la secuencia de la proteína. De esta manera, cuando la mutación que se vaya a realizar se sitúe cerca de uno de los extremos de la secuencia, el mismo oligonucleótido diseñado para llevar a cabo la mutación, hará las veces de cebador. Por ejemplo, en el caso de los

mutantes en posición 56, el oligonucleótido diseñado, contiene la secuencia diana para el enzima de restricción *HindIII* y la secuencia modificada (codón alterado) para la mutación correspondiente y hará las veces de “cebador 2”, si bien será preciso también disponer de un “cebador1” para el otro extremo de la secuencia. En este caso, la amplificación del ADN mutado requiere de una única reacción de RCP, que será capaz de extender la cadena de un extremo a otro en un solo paso.

Por su parte, cuando la mutación que se realiza está alejada de los extremos, como es el caso del mutante en posición 21, la amplificación del ADN mutado es algo más compleja ya que requiere de tres reacciones de RCP (Ausubel, 1992). Se diseñan en este caso dos oligonucleótidos de cadenas complementarias a las del ADN parental, en ambas direcciones de la cadena ($5' \rightarrow 3'$ y $3' \rightarrow 5'$) que contienen la secuencia alterada en la posición del aminoácido que se desea mutar en la proteína, en este caso en posición 21 (ver fig. 4.7.6.). Por supuesto, serán necesarios además, los cebadores 1 y 2 diseñados y que se utilizan de forma común para la clonación de todos y cada uno de los mutantes en posición 21, que requieren de tres reacciones de RCP. Las dos primeras reacciones de RCP, que denominaremos RCP#1 y RCP#2, se realizan de forma análoga en cuanto al procedimiento aunque difieren en dos de los componentes que intervienen en la reacción, así:

- RCP#1: cebador 1 + oligonucleótido correspondiente (R21X)-2.
- RCP#2: cebador 2 + oligonucleótido correspondiente (R21X)-1.

En la RCP#1 se amplifica el fragmento de ADN comprendido entre el comienzo de la secuencia del gen hasta el límite marcado por el extremo 5' del oligonucleótido complementario (2). En la RCP#2, se amplifica el fragmento comprendido entre el final de la secuencia del gen hasta el extremo 5' del oligonucleótido complementario (1). Tras concluir ambas RCPs, se procede a comprobar que se han obtenido exclusivamente los productos deseados, mediante electroforesis en agarosa al 2 %, debiendo observarse una banda única en el gel. Posteriormente se purificarán los productos resultantes de ambas reacciones mediante el protocolo adecuado y servirán para llevar a cabo una tercera reacción de RCP, que amplificará la secuencia completa del gen de la proteína, pero ahora ya con la mutación correspondiente introducida. Si por el contrario, las reacciones RCP#1 y RCP#2 no han resultado en productos únicos, será preciso tomar

los productos deseados (en función de su peso molecular) directamente desde la banda del gel que los contenga, para preparar la RCP#3.

La reacción de RCP#3 se prepara de manera totalmente análoga a como se ha descrito en el apartado 4.7.3.2. de esta sección, con la única salvedad de que no se adiciona ADN molde, sino que en este caso, el ADN molde está constituido por los productos purificados de las reacciones RCP#1 y RCP#2, si es que dan como resultado productos únicos, aproximadamente entre 0.1 y 0.2 μL de cada una, o bien tomando aproximadamente entre 0.4 y 0.5 μL directamente de la banda correspondiente al producto deseado, del gel de agarosa en el que se han comprobado las reacciones RCP#1 y RCP#2. La reacción RCP#3 se inicia de la forma descrita en dicho apartado y unos 3 ó 4 ciclos después se añaden 5 μL de disolución 10 μM de cada uno de los dos cebadores correspondientes 1 y 2. Durante los primeros 5 ciclos se generan copias del gen mutado que se amplificarán posteriormente tras la adición de los cebadores.

El resto del proceso de clonación es común tanto para los mutantes producidos en tres RCPs como para los que se generan en una única RCP. Finalmente, el producto final de esta reacción enzimática, esto es, el fragmento de ADN amplificado que contiene el gen que codifica a la proteína, debe purificarse del resto de los demás componentes de la reacción y para ello se emplea un protocolo comercial de purificación, que en nuestro caso fue de la casa comercial Roche Biochemicals o Quiagen.

4.7.5. Restricción de los productos de la RCP.

Una vez concluido el proceso de mutagénesis y obtenido el material genético necesario para poder llevar a cabo la obtención de las variantes mutantes de la proteína, el proceso de clonación continúa con la preparación de dicho material para hacerlo viable para el organismo huésped de cuya maquinaria de síntesis nos vamos a servir para obtener la proteína mutada, en nuestro caso *E. Coli*, es decir, hemos de seguir el proceso de clonación.

Para poder introducir este material genético en un vector (plásmido) que las células huésped puedan usar para sintetizar la proteína, es preciso hacer que los extremos de la doble cadena de ADN obtenida sean diferentes el uno del otro y compatibles, dos a dos, con los extremos de la cadena del vector elegido. Para ello, debemos cortar los extremos de la doble cadena de ADN generada en la RPC, haciendo uso de dos enzimas (endonucleasas) de restricción diferentes, que actúan sobre dianas distintas. La elección de las endonucleasas se hace siguiendo diversos criterios, pero el más útil es el de considerar que el material genético de que disponemos, ya sea el producto de la RCP (inserto) como el vector, tengan sitios diana únicos en su secuencia para cada una de ellas. Con ello aseguramos por un lado que no se obtendrán subproductos y por otro, que vector e inserto, tendrán extremos compatibles. En nuestro caso los dos enzimas elegidos son *NcoI* y *HindIII*. Esta familia de enzimas es capaz de seccionar la doble cadena de ADN en un punto específico, su secuencia diana, que es un *palindromo*, caracterizado por presentar una secuencia concreta de bases, cuya cadena complementaria opuesta es idéntica. Así se puede apreciar en la figura 4.7.7. se representan las secuencias diana de los dos enzimas de restricción empleados en la clonación de los mutantes del dominio SH3-Spc producidos en este trabajo:

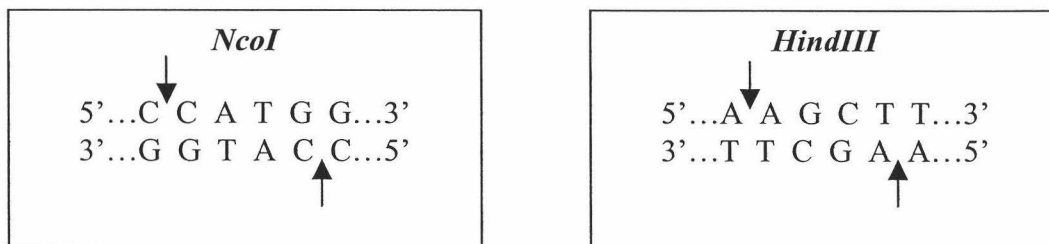


Fig. 4.7.7.: Secuencias diana de las dos endonucleasas de restricción, *NcoI* y *HindIII*, empleadas en el proceso de clonación de los diferentes mutantes del dominio SH3 de α -espectrina producidos en este trabajo. Las flechas indican el punto exacto de cada una de las dos cadenas complementarias en donde se produce la escisión.

Dado que se han utilizado únicamente estas dos endonucleasas en el proceso de clonación de todos los mutantes del dominio SH3-Spc descritos en esta Memoria, el protocolo de digestión con dichas enzimas es común a todos ellos y consiste en preparar una mezcla de reacción con un volumen total de 25 μ L, que contiene, en cada caso:

- 2.5 μ L de disolución tampón de las endonucleasas, que es común a las dos.

- 1 μL de disolución del enzima *NcoI*, de 10 U/ μL .
- 1 μL de disolución del enzima *HindIII*, de 15 U/ μL .
- 20.5 μL del producto purificado de RPC.

El protocolo supone incubar la disolución constituida de esta manera, a 37°C durante una hora y media. Es importante tener en cuenta que esa temperatura de incubación es la temperatura óptima para que la actividad del enzima sea máxima y el rendimiento de la reacción de restricción sea pues mayor. La cantidad añadida de enzimas está determinada por su actividad respectiva, representada en unidades (U) por μL , donde 1U representa la cantidad de enzima necesaria para digerir completamente 1 μg de ADN en 60 minutos, siempre que las condiciones de reacción sean las óptimas. El tampón que se añade, se encarga de mantener el pH y la concentración salina en las condiciones óptimas para que la actividad de los enzimas sea la mejor posible. Este tampón es una disolución Tris-HCl 10 mM, MgCl_2 5 mM, NaCl 10 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, pH 8.0, a 37°C.

De forma similar a lo que ocurría con la ADN-polimerasa, los enzimas de restricción son suministrados por la casa comercial suspendidos en glicerol y no es preciso descongelarlos previamente antes de añadirlos a la mezcla de reacción.

Es importante tener en cuenta que no respetar las cantidades máximas de enzimas añadidos, condiciones inapropiadas de pH, variables como la concentración salina en la mezcla de reacción, la presencia en la misma de restos de disolventes orgánicos de la purificación del producto de PCR, una temperatura superior a 37°C durante la reacción, o un tiempo de incubación demasiado largo, pueden propiciar la aparición de actividad inespecífica en las endonucleasas que puede originar cortes inespecíficos del fragmento de ADN que se desea digerir.

Acabada la reacción, se deben inactivar los enzimas para que la actividad residual que les pueda quedar no pueda dar lugar a productos no deseados y, para ello, se incuba la mezcla de reacción a 65°C durante 15 minutos. Posteriormente es preciso volver a purificar los productos, de forma análoga a como se hizo con los resultantes de la RPC, para eliminar ahora los fragmentos menores resultantes del corte, los enzimas

de restricción inactivados y los demás reactivos empleados. Tras purificar el producto, denominado *inserto*, se puede proseguir con el proceso de clonación.

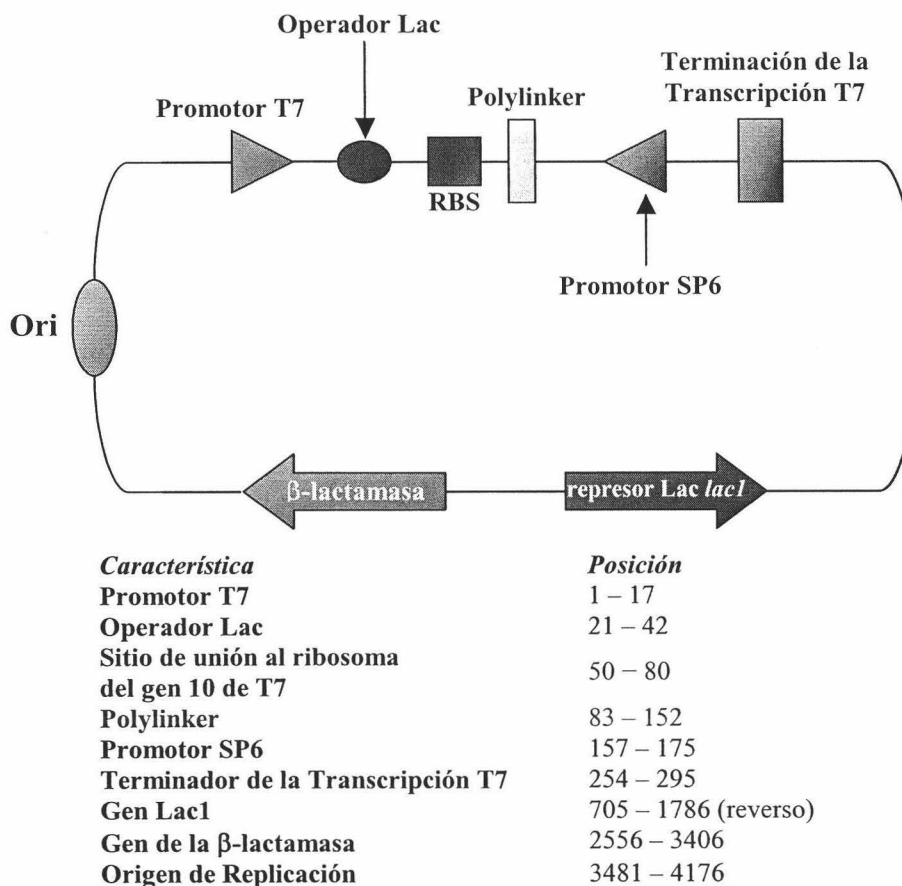
4.7.6. Ligación del inserto al vector de expresión.

El proceso de *ligación* permite unir el fragmento de ADN digerido que tiene el gen de la proteína modificada a un vector de expresión, lógicamente de extremos compatibles, esto es digerido con los mismos enzimas de restricción con los que se ha cortado el inserto (ver apartado anterior, aptdo. 4.7.5.), para formar un plásmido mutante que la célula huésped será capaz de emplear para producir la proteína. Ahora bien, el proceso no es tan trivial, ya que pueden tener lugar procesos colaterales al principal que supongan la aparición de subproductos no deseados constituidos por asociaciones inserto-inserto o vector-vector, que representarían una reducción de la eficiencia del proceso de clonación.

Para evitar este problema, antes de llevar a cabo el proceso de ligación del inserto y el vector se procede a preparar al vector que se va a usar, y que en nuestro caso es el pBAT4 (Peranen et al., 1996). De esta manera, el vector se digiere primero con las mismas endonucleasas con las que se ha obtenido el inserto, para que ambos tengan extremos compatibles y, posteriormente se lleva a cabo una desforforilación de los extremos cortados del vector, mediante una incubación de una hora aproximadamente del vector cortado con fosfatasa alcalina, a 37°C, para evitar que se recircularice en presencia de la ligasa.

Los vectores de expresión son moléculas de ADN bicatenario circular que presentan en su secuencia genética dianas específicas para ciertas endonucleasas de restricción, secuencias concretas que les permiten replicarse en el interior de la célula huésped cuando ésta es transformada (ver aptdo. 4.7.7.) con él, una secuencia específica denominada *promotor* que es el punto de reconocimiento de la ARN-polimerasa, a partir del cual se inicia la *transcripción* y finalmente algún gen que confiere a la célula huésped transformada con él, resistencia a algún antibiótico. En la figura siguiente, fig. 4.7.8., se muestra un mapa genético del vector pBAT4 empleado para realizar la

clonación de las diferentes variantes del dominio SH3-Spc que se estudian en este trabajo:



- Sitio de corte *NcoI*: situado en posición 84.
- Sitio de corte *HindIII*: situado en posición 146.

Fig. 4.7.8.: Representación esquemática del vector de expresión pBAT4 (Peranen et al., 1996) empleado para la obtención de las diferentes variantes del dominio SH3 de α-espectrina que se han estudiado en este trabajo.

El proceso de ligación que tiene lugar entre el vector así preparado y el inserto purificado está catalizado por el enzima ADN-ligasa de T4, que es ATP dependiente, por lo que requiere de este mononucleótido trifosfato para poder actuar. Este enzima cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los dos extremos adyacentes 3'-OH y 5'-OH de la doble cadena de ADN del vector de extremos desfosforilados con los extremos 5'-O-P_i y 3'-O-P_i, del inserto al que se pretende unir. Lógicamente, además del vector cortado y desfosforilado, el inserto y el ATP, para que la reacción de ligación tenga lugar es preciso un medio tamponado (tampón de ligación) de una concentración salina apropiada para que el enzima actúe correctamente. El enzima ADN-ligasa de T4

también se inactiva con cierta facilidad, por lo que también se suministra suspendido en glicerol y se debe mantener el menor tiempo posible a temperaturas superiores a -20°C .

Las ligaciones realizadas durante la clonación de las diferentes variantes del dominio SH3-Spc presentadas en esta Memoria, se pueden realizar siguiendo el siguiente protocolo:

- 1 μL de disolución de vector pBAT4 puro, preparado como se ha indicado anteriormente.
- 5 μL de disolución del inserto, ya digerido con las endonucleasas, y purificado.
- 2 μL de disolución tampón de ligación, 10 \times concentrada.
- 9 μL de agua destilada estéril.
- 1 μL de suspensión de enzima ADN-ligasa de T4 (de 5U/ μL de actividad).
- 1 μL de disolución de ATP de concentración 10 μM .

El tiempo necesario para que la reacción se complete es de unas 12 horas aproximadamente y la temperatura óptima de actuación de este enzima son 16°C . No obstante, actualmente se han desarrollado protocolos modificados y enzimas ligasa alteradas que hacen posible completar la reacción en tiempos mucho menores, incluso del orden de unos pocos minutos y además a temperatura ambiente. Tal es el caso del protocolo comercial de ligación “Rapid Ligation Kit” de Roche Biochemicals empleado en los procesos de clonación realizados en este trabajo, y que tiene un rendimiento similar al del protocolo clásico antes descrito.

En cualquiera de los dos casos las proporciones de reactivos empleados constituyen un factor importante a tener en cuenta a la hora de planificar el procedimiento que se ha de realizar ya que de ellas depende en buena medida el rendimiento de la reacción de ligación. Así por ejemplo, cuando la longitud del inserto sea menor que la del vector de expresión, como es nuestro caso, es conveniente guardar una relación 1:2 de vector frente al inserto en la mezcla de reacción. La concentración total del ADN que se añade a la reacción de ligación así como la cantidad de ligasa que se adiciona también son factores importantes a tener en cuenta y, por supuesto, el medio

de reacción, tamponado y con una composición concreta: Tris-HCl 660 mM, MgCl₂ 50 mM, DTT 50 mM, ATP 10 mM y pH 7.5 a 20°C.

Acabada la reacción de ligación, se puede guardar a -20°C para conservarla.

4.7.7. Transformación de la célula huésped: introducción del plásmido en el organismo de expresión.

Todo el proceso que se ha explicado hasta el momento iba encaminado a la producción de un *plásmido mutante* que nos sirviera de vehículo para introducir y expresar el gen recombinante que codifica a la proteína modificada, en el organismo huésped. Los plásmidos son, como ya hemos establecido, fragmentos de ADN bicatenario y circular presentes en bacterias, que tienen la capacidad para replicarse por si mismos, independientemente del resto del genoma bacteriano. Estos fragmentos de ADN codifican, de forma natural, algunas proteínas que confieren a las cepas que los poseen, ciertas características que les otorgan alguna ventaja para su supervivencia. Además, estos plásmidos pueden intercambiarse entre unas cepas y otras, a través de un proceso denominado *conjugación bacteriana*. Pues bien, se aprovechan ambas características para convertir a la bacteria en una “factoría” de producción de proteína recombinante.

El plásmido que se introduce en la bacteria, mediante el procedimiento que se explica a continuación, contiene algún gen que confiere a la bacteria que lo posee resistencia frente a un antibiótico, de tal manera que aquéllas cepas bacterianas que incorporen a su “contenido genético” dicho plásmido podrán ser seleccionadas del resto que no lo poseen, porque serán capaces de proliferar en presencia de dicho antibiótico.

La bacteria *E.Coli* es el organismo más ampliamente utilizado como huésped, dada la simplicidad de los protocolos y metodología requeridos para su manejo, su alta y rápida proliferación (el tiempo de división promedio se sitúa entre 20 minutos y 1 hora) y la capacidad que presentan algunas de sus cepas para producir proteínas recombinantes en grandes cantidades. Para poder introducir el plásmido en el interior de

las células, es preciso que éstas sean *competentes*, es decir, que sean capaces de asimilar el plásmido e incorporarlo a su interior cuando éste se le añada a una suspensión de células de este tipo. Para conseguir la *competencia* celular, se puede optar por diversos métodos: así, los hay de tipo físico, como la *electroporación* (Potter, 1988) (Zimmerman y Vienken, 1983), por la que las células, suspendidas en un medio hipotónico, se someten a un “shock eléctrico” (que normalmente consiste en una exposición breve a un gradiente de voltaje que oscila entre 4000 y 8000V/cm) y así se hacen susceptibles de incorporar ADN exógeno a su interior, desde la disolución en la que están suspendidas, aparentemente a través de los agujeros o poros momentáneos que se forman en su membrana. También existen métodos químicos, como el que se ha empleado en este trabajo, así por ejemplo, se ha podido comprobar como, las células de *E. Coli* y el ADN plasmídico interactúan de forma productiva en un medio rico en iones Ca^{2+} y bajas temperaturas (0 a 5°C) y que un “choque” térmico posterior (37 a 45°C) es importante aunque no imprescindible. Así, un procedimiento común para transformar células de *E. Coli*, haciéndolas competentes para ello por un método químico, consiste básicamente en suspender las células en una disolución de iones Ca^{2+} 50 mM fría (0 a 5°C). Posteriormente se añade el ADN plasmídico a la suspensión de células y se incuban en baño de hielo durante unos 30 minutos. Posteriormente se les da un “choque” térmico que estimula la captación del ADN por parte de la célula. No se sabe aún con certeza por qué es efectivo este mecanismo de transformación pero, parece que el cloruro cálcico afecta a la pared celular y puede ser también responsable de la interacción entre el ADN y la superficie de la célula, ahora bien, parece ser el breve “choque” térmico el que estimula la captación del ADN por parte de la misma (Hanahan, 1983), (Liu y Rashidbaigi, 1990).

En el interior de la célula bacteriana, el plásmido se replica generando múltiples copias de sí mismo, que se pasan a la progenie durante la división celular. De esta forma que las colonias generadas a partir de una célula que haya sido capaz de captar e incorporar el plásmido, dispondrán de características que permitan discriminarlas de aquéllas que no lo hayan hecho, como puede ser la resistencia a un antibiótico. Así por ejemplo, el vector pBAT4 dispone de un gen que confiere resistencia a la ampicilina dado que codifica al enzima β -lactamasa, que degrada a la ampicilina.

El protocolo de *transformación* que se ha seguido en este trabajo se describe a continuación:

- Se descongela una alícuota de unos 5 μL de suspensión de células competentes y se dejan en hielo durante 10 minutos aproximadamente.
- Se añade a la suspensión 1 μL del producto de la reacción de ligación y se mantiene todo en hielo durante 20 ó 30 minutos más.
- Choque térmico a 42°C de 45 segundos exactos de duración.
- Incubación en hielo durante 5 minutos más.
- Adición a las células transformadas de 700 μL aproximadamente de un medio de cultivo rico como el SOC, aunque el LB puede servir también, sin antibiótico.
- Incubación a 37°C durante unos 45 minutos, sin agitación.
- Sembrar 200 μL de la suspensión celular en una placa de Petri con medio LB-agar, que contenga la cantidad adecuada del antibiótico (en nuestro caso ampicilina). El resto del volumen se centrifuga a máxima velocidad durante 10 minutos en una centrífuga de mesa y el precipitado celular se resuspende en otros 200 μL de medio SOC o LB y se siembran en otra placa de Petri con LB-agar, que también contenga antibiótico en la cantidad adecuada.
- Las placas así sembradas se incuban durante unas 10 – 12 horas a 37°C para que crezcan las colonias de células transformadas.

Por supuesto, es absolutamente imprescindible mantener condiciones de esterilidad en todo momento, no sólo en el ambiente de trabajo sino en lo que al material se refiere.

En este trabajo se han empleado dos cepas de bacterias *E.Coli*, por un lado las XL10-Gold®, que son una modificación comercial, de mayor eficiencia en la transformación de otra cepa, la XL1-Blue y, por otro lado, se ha empleado también la cepa BL21(DE3). Ambas cepas fueron adquiridas a la casa comercial Novagen.

La cepa XL10-Gold® requiere de cantidades mínimas de ADN plasmídico para transformarse, de manera que su *eficiencia de transformación* ronda las 10^8 células transformadas por cada μg de plásmido añadido a las mismas. Además, son capaces de generar un elevado número de copias del plásmido con el que son transformadas. Por esta razón, esta cepa celular se emplea para obtener múltiples copias (amplificar) el plásmido mutante obtenido de la reacción de ligación, explicada en el apartado anterior de esta sección, cuyo rendimiento no es demasiado elevado. Posteriormente se extrae el plásmido mutante amplificado de estas células por el procedimiento que se explica más adelante (aptdo. 4.7.3.8 de esta sección) y se emplea para transformar la otra cepa celular, BL21(DE3), que presentan una elevada capacidad de expresión de proteínas. El empleo de estas dos cepas celulares de forma consecutiva se debe a que la cepa BL21(DE3) carece de la capacidad transformante suficiente como para captar el escaso plásmido mutante procedente de una reacción de ligación.

Dado que puede ocurrir que las células XL10-Gold® transformadas con el producto de ligación tengan o no el plásmido mutante con el inserto del gen de la proteína, es conveniente hacer algunas comprobaciones. La más inmediata es sembrar las células transformadas en placas de LB-agar que contienen, además del antibiótico (frente al que serían resistentes aquellas células transformadas con plásmido mutante con inserto y aquellas transformadas sólo con vector recircularizado), un agente selectivo conocido como X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) o algún análogo. Se trata de un compuesto orgánico análogo a la β -D-galactosa y que, en presencia de β -galactosidasa, se vuelve de color azul. En este tipo de vectores, la β -galactosidasa se encuentra codificada en el gen LacZ. Pues bien, cuando se inserta el fragmento de ADN que codifica la proteína recombinante en su sitio correcto del vector, se interrumpe el gen LacZ, con lo que las células transformadas con el vector con el inserto, no puede sintetizar β -galactosidasa y no dan color azul, sino que permanecen con su color blanquecino original.

Otra prueba que se suele hacer para comprobar que las células XL10-Gold® se han transformado con el plásmido mutante completo (vector + inserto) es hacer una RCP de prueba, lo que se conoce como *RCP de chequeo*, siguiendo la metodología usual, detallada ya en el aptdo. 4.7.3.2. de esta sección, empleando los cebadores 1 y 2

diseñados según se explica en el aptdo. 4.7.3. de esta sección y empleando como molde la colonia que se desea comprobar. Sólo será necesario posteriormente comprobar por electroforesis en gel de agarosa al 2%, que la RPC control da como resultado un producto cuya banda tiene una posición en el gel que se corresponde con la del inserto completo.

En la figura 4.7.9., se representa un gel de agarosa de este tipo en el que junto con las bandas correspondientes a los productos de las RCPs de control de colonias XL10-Gold® transformantes (colonias transformadas) con plásmidos mutantes de algunas variantes del dominio SH3-Spc, aparece la banda correspondiente a un patrón de pesos moleculares:

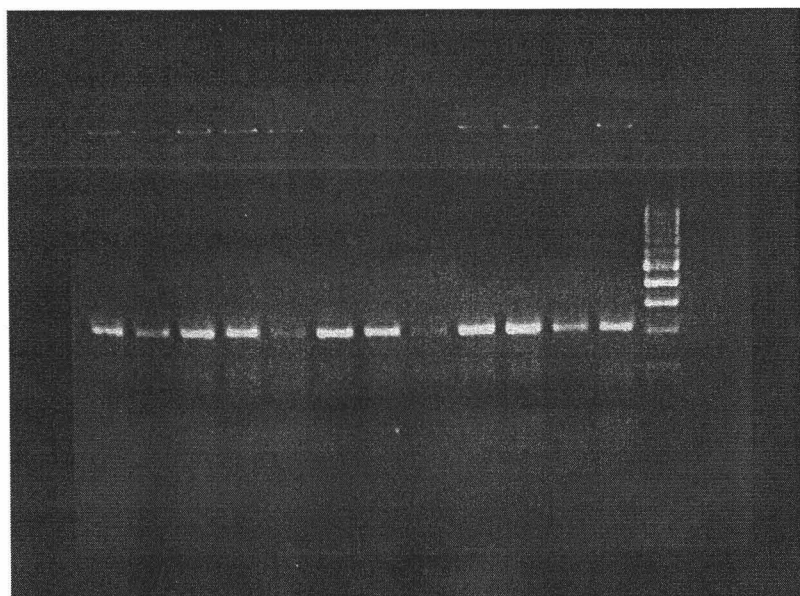


Fig. 4.7.9.: Gel de agarosa al 2% de los productos de las RPC control de los transformantes XL10-Gold® con plásmidos mutantes de algunas de las variantes del dominio SH3-Spc, concretamente los de los mutantes en posición 21. Se aprecia como las bandas correspondientes a los insertos de SH3 tienen aproximadamente 210pb, lo que se puede deducir de la comparación con las bandas del patrón de peso molecular (última calle), que tiene fragmentos de tamaño (de menor a mayor peso molecular): 80, 100, 200 (banda más próxima a las de los insertos de SH3), 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000pb, si bien estas cinco últimas no se distinguen con claridad.

De aquéllas colonias cuya comprobación sea positiva se extraerá el plásmido mutante por el procedimiento que se describirá más adelante (aptdo. 4.7.9.). El plásmido purificado de estas células XL10-Gold®, mucho más concentrado que el obtenido de la reacción de ligación, se empleará para transformar la cepa BL21(DE3), que presenta una capacidad muy elevada de expresión de proteína recombinante. El procedimiento de

transformación de estas últimas células es análogo al seguido para transformar las anteriores.

4.7.8. Controles de la capacidad de expresión.

Una vez concluida la transformación de las células BL21(DE3) que serán las encargadas de sobre-expresar la proteína recombinante, es preciso comprobar que los transformantes son capaces de producir proteína ya que puede ocurrir que, durante el proceso de clonación seguido hasta este momento, se hayan producido alteraciones en la célula o bien mutaciones en el vector, fuera del gen que codifica la proteína recombinante, que mermen la capacidad de expresión de la misma por parte de la célula. Para realizar esta comprobación se llevan a cabo *ensayos de expresión*.

La estrategia es sencilla, simplemente se escogen colonias de BL21(DE3) transformantes que hayan sido capaces de crecer en una placa de Petri con medio LB-agar al que se le ha añadido antibiótico, que en nuestro caso es la ampicilina, con lo que nos aseguramos de que poseen el plásmido mutante. Es importante escoger colonias de placas frescas, esto es, que hayan crecido en la noche anterior, ya que puede ocurrir que las células pierdan el plásmido o pierdan eficiencia en su capacidad de expresión con el paso del tiempo. Se preparan minicultivos de unos 3 mL de medio LB con antibiótico, normalmente se añaden 3 μL de una disolución de ampicilina de $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (para garantizar que las únicas células que crezcan sean las que presentan resistencia al antibiótico, o sea las transformadas), para cada una de las colonias elegidas.

Se inocula una sola colonia por minicultivo y se incuban los mismos a 37°C durante un cierto tiempo, que oscila entre 10 y 12 horas. Los cultivos se han de inducir para que expresen proteína añadiendo al mismo una cierta cantidad de un agente inductor como puede ser el IPTG (ver aptdo. 4.8.1 de esta sección), a diferentes tiempos, de manera que se puede así establecer también, que grado de crecimiento del cultivo es el óptimo para inducir la sobre-expresión, si bien lo más usual es inducirlo cuando se encuentra en fase exponencial de crecimiento, lo que se puede comprobar midiendo su absorbancia a 600 nm y comprobando que ésta tiene un valor situado entre

0.6 y 0.9 aproximadamente, a pesar de que en el caso de los mutantes del dominio SH3-Spc estudiados en este trabajo, se ha comprobado que el rendimiento de expresión es mucho mayor si la inducción de la expresión se hace al comienzo, no así en el caso de la forma natural, WT, en la que si se hace de este modo, la expresión es casi nula.

Tras acabar el tiempo de incubación, se toman muestras de 200 μ L de cada cultivo, se centrifugan 1 minuto en una centrífuga de mesa y el precipitado celular se resuspende en tampón de carga de electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 15% y se comprueba mediante esta técnica si la expresión ha sido positiva y, por supuesto, elevada. En la figura siguiente, fig. 4.7.10., se representa un gel de electroforesis en SDS-poliacrilamida al 15% correspondiente a los ensayos de expresión del mutante R21S del dominio.

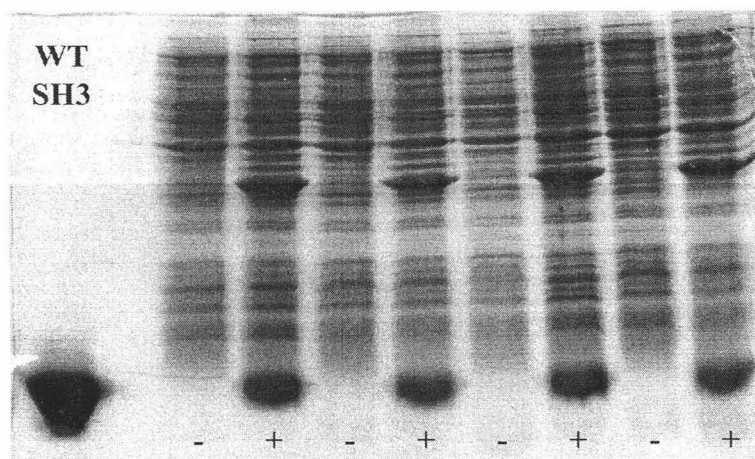


Fig. 4.7.10.: Fragmento del gel de poliacrilamida al 15% en presencia de SDS correspondiente a los ensayos de expresión del mutante R21S del dominio SH3-Spc. La banda correspondiente a la primera calle se corresponde con una muestra de la forma natural, WT, del citado dominio. El resto de las calles se corresponden con distintas colonias, inducidas (+) y no inducidas (-) durante los ensayos de expresión, desde el comienzo de los mismos (ver texto). Se aprecia claramente la sobreexpresión de una proteína de peso molecular muy similar al del WT SH3-Spc en las colonias inducidas con IPTG. Todas las colonias elegidas expresan la proteína de forma similar.

De todas las colonias elegidas para hacer los ensayos de expresión se escogen únicamente las que expresan en mayor grado y de ellas se extraerá el plásmido mutante para mandarlo a secuenciar, siguiendo el procedimiento que describiremos posteriormente (aptdos. 4.7.9. y 4.7.10.).

4.7.9. Obtención del plásmido mutante puro.

Una vez que se han identificado qué colonias de transformantes expresan correctamente proteína, es preciso obtener el plásmido puro a partir de ellas. Para ello se seleccionan las colonias correspondientes que expresan y, según el protocolo que se ha explicado en el apartado anterior, aptdo. 4.7.8., se inocula una de estas colonias en un tubo estéril de 50mL de capacidad, con 10mL de medio LB y el antibiótico (ampicilina). Estos minicultivos se dejan incubar a 37°C con agitación, durante unas 8 a 10 horas aproximadamente, o hasta que enturbien suficientemente. Posteriormente se centrifugan a velocidad máxima, en una microfuga, durante unos 15 minutos aproximadamente, se desecha el sobrenadante, que será medio de cultivo y se recoge el precipitado que contendrá las células.

La obtención del plásmido a partir de este precipitado de células transformadas, supone el empleo de un protocolo comercial, que en nuestro caso es el “High pure plasmid isolation kit”, de Roche Biochemicals. Este protocolo comercial supone la resuspensión del precipitado de células en una disolución tamponada para posteriormente romperlas en un medio alcalino, para liberar el ADN plasmídico y dejarlo en disolución, separado del resto del genoma bacteriano que, dado su mayor tamaño, queda atrapado junto a los restos de material celular (fundamentalmente la pared celular, membranas, etc.). Posteriormente la disolución que contiene todas estas fracciones celulares se clarifica por centrifugación y el ADN plasmídico se obtiene haciendo pasar el sobrenadante de la disolución anterior a través de un filtro de vidrio poroso, a la que se une el ácido nucleico de forma específica en presencia de una alta concentración salina (agente caotrópico) (Birboim y Doly, 1979), (Vogelstein y Gillespie, 1979), (Chen y Thomas, 1980), seguido de una elución del filtro con una disolución tamponada de baja fuerza iónica, o agua estéril. En nuestro caso, esta elución final se hace con 50 μ L de agua estéril, con lo que la disolución de ADN plasmídico obtenida, está suficientemente concentrada como para poder transformar adecuadamente cepas celulares del tipo BL21(DE3) o para secuenciar (ver aptdo. 4.7.10.). La disolución de plásmido que contiene el gen que codifica a la proteína, que hemos obtenido después de todo este proceso de clonación, se puede almacenar sin problema congelada a -20°C.

Aún existe otra forma de mantener el plásmido guardado, y es en el interior de las células que lo contienen. Así, se hacen crecer los transformantes en medio LB con antibiótico, procediendo como se ha descrito anteriormente. Una vez el cultivo esté crecido, se hacen alícuotas del mismo de unos 200 ó 300 μL a los que se le añade glicerol estéril al 75 % (preparado en agua desionizada), en un volumen equivalente y se congelan en N_2 líquido. Se pueden mantener meses congeladas a -80°C sin que se vean alteradas.

4.7.10. Secuenciación del plásmido.

Los plásmidos obtenidos tras todo este proceso de clonación han de secuenciarse para comprobar que la secuencia de bases del inserto, que contiene el gen que codifica nuestra proteína, es la correcta. En nuestro caso se ha hecho uso del Servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López Neyra” del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, en Granada.



4.8. Expresión y Purificación de las diferentes variantes del dominio SH3 de α -espectrina.

4.8.1. Expresión del dominio SH3-Spc.

El vector o plásmido ya secuenciado y purificado que codifica a cada variante del dominio SH3 en estudio, se introdujo en células competentes del tipo anteriormente mencionado, mediante un procedimiento de *transformación* tal y como se explica detalladamente en el apartado 4.7.7. de esta sección de Materiales y Métodos. Estas células transformadas se hacen crecer en una placa de Petri, con medio LB-agar, en presencia de un antibiótico (ampicilina) selectivo. Cada purificación de proteína se llevó a cabo a partir de 4.5 L de medio LB, distribuidos en 6 matraces Erlenmeyer de 2L de capacidad, esto es, cada matraz contenía 750 mL de medio de cultivo LB. A dichos matraces se les adicionan 750 μL de una disolución stock de ampicilina a una concentración de $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, esto es, 1 μL por cada mL de medio de cultivo. Se añaden también una o dos colonias de células transformadas procedentes de la placa a cada matraz y finalmente se tapan con un tapón de algodón graso. Lógicamente todo este proceso se debe realizar en condiciones de esterilidad.

Los matraces así preparados se incuban a 37°C en un baño de agua orbital, con agitación moderada, durante un periodo de tiempo que oscila entre las 8 y las 10 horas, que es el tiempo necesario para que los cultivos se encuentren dentro de la fase exponencial de crecimiento, de manera que se controla la absorbancia de los mismos a 600nm hasta que ésta alcance un valor de entre 0.8 y 0.9 aproximadamente. En ese momento se induce la sobreexpresión de proteína añadiendo, de nuevo en condiciones de estériles, 750 μL de una disolución de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) de una concentración de $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, que actúa como agente inductor. A partir de ese momento, se dejan los matraces incubando a 37°C en el baño, con agitación moderada, un mínimo de 10 a 12 horas, o toda la noche.

4.8.2. Extracción del crudo de proteínas.

Tras finalizar el tiempo de cultivo, normalmente a la mañana siguiente se recogen las células cultivadas, por centrifugación a unos 2200 g durante 25 minutos, a 4°C. El sobrenadante resultante se desecha. El precipitado celular se resuspende en un baño de hielo, en tampón citrato sódico 5 mM, a pH 3.0, hasta un volumen máximo de 40 mL aproximadamente. Este resuspendido celular puede congelarse en N₂ líquido y conservarse así congelado a -80°C si se desea interrumpir la purificación de proteína en este punto.

Las células resuspendidas se lisan en una prensa “French” a una presión de 1200 psi, en dos pasadas sucesivas para conseguir una eficiencia máxima en el lisado. Una vez hecho esto, se comprueba el pH del lisado y se acidifica con HCl diluido hasta conseguir un pH en torno a 3.0, ya que el dominio SH3-Spc tiene una solubilidad máxima a pH ácido, en torno a 3, cosa que no ocurre con el resto de las proteínas celulares. Posteriormente se centrifuga este lisado acidificado a 4°C en una ultracentrífuga Beckman L5-40 a unos 12000 g durante 30 minutos, en un rotor R35. Una vez centrifugado, se toman muestras para electroforesis, tanto del sobrenadante como del precipitado, aunque lógicamente, dada la elevada solubilidad del dominio SH3-Spc a ese pH, la mayor parte del dominio SH3 sobre-expresado debe encontrarse en ese sobrenadante, mientras que el resto de las proteínas y desechos celulares se encontraran en el precipitado. Por lo tanto, dicho precipitado se desecha y se procede ahora a precipitar el dominio SH3, para lo cual se emplea sulfato amónico sólido, finamente triturado en un mortero, que se va añadiendo paulatinamente sobre el sobrenadante, en baño de hielo y con agitación continua, hasta alcanzar una concentración salina en torno al 7.5%, lo que supone añadir unos 516 g de sulfato por litro de disolución. A medida que se va añadiendo el sulfato, el sobrenadante va tomando un aspecto lechoso como consecuencia de la precipitación de la proteína. Tras añadir todo el sulfato necesario, se mantiene aproximadamente durante aproximadamente una hora con agitación, en hielo y posteriormente se deja en reposo, precipitando, a 4°C, durante toda la noche.

Este precipitado de sulfato amónico, se centrifuga a la mañana siguiente en la ultracentrífuga Beckman a unos 12000 g y 4°C, durante unos 25 minutos. Este sobrenadante, de color blanquecino y compacto, contiene la mayor parte del dominio SH3 expresado. Se resuspende con cuidado, con la ayuda de una varilla de vidrio en el mínimo volumen posible de un tampón que contiene 7M Urea, 100 mM cloruro sódico y 50 mM fosfato sódico, y con un pH de 7.0, hasta alcanzar un volumen total máximo no superior a los 10 mL. Esta disolución constituirá el crudo de proteína, que purificaremos por cromatografía de exclusión molecular posteriormente. De este crudo también se toma una muestra para electroforesis.

En cada etapa de fraccionamiento, se recogen muestras para poder realizar posteriormente un seguimiento del proceso de purificación. Con todas las muestras recogidas, se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida, en presencia de SDS, al 15% de acrilamida-bisacrilamida, que nos permitirá visualizar tanto el grado de expresión del dominio por las células como la pureza del dominio en las diferentes fracciones de purificación generadas.

En la figura 4.8.1. se recoge un breve esquema de los diferentes pasos descritos en este apartado para la purificación de las diferentes variantes del dominio SH3 de α -espectrina.

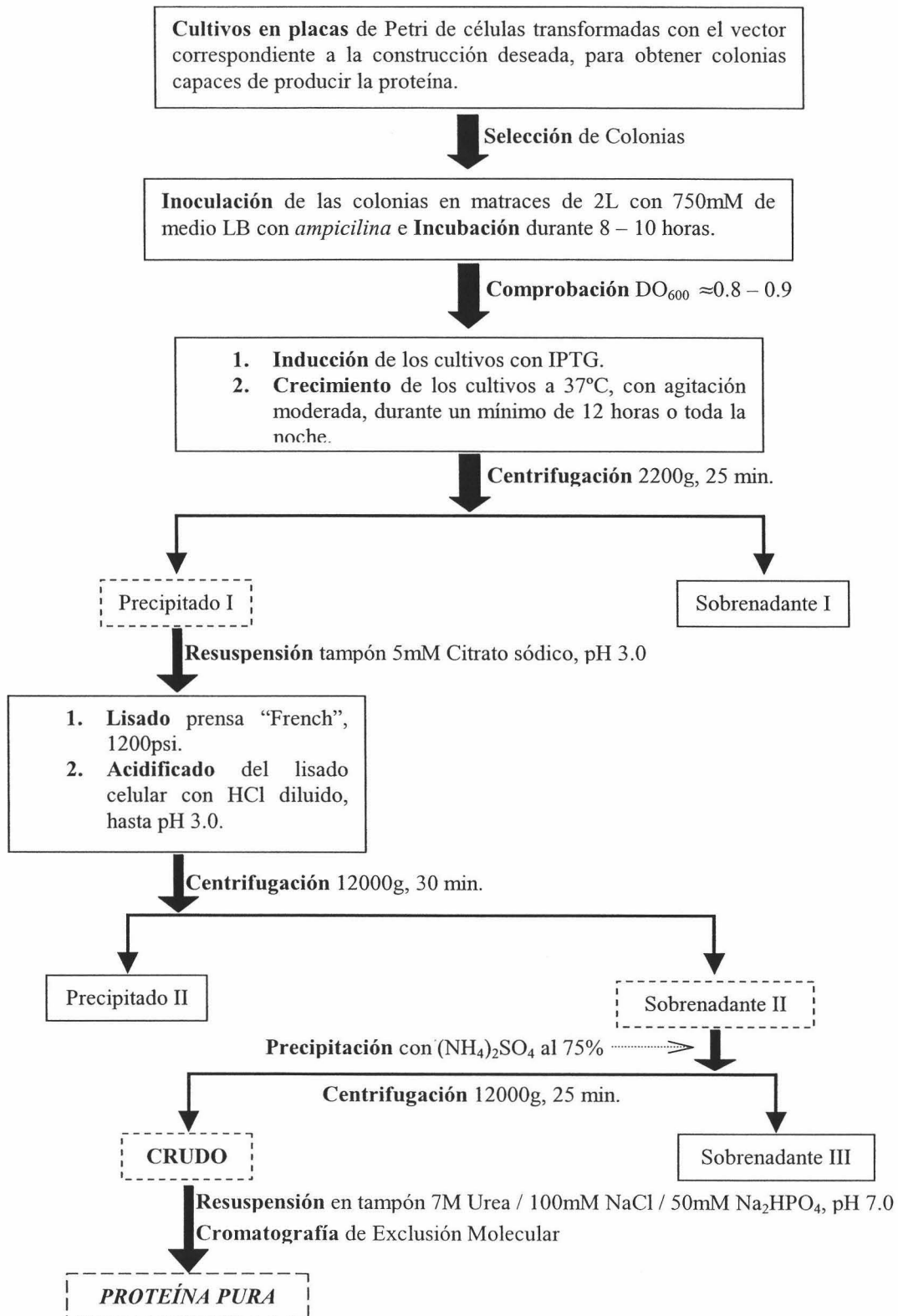


Fig. 4.8.1: Esquema general de la purificación de las diferentes variantes del dominio SH3-Spc.

4.8.3. Purificación de las diferentes variantes del dominio SH3-Spc por cromatografía de exclusión molecular.

Hasta ahora, disponemos de un crudo de proteína que contiene la proteína sobre-expresada, pero, a pesar de todos los pasos de separación que se han dado, aún quedan otras proteínas e impurezas que la acompañan y que es preciso eliminar si se quiere obtener una proteína de alta pureza. Para ello, se emplea la *Cromatografía de Exclusión Molecular*, que separará las diferentes proteínas presentes en el crudo, entre las que se encuentra el SH3, en función de su tamaño molecular.

Esta cromatografía tiene su principio en el hecho de que las diferentes moléculas presentes en la disolución se distribuyen, de manera diferencial entre el disolvente, o *fase móvil*, y una matriz porosa de un cierto tamaño de poro, denominada *fase estacionaria* y que se empaqueta en una columna, rodeado de disolvente. De acuerdo con este principio, cuando se introduce en la columna una muestra heterogénea constituida por moléculas de diferente tamaño, las más pequeñas accederán a los poros de la fase estacionaria con mayor facilidad que las que tengan un tamaño mayor, por lo que su *tiempo de retención* en el interior de la columna será mayor. Por esta razón, las moléculas de mayor tamaño se eluyen, es decir, salen, de la columna antes que las más pequeñas. De esta manera, las distintas moléculas constituyentes de una muestra heterogénea, se separan en función de sus tiempos de retención en el interior de la columna.

En el caso de las variantes del dominio SH3-Spc que nos ocupa, se empleó una columna cromatográfica preparativa de exclusión molecular Hi-Load Superdex-75 26/60 (Amersham Biosciences) conectada a una bomba peristáltica con la que se aplica un flujo a la columna de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Antes de llevar a cabo la cromatografía de la muestra de proteína es preciso equilibrarla, en el mismo tampón en el que el crudo se ha resuspendido el crudo de proteínas (tampón 7 M Urea, 100 mM cloruro sódico, 50 mM fosfato sódico, pH 7.0). Tras equilibrar la columna pues, se clarifica el crudo de proteínas centrifugándolo en la ultracentrífuga Beckman a unos 12000 g durante 20 minutos aproximadamente, a 4°C. Después, el sobrenadante de esa centrifugación se filtra a través de un filtro de nitrocelulosa de tamaño de poro 0.45 μm (SARSTEDT FiltroPur®) e inmediatamente se inyecta en la columna.

La cromatografía se sigue midiendo la absorbancia del eluato a 280 nm utilizando un detector UV-visible de flujo UV-1 (Pharmacia) y se recogen fracciones de 4 mL con un colector automático RediFrac 100 (Pharmacia). En la figura 4.8.2. se recoge un cromatograma típico de este tipo de purificaciones en el que se distingue claramente el pico correspondiente al dominio SH3-Spc purificado.

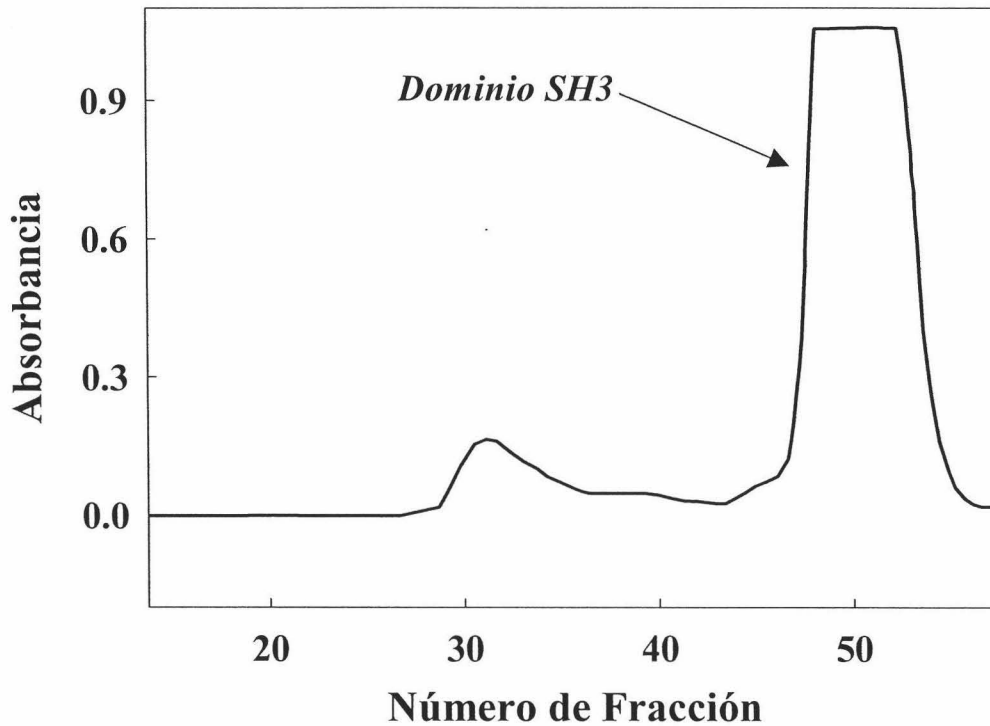


Fig. 4.8.2.: Cromatograma típico correspondiente a la purificación de cualquiera de las variantes del dominio SH3-Spc utilizadas en esta memoria. En él se aprecia claramente un pico único de proteína, intenso y perfectamente resuelto, separado del de impurezas previo.

Naturalmente, se toman muestras de cada una de las fracciones que, según el cromatograma, contienen proteína y se analizan por electroforesis para comprobar su grado de pureza. Lo usual es que el dominio SH3-Spc aparezca a un volumen de elución de entre 180 y 220 mL. La pureza de la proteína así obtenida está próxima al 100 %, de manera que es suficiente para llevar a cabo los estudios de estabilidad y de unión a ligandos que se describen en esta memoria. En las fracciones recogidas, la proteína se encuentra desnaturalizada, en el tampón urea de concentración 7 M, de manera que será preciso quitarle la urea para renaturalizarla, como se describe en el apartado siguiente, aptdo. 4.8.4.

Para eliminar posibles restos de proteína que pudiesen haber quedado en el interior de la columna y evitar por tanto contaminaciones cuando se purifiquen otras proteínas, es preciso lavar la resina de la misma con un volumen aproximado de unos 8 a 10 mL de una disolución de guanidina 7 M en fosfato sódico 50 mM, 100 mM NaCl, a pH 7.0. Posteriormente se lavará según el protocolo establecido por el fabricante de la misma.

4.8.4. Renaturalización y conservación de las distintas variantes del dominio SH3-Spc purificadas.

Las fracciones cromatográficas que contienen proteína pura, se juntan y se dializan de forma extensiva frente a tampón citrato sódico 5mM, pH 3.0, al objeto de eliminar la urea y así, renaturalizar el dominio. Al hacer la diálisis a pH ácido conseguimos eliminar también los fragmentos de ADN que hayan podido eluirse conjuntamente con ella de la columna, pero para conseguir todo esto es preciso dar al menos 4 cambios de 5L de volumen a la diálisis, en intervalos de 8 a 10 horas.

Una vez concluida la diálisis se determina la concentración y, con ella, la cantidad aproximada de proteína obtenida. La concentración de la proteína se determina espectrofotométricamente, midiendo la absorbancia de la muestra a 280nm, en un espectrofotómetro Beckman DU-70 o Jasco V-530 y empleando cubeta de cuarzo de pasos de luz 5 ó 10mm. Para las muestras de proteína a pH ácido, se empleó un coeficiente de extinción molar promedio, $\epsilon_{280} = 15512.7M^{-1}cm^{-1}$, determinado a partir del método de Gill y von Hippel (Gill y von Hippel, 1989). Se empleó un mismo coeficiente para todas las variantes del dominio estudiadas, a un mismo valor de pH, debido a que los valores individuales del mismo, obtenidos para cada una de las variantes estudiadas eran muy próximos y el error cometido al emplear ese valor promedio del coeficiente era menor que el propio error asociado a la medida de absorbancia en el espectrofotómetro. En la figura siguiente, fig. 4.8.3., se muestra un espectro UV-visible típico del dominio SH3 de α -espectrina.

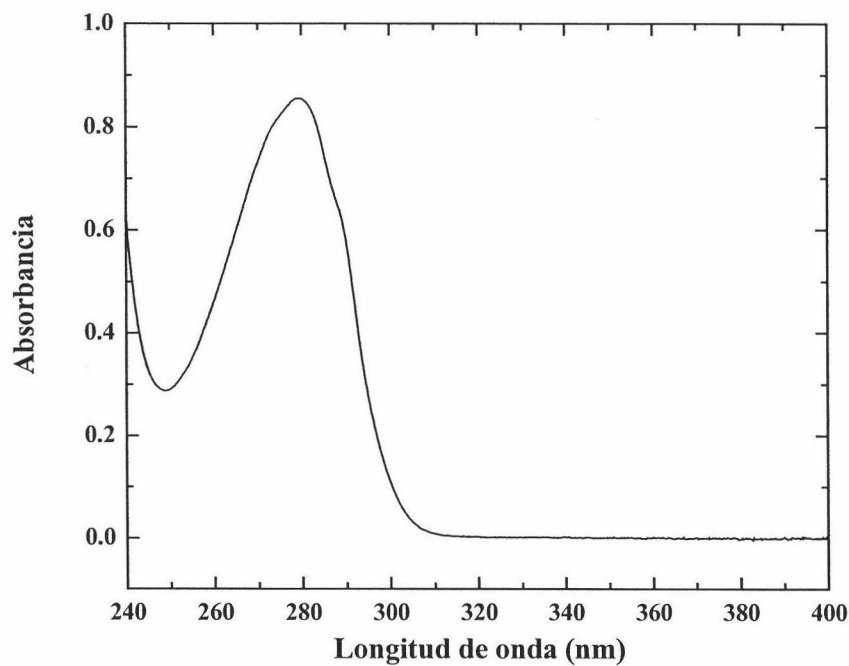


Fig. 4.8.4.1: Espectro UV-visible del dominio SH3 de α -espectrina en tampón 5mM citrato sódico, pH 3.0.

Una vez determinada la concentración, y conocido el volumen de disolución, se puede determinar, aproximadamente, la cantidad de proteína obtenida de la purificación y que normalmente oscilaba en torno a los 200mg por cada 4.5L de medio de cultivo totales. La disolución que contiene el dominio puro, se distribuye en alícuotas de unos 18mg, éstas se congelan en N₂ líquido y finalmente se almacenan congeladas a -80°C.

4.9. Cálculos basados en la estructura.

4.9.1. Introducción.

Existe un amplio conjunto de cálculos y predicciones que pueden realizarse conociendo las coordenadas atómicas de una proteína que se hayan determinado por difracción de rayos X o por RMN, y que son parte del “cajón de sastre” conocido bajo el término “Biocomputación” o “Bioinformática”. Desde el punto de vista de las aplicaciones la Bioinformática abarca desde, relativamente sencillos algoritmos para la representación de las moléculas con modelos 3D, hasta el análisis de la ingente cantidad de datos que generan la Genómica y la Proteómica, pasando por las simulaciones de Dinámica Molecular en complejos campos de fuerza, la predicción del plegamiento de proteínas, los cálculos de la energética de la interacción intermolecular, los análisis de las secuencias de aminoácidos, la predicción de estructura secundaria y terciaria a partir de la secuencia, etc.

4.9.2. Metodología aplicada.

Lo que en este trabajo se ha hecho y que se resume bajo el epígrafe de *Cálculos basados en la estructura*, y que puede considerarse biocomputación, son unos sencillos cálculos de *superposición*, *contactos atómicos* y *accesibilidad del disolvente*, con objeto de comprobar qué posibles modificaciones estructurales introducen las mutaciones en los sitios 47 y 56 del dominio SH3 de Espectrina:

Mutaciones a.a. 47

N → A : N47A

N → G : N47G

Mutaciones a.a. 56

A → S : A56S

A → G : A56G

Las estructuras de la forma natural del dominio SH3 y de los cuatro mutantes estudiados están depositados como archivos tipo PDB en el Banco de Datos de Proteínas (Brookhaven National Laboratory) con los siguientes códigos:

Formas moleculares	Código PDB
<i>Natural</i>	1shg
<i>N47A</i>	1qkx
<i>N47G</i>	1qkw
<i>A56S</i>	En proceso
<i>A56G</i>	En proceso

Para los cálculos realizados se ha utilizado las siguientes plataformas y programas:

- **Plataforma:** Ordenador personal con procesador Intel Pentium IV, CPU 1500 MHz. 256 MB de memoria RAMBUS.
- **Sistemas Operativos:** Suse LINUX 8.1 Professional y Microsoft Windows® ME.
- **Programas:**
 - WHAT IF 1999 Edition (Guerrit Vriend, EMBL). Compilado para Linux.
 - VMD 1.8 (Theoretical Biophysics Group. University of Illinois and Beckman Institute). Versión para Microsoft Windows®.
 - Origin 6.1 (OriginLab Corporation).

4.9.2.1. Superposición de Estructuras.

El proceso de superposición y el cálculo de la desviación cuadrática media del esqueleto polipeptídico se ha realizado doblemente con el programa VMD y el programa WHATIF. Una vez definidas los dos conjuntos de átomos y/o restos que se desean superponer, se calcula la matriz de rotación y el vector de traslación que minimiza la desviación cuadrática media de la distancia entre los átomos. Los resultados son prácticamente idénticos y se ha utilizado el primero para la creación de figuras de estructuras superpuestas. Para el cálculo de distancias entre C α y entre los centros de masas se han utilizado las funciones CADIF y CENDIF del módulo SUPPOS de WHATIF. Para la representación de resultados se ha utilizado el programa ORIGIN 6.1.

4.9.2.2. Contactos atómicos.

El análisis de los contactos atómicos se ha realizado con el módulo ANACON del programa WHATIF. Se considera establecido un contacto entre dos átomos cuando éstos están a la distancia suma de sus radios de van der Waals mas una distancia de contacto ($d \geq 0$) que el usuario selecciona. Se han utilizado las siguientes funciones de este módulo que se ejecutan sobre dos rangos de restos de una misma molécula establecidos por el usuario; normalmente cada rango incluye la totalidad de los restos:

- **CONRES:** Analiza contactos entre restos aminoácidos de una proteína. Busca todos los pares de restos que tengan al menos 1 par de átomos, A y B, a la distancia de corte resultante de la suma de los correspondientes radios de van der Waals mas la distancia de contacto adicional: $r_{vdwA} + r_{vdwB} + d$.
- **CONATM:** Analiza contactos entre átomos. Busca todos los pares de átomos, A y B, que están a la distancia $r_{vdwA} + r_{vdwB} + d$.
- **CNTRES:** Genera una lista de los aminoácidos del primer rango, y para cada uno de ellos se da el número de restos del segundo rango que tienen a menos un átomo a la distancia de corte.
- **CNTATM:** Genera una lista de los aminoácidos del primer rango, y para cada uno de ellos se da el número átomos del segundo rango que están a la distancia de corte.
- **CONTAC:** Genera un listado detallado de todos los contactos entre los dos rangos, especificando cada par de átomos dentro de la distancia de corte.

La construcción de mapas bidimensionales de contactos y otras gráficas se han hecho con Origin 6.1.

4.9.2.3. Área superficial accesible (ASA) al disolvente.

Para calcular la accesibilidad del agua a la superficie de la proteína se ha utilizado el módulo ACCESS del programa WHATIF para calcular el ASA a la molécula de agua representada por una sonda esférica de 1,4 Å de radio. Dado que se



- **SHOACC:** Genera un listado especificando por resto en tres columnas el ASA total, la parte correspondiente al esqueleto polipeptídico y la parte correspondiente a la cadena lateral.
- **ANASRF:** Además del ASA para cada resto, calcula el promedio del ASA para cada tipo de aminoácido de todas las proteínas en el Banco de Datos de Proteínas (1999).

Como en los casos anteriores la representación de los resultados se han realizado con el programa Origin 6.1.



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Tal y como se ha planteado en los objetivos generales, este trabajo ha tratado de investigar la cooperatividad energética, estructural y funcional del dominio SH3 atendiendo a dos aspectos diferentes, aunque íntimamente relacionados entre sí. En primer lugar se pretendía caracterizar los efectos de la producción de perturbaciones energéticas localizadas mediante la realización de mutaciones en determinados puntos del dominio SH3 de α -espectrina (SH3-Spc) sobre la estructura, la estabilidad y la dinámica estructural y la capacidad funcional del mismo.

Un segundo aspecto del trabajo consistía en estudiar la termodinámica de la interacción entre un polipéptido rico en prolina (p41) y el dominio SH3-Spc, y cómo la energía de dicha interacción se propaga cooperativamente desde el sitio de unión a otras regiones del dominio, comparando la transmisión de este tipo de interacciones con la de las perturbaciones locales estudiadas anteriormente.

Para ello se ha empleado una gran variedad de técnicas experimentales que abarcan el diseño racional de las mutaciones, técnicas de biología molecular, calorimetría diferencial de barrido (DSC), espectroscopia de fluorescencia (EF), calorimetría isotérmica de titulación (ITC), técnicas biocomputacionales así como la resonancia magnética nuclear (RMN), prestando un interés especial en los estudios de las cinéticas de IHD seguidas por RMN bidimensional (2D-RMN).

Este trabajo ha seguido en la línea de otros estudios de este tipo realizados con anterioridad en nuestro Grupo de Investigación (Sadqi, 2000) pero, sin embargo, aporta dos importantes novedades, como son el empleo de técnicas de ingeniería genética y de calorimetría isotérmica de titulación (ITC) combinadas con técnicas de IHD seguido por RMN, para la caracterización molecular de la estabilidad y de la unión del dominio en estudio a polipéptidos ricos en prolina.

En primer lugar se describen los resultados referentes a la caracterización de los efectos de las mutaciones puntuales realizadas sobre el dominio y posteriormente se

detallan los relativos a los estudios de la unión del dominio con el decapeptido de diseño rico en prolina *p41*.

5.1. Transmisión de cooperatividad por efecto de mutaciones puntuales.

5.1.1. Diseño y obtención de las variantes del dominio SH3-Spc.

Siguiendo diversos procedimientos de diseño racional e ingeniería genética, como los que se exponen en el apartado 4.7, es posible obtener distintas variantes de una misma proteína en las que uno o más restos aminoacídicos presentes en la proteína natural (WT), son sustituidos por otros de nuestra elección (mutaciones). A partir de este momento nos referiremos a las variantes del dominio diferentes a la forma natural como “*mutantes*”.

Estudios posteriores de los diferentes mutantes de la proteína en las mismas condiciones experimentales permitirán comparar los resultados obtenidos con los que se obtienen para la forma WT y deducir de dicha comparación la manera y la medida en que esos cambios en la proteína afectan tanto a su estabilidad, como a su estructura y a su interacción con otras moléculas (Hilser et al., 1997), (Neira et al., 1997; Casares et al., 2003).

En un escenario ideal, este tipo de estudios consistiría en producir mutaciones puntuales que induzcan únicamente cambios energéticos bien definidos, sin afectar significativamente a la estructura, es decir, sin crear ni destruir interacciones que puedan oscurecer la interpretación de los efectos sobre la estabilidad en regiones distintas del punto de mutación (Hilser et al., 1997). Desafortunadamente, este tipo de mutaciones son casi siempre imposibles ya que siempre se produce algún tipo de cambio estructural, como se describirá más adelante para los diferentes mutantes estudiados. Sin embargo, los cambios en la estructura producidos por las mutaciones

realizadas en este trabajo son pequeños y generalmente limitados a la región de la mutación.

En este trabajo se han estudiado tres grupos de mutantes del dominio SH3-Spc, en los que las mutaciones se localizan en tres posiciones de la estructura bien diferenciadas, todas ellas expuestas al disolvente, buscando la perturbación mínima de la estructura del dominio, a saber:

- **Mutantes en la Asparagina 47 (N47X):** En esta posición, se han estudiado dos variantes: *N47A*, en el que la asparagina en posición 47 ha sido sustituida por una alanina y *N47G*, en el que dicho residuo se ha cambiado por una glicina. Ambas variantes fueron diseñadas en el laboratorio del Dr. Luis Serrano (EMBL, Heidelberg, Alemania), aunque su expresión y purificación se han llevado a cabo en nuestro laboratorio.
- **Mutantes en la Alanina 56 (A56X):** En esta posición se han estudiado dos variantes, *A56G*, en la que la alanina en posición 56 es sustituida por una glicina y *A56S*, en la que dicho resto se ha cambiado por serina. Inicialmente se diseñaron otras dos variantes más, *A56K* y *A56E* en las que el resto en cuestión se sustituye por lisina y ácido glutámico respectivamente pero que, salvo en un estudio preliminar inicial, fueron descartadas dado que su estabilidad es prácticamente idéntica a la de la forma WT del dominio. Todos estos mutantes han sido diseñados, producidos y purificados en nuestro laboratorio.
- **Mutantes en la Arginina 21 (R21X):** Aquí se han estudiado cuatro mutantes, *R21A*, *R21G*, *R21D* y *R21S* en los que la arginina 21 original se sustituyó por alanina, glicina, ácido aspártico y serina respectivamente. Al igual que en el caso anterior, todos han sido diseñados y obtenidos en nuestro laboratorio.

Desde un punto de vista más particular, la posición 47 se localiza en una zona poco flexible del dominio, un giro denominado *distal* que resulta ser un giro tipo β -II' típico en cuya posición "i+1" (Sibanda et al., 1989) se localiza el residuo asparagina 47 (Asn 47) en el dominio SH3-Spc, como se aprecia en las estructuras obtenidas tanto por

crystalografía de rayos X (Musacchio et al., 1992) como por RMN (Blanco et al., 1997). Este giro se encuentra entre las regiones del dominio SH3-Spc con los mayores valores del llamado factor ϕ según estudios cinéticos de su plegamiento, lo que ha llevado a la conclusión de que se encuentra bastante estructurado en el estado de transición de plegamiento, formando parte, junto con las dos hebras β adyacentes y las hélice 3_{10} , del núcleo de plegamiento del dominio (Viguera et al., 1994), (Martinez et al., 1998), (Martinez y Serrano, 1999), (Vega et al., 2000), (Cobos et al., 2003). Por otra parte, según el mapa de Ramachandran clásico, dicha posición en un giro de estas características se localiza en el interior de una zona denominada II' ($\phi = 60 \pm 30$, $\psi = -115 \pm 30$) (Hutchinson y Thornton, 1994), que es una zona sólo permitida para residuos de glicina. Sin embargo, y aunque es este aminoácido el que ocupa la posición "i+1" en la gran mayoría de los giros β tipo II' de las proteínas de estructura conocida (Wilmot y Thornton, 1988), en ciertas ocasiones, se pueden encontrar otros aminoácidos diferentes de glicina en esta zona ((Wilmot y Thornton, 1988); (Jia et al., 1993); (Stites et al., 1994)). Un estudio previo de estos mutantes (Vega et al., 2000) demostró que los cambios en estabilidad producidos por las mutaciones son pequeños y similares a los que se encuentran cuando se cambia una glicina por alanina en una hélice- α o en una lámina- β lo que, unido al análisis de dicho giro en las estructuras cristalográficas de los mutantes, hizo concluir a los autores que no existe relajación apreciable de la estructura ni cambio en el número de interacciones que justifiquen ese pequeño cambio energético, por lo que los autores propusieron que la región II' del mapa de Ramachandran podía acoger además de a glicina, al menos a alanina y a asparagina con un coste energético relativamente bajo. La existencia de estos mutantes ya diseñados, cuyo material genético nos fue proporcionado amablemente por el Dr. L. Serrano, ha dado pie a la realización de los estudios de IHD.

Por su parte, las mutaciones localizadas en las posiciones 56 y 21 se escogieron debido a que dichas posiciones se localizan en dos zonas diferentes del sitio de unión del dominio para polipéptidos ricos en prolina. Así, la posición 56 se localiza en la cara expuesta al disolvente de la hélice 3_{10} mientras que la posición 21 se localiza en la zona central de otro de los giros del dominio, un giro β tipo I en el extremo del denominado lazo *RT*. La posición 56, ocupada por alanina en la forma natural del dominio, es una zona de estabilidad elevada (Sadqi et al., 1999) que participa en una interacción

inespecífica entre los dominios SH3 y las secuencias de poliprolina (Viguera et al., 1994). Además, esta región también se encuentra bastante estructurada en el estado de transición del dominio (Martínez et al., 1998), (Martínez y Serrano, 1999). Por su parte, la posición 21, ocupada originariamente por arginina, se encuentra en una zona bastante flexible del dominio, que se pliega en los estadios finales del proceso de plegamiento (Martínez et al., 1998), (Martínez y Serrano, 1999) y que está implicada en la especificidad de la unión de péptidos ricos en prolina a los dominios SH3 (Viguera et al., 1994). El decapeptido *p41*, de secuencia APSYSPPPPP, previamente diseñado para el dominio SH3 de Abl para el que muestra una elevada afinidad (Pisabarro y Serrano, 1996), es capaz de unir con afinidad moderada a la forma natural del dominio SH3-Spc (Dra. M. Pisabarro, comunicación personal). La alta afinidad de *p41* por SH3-Abl se debe a la formación de interacciones específicas favorables entre grupos del decapeptido con restos del lazo *RT* del dominio SH3-Abl (Pisabarro y Serrano, 1996).

Nuestro objetivo a la hora de escoger estos dos conjuntos de mutantes para llevar a cabo su estudio fue doble: por un lado, tratar de mejorar la afinidad relativamente baja del dominio SH3-Spc WT por el decapeptido *p41*, lo cual redundaría en un mejor conocimiento de los determinantes de la especificidad de este tipo de interacciones. Por otro, continuar con el estudio de la cooperatividad energética y estructural del dominio SH3-Spc, tratando de obtener información sobre los efectos cooperativos producidos por perturbaciones localizadas en dos puntos del sitio de unión de características bien diferenciadas, uno localizado en una región de estabilidad elevada y baja especificidad para la unión y otro ubicado en una zona flexible que participa de interacciones específicas. Los resultados de este estudio se relacionarán posteriormente con los obtenidos del estudio de la unión del dominio SH3-Spc al decapeptido *p41*, que se describe en el Apartado 5.2.

En la siguiente figura, fig. 5.1.1., se muestra una representación esquemática del dominio SH3-Spc en el que se indican las posiciones de las mutaciones realizadas en el mismo:

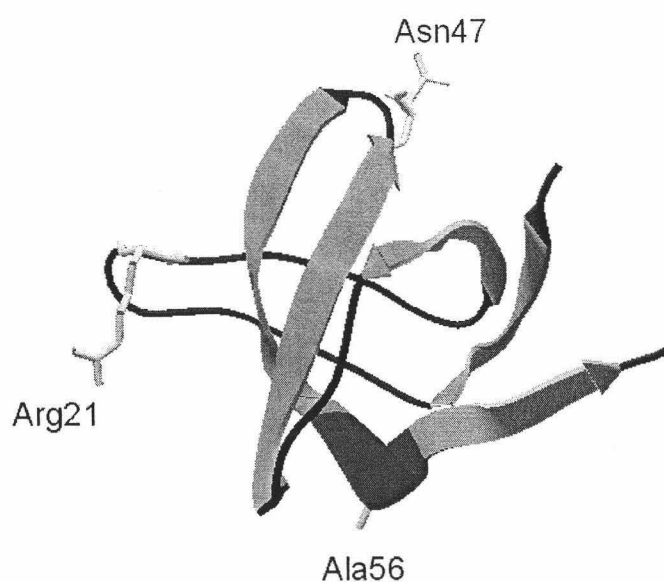


Figura 5.1.1. Representación esquemática en cintas de la estructura tridimensional de la forma natural del dominio SH3 de α -espectrina (código PDB 1shg) sobre la que se indican las cadenas laterales de los restos sobre los que se han realizado las mutaciones).

La obtención de todos estos mutantes del dominio SH3-Spc se ha llevado a cabo mediante técnicas de mutagénesis dirigida realizadas sobre la forma natural, tal y como se describe en el apartado 4.7.4 de la sección Material y Métodos. La purificación de los mismos, así como de la forma natural, se ha realizado de forma análoga en todos los casos a excepción de los mutantes en posición 47, en los que la purificación se ha llevado a cabo a pH neutro durante todo el proceso, y se encuentra recogida en el apartado 4.8. también de la sección Material y Métodos de esta Memoria.

5.1.2. Determinación de las magnitudes termodinámicas de la estabilidad global de los mutantes del dominio SH3-Spc por calorimetría diferencial de barrido (CDB).

Tal y como se describe en el apartado 4.6., de la sección de Materiales y Métodos, los estudios de IHD seguidos por RMN bidimensional permiten la

determinación de la energía de Gibbs aparente de los procesos conformacionales por los que el hidrógeno amida de cada residuo aminoacídico de la proteína se expone al disolvente y tiene lugar su intercambio. Para la interpretación adecuada de estas magnitudes resulta conveniente disponer de medidas independientes de los parámetros termodinámicas del proceso desplegamiento global del dominio en condiciones análogas a las de los experimentos de IHD con el fin de poder interpretar adecuadamente los procesos conformacionales involucrados. Por otro lado nos interesa también establecer la medida en que las mutaciones realizadas sobre el dominio SH3-Spc afectan a la estabilidad global del mismo.

Por todo ello se han realizado estudios de desplegamiento térmico de todos y cada uno de los mutantes del dominio SH3-Spc descritos anteriormente mediante calorimetría diferencial de barrido, CDB, por ser la técnica más adecuada para la caracterización termodinámica de los procesos de desplegamiento de las proteínas, tal y como se describe en el apartado 4.2. de la sección de Materiales y Métodos. Todos los mutantes, incluida la forma WT, se estudiaron en las mismas condiciones experimentales, de tal manera que la única variable fuese la mutación realizada sobre el dominio en cada caso y poder así comparar los resultados obtenidos. Existen estudios previos de la termodinámica y la cinética del plegamiento realizados en nuestro grupo de investigación tanto de la forma natural (Viguera et al., 1994) como de los dos mutantes en posición 47 (Vega et al., 2000) que concluyeron que el proceso de desplegamiento de las diferentes variantes del dominio SH3-Spc puede describirse de forma adecuada según un modelo de dos estados. Por otro lado, otro estudio previo de la termodinámica del plegamiento de la forma natural del dominio SH3-Spc realizado en D₂O (Sadqi et al., 1999) demostró que no existían diferencias apreciables de los valores de las energías de Gibbs de desplegamiento obtenidos en D₂O con aquéllos que se obtuvieron bajo las mismas condiciones en agua ligera (Viguera et al., 1994), por lo que los valores de energía de Gibbs de desplegamiento global del dominio en agua ligera se pueden considerar como una buena referencia de los valores de energía de Gibbs aparente obtenidos por medidas de IHD.

Los experimentos de CDB se han realizado en dos condiciones de pH diferentes: por un lado pH 3.0, que es precisamente el valor de pH* (sin considerar el efecto isotópico) al que se han llevado a cabo los experimentos de IHD, y por otro lado, pH

7.0. De este modo, no sólo disponemos de valores referencia de las magnitudes termodinámicas para el proceso de desplegamiento con las que podremos comparar los resultados de los experimentos de IHD, sino que dispondremos de un estudio más completo, a dos valores de pH que permitirá discernir entre eventuales diferencias en el orden de estabilidad de cada grupo de mutantes, si es que existen, provocadas por efecto del pH.

Todos los experimentos de CDB realizados con todas las variantes del dominio SH3-Spc se han llevado a cabo a una concentración en torno a $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ con muestras de proteína dializadas exhaustivamente frente a los tampones siguientes: glicina 20 mM para los experimentos a pH 3.0 y fosfato sódico 20 mM para los que se han realizado a pH 7.0, de forma que la fuerza iónica se ha mantenido baja en todos los casos. La concentración de las muestras de proteína se ha determinado espectrofotométricamente en todos los casos empleándose para ello un coeficiente de extinción molar de $16147 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para las muestras a pH 7.0 (Viguera et al., 1994) y de $15512.7 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para las muestras a pH 3.0. Este último ha sido determinado por el método de Gill y von Hippel (Gill y von Hippel, 1989).

El desplegamiento inducido por temperatura de todos los mutantes del dominio SH3-Spc en ambas condiciones de pH ha resultado ser altamente reproducible en un segundo calentamiento consecutivo de las muestras, lo que indica que en estas condiciones de pH y fuerza iónica, se trata de procesos reversibles y en equilibrio, como ocurre con la variante WT (Viguera et al., 1994) o los mutantes en posición 47 (Vega et al., 2000). En todos los casos, la velocidad de barrido utilizada fue de $1 \text{ K}\cdot\text{min}^{-1}$ en un intervalo de temperaturas comprendido entre $3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y $110 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

En la siguiente figura, fig. 5.1.2, se pueden apreciar las curvas de capacidad calorífica molar parcial, C_p , que se obtienen para cada una de las familias de mutantes del dominio SH3-Spc estudiadas, a pH 3.0.

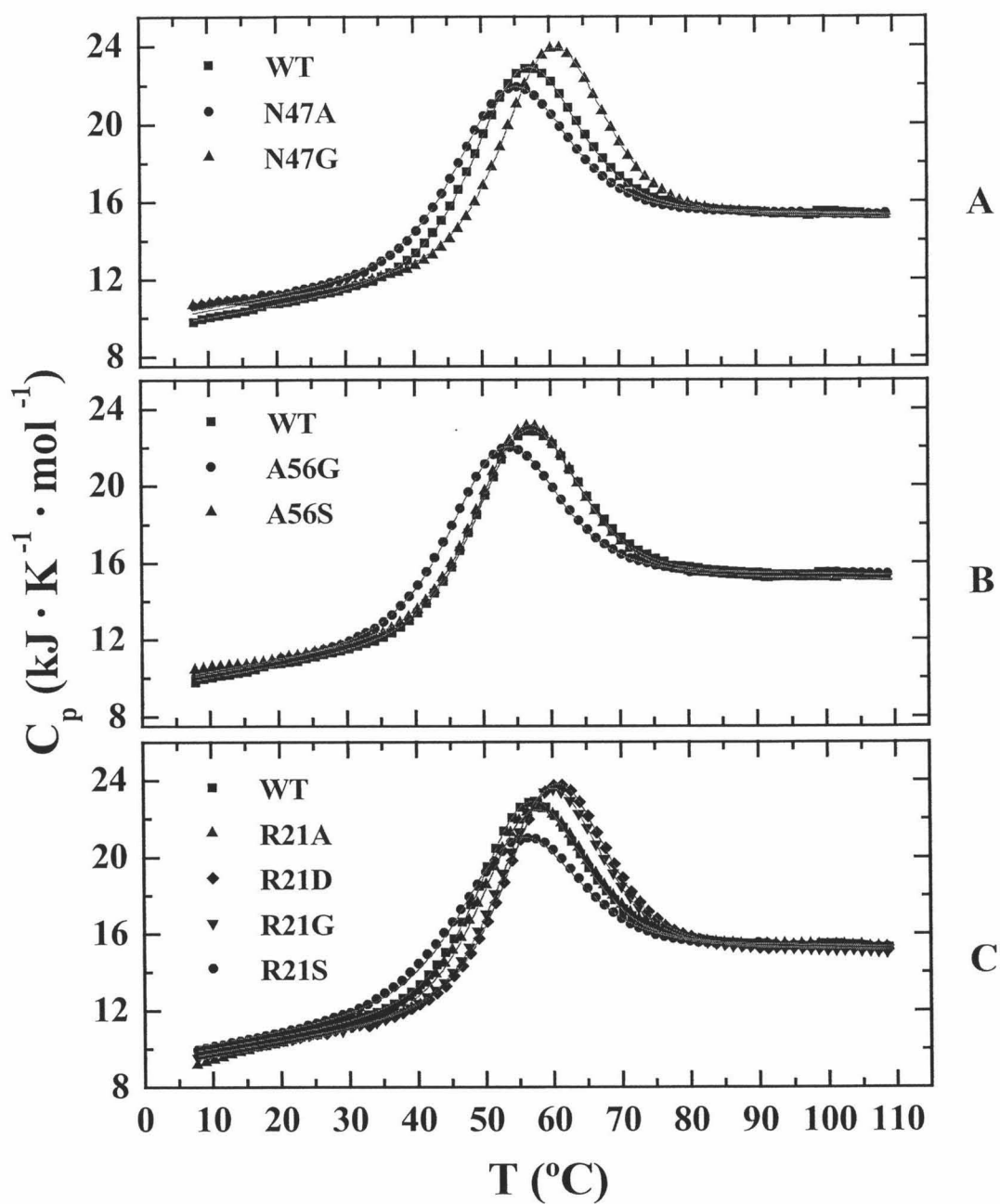


Figura 5.1.2. Trazas experimentales (símbolos) y ajustes al modelo de dos estados (líneas rojas continuas) de la dependencia con la temperatura de la capacidad calorífica molar parcial, C_p , de las diferentes familias de mutantes del dominio SH3-Spc estudiadas, a pH 3.0. (A) Familia de mutantes en posición 47, (B) Familia de mutantes en posición 56 y (C) Familia de mutantes en posición 21. Todos ellos se representan junto a la variante natural del dominio, notada como "WT".

En la figura anterior, fig. 5.1.2, se representan tanto las trazas experimentales de la dependencia de C_p con la temperatura, a pH 3.0, para cada familia de mutantes, como los ajustes globales por mínimos cuadrados no lineales al modelo de desplegamiento de dos estados para cada una de las familias de curvas, como se describe en el apartado 4.2.3.2.2. de la sección de Materiales y Métodos. En todos los casos se puede apreciar cómo existe un excelente acuerdo entre los datos experimentales y el modelo considerado, de forma similar a como ya se había encontrado en estudios anteriores, tanto con la forma natural ((Viguera et al., 1994), (Sadqi et al., 1999)) como con los mutantes en posición 47 (Vega et al., 2000).

En los experimentos realizados a pH neutro, el comportamiento de los diferentes mutantes es similar, con lo que también en esas condiciones se puede analizar el desplegamiento térmico de las diferentes variantes del dominio, según un modelo de dos estados clásico.

En las dos condiciones, pH 3.0 y pH 7.0, se ha hecho un análisis preliminar de las trazas calorimétricas obtenidas, de forma individual para cada uno de los mutantes estudiados considerando que capacidad calorífica del estado nativo, $C_{p,N}$, tiene una dependencia lineal con la temperatura y que la capacidad calorífica del estado desplegado, $C_{p,D}$, se describe según un polinomio de segundo grado, calculado a partir de la secuencia de la variante del dominio considerada en cada caso y empleando datos de capacidad calorífica de compuestos modelo en disoluciones acuosas (Makhatadze y Privalov, 1990), tal y como se describe en el apartado 4.2.3.2.1. de la sección de Materiales y Métodos. Las transiciones calorimétricas de proteínas globulares pequeñas, como es el caso de este tipo de dominios, son bastante anchas debido a que su incremento de entalpía de desplegamiento es relativamente pequeño. Este hecho complica una evaluación precisa de los parámetros termodinámicos asociados dichas transiciones a partir de ajustes individuales (Haynie y Freire, 1994b; Haynie y Freire, 1994a).

Por ello y por considerar que es un planteamiento más riguroso de análisis, se optó por realizar el ajuste múltiple de las trazas manteniendo comunes a todas ellas los parámetros **b** (pendiente de la $C_{p,D}$), **c** (curvatura de la $C_{p,D}$) y **e** (pendiente de la $C_{p,N}$).

Por otro lado, el parámetro c se mantuvo fijo en el ajuste a un valor igual a $-1.438 \times 10^{-4} \text{ kJ} \cdot \text{K}^{-2} \cdot \text{mol}^{-1}$, obtenido como promedio de los valores de dicho parámetro que resultan del cálculo de la función $C_{p,D}$ realizado para cada una de las variantes del dominio estudiadas (Makhatadze y Privalov, 1990). Estas aproximaciones no suponen un error apreciable teniendo en cuenta que dichos parámetros de la función $C_{p,U}$ para las distintas variantes del dominio variaban entre ellas en la sexta cifra decimal.

El efecto que sobre la estabilidad del dominio SH3-Spc, ejercen las mutaciones puntuales realizadas, tanto a pH 3.0 como a pH 7.0 se muestran en la tabla siguiente, tab. 5.1.1. En ella se representan los valores de los parámetros termodinámicos del desplegamiento térmico de cada una de las variantes del dominio estudiadas, en las dos condiciones de pH, 3.0 y 7.0. Los errores asociados a los valores de T_m que aparecen en la tabla 5.1.1. y que son de 0.2 °C aproximadamente, se han determinado considerando un intervalo de confianza del 97 % en torno al valor que para dicho parámetro se obtiene del ajuste, para las distintas variantes del dominio estudiadas. Asimismo, el error estimado en el valor de ΔH_m ($\sim 5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) se ha considerado a partir de la desviación estándar de la correlación entre los distintos valores de ΔH_m y T_m obtenidos para todos los mutantes a cada valor de pH.

Además, se han obtenido valores promedio de ΔC_p a 50 °C de $2.7 \text{ kJ} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ para pH 3.0 y de $3.5 \text{ kJ} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ para pH 7.0, que están en buen acuerdo con los valores obtenidos en estudios previos con diferentes variantes del dominio SH3-Spc (Viguera et al., 1994) (Vega et al., 2000)).

Tabla 5.1.1.: Parámetros termodinámicos del desplegamiento térmico de los distintos mutantes de SH3-Spc determinados por CDB. Las incertidumbres aproximadas en T_m y ΔH_m son de 0.2 °C y 5 kJ·mol⁻¹ respectivamente. Los valores de ΔG_D (25 °C) se han extrapolado empleando valores medios de ΔC_p (50 °C) para cada pH.

	Variante	T_m (°C)	ΔH_m (T_m) (kJ·mol ⁻¹)	ΔC_p (50°C) (kJ·K ⁻¹ ·mol ⁻¹)	ΔG_D (25°C) (kJ·mol ⁻¹)	$\Delta\Delta G_D$ (25°C) (kJ·mol ⁻¹)
pH 3.0	WT	55.1	174	2.9	11.7 ± 0.5	-
	N47G	59.8	186	2.3	14.2 ± 0.6	2.5
	N47A	53.1	161	2.3	10.1 ± 0.4	-1.6
	A56G	51.5	163	2.7	9.9 ± 0.4	-1.8
	A56S	55.5	178	2.3	12.2 ± 0.5	0.5
	R21A	55.4	171	3.2	11.5 ± 0.5	-0.2
	R21D	59.2	187	3.0	14.1 ± 0.7	2.4
	R21G	58.3	184	2.9	13.5 ± 0.6	1.8
	R21S	52.9	151	2.6	9.2 ± 0.5	-2.5
pH 7.0	WT	63.6	209	3.6	16.0 ± 0.8	-
	N47G	66.5	222	3.3	18.3 ± 0.9	2.3
	N47A	62.0	197	3.0	14.3 ± 0.7	-1.7
	A56G	60.8	205	3.4	14.9 ± 0.7	-1.1
	A56S	63.5	216	3.8	16.8 ± 0.8	0.8
	R21A	64.9	215	3.8	17.0 ± 0.9	1.0
	R21D	66.8	223	3.1	18.5 ± 0.9	2.5
	R21G	68.2	234	3.7	20.3 ± 1.0	4.3
	R21S	64.9	215	3.7	17.0 ± 0.9	1.0

Según los datos expuestos en la tabla anterior, el resultado más llamativo es que las mutaciones puntuales realizadas sobre la forma natural del dominio SH3-Spc producen ligeras variaciones en la estabilidad del mismo, algunas de las cuales son estabilizantes y otras desestabilizantes.

En el caso de la familia de mutantes en posición 47, N47A y N47G, se aprecia como la mutación a alanina es ligeramente desestabilizante mientras que la mutación a glicina estabiliza el dominio. La magnitud de los efectos es muy similar en las dos condiciones de pH estudiadas. Ese pequeño cambio en estabilidad indica que son pequeños cambios conformacionales los responsables y no la formación o ruptura de

interacciones importantes en la estructura, como ya se establece en estudios previos (Vega et al., 2000). Concretamente, el efecto de la mutación a alanina, que como hemos visto es desestabilizante, podría deberse al hecho de que el grupo amida de la cadena lateral de asparagina posee un dipolo que podría mantener una cierta interacción con otros dipolos que se establecen a lo largo de la horquilla β en cuyo extremo se sitúa. Se ha descrito que en este tipo de horquillas β los enlaces de hidrógeno que mantienen su estructura, constituyen una serie de dipolos que se alternan y la estabilizan. Podría ser que la asparagina estuviera formando parte de esa serie de dipolos y, cuando se sustituye por alanina, que es un resto apolar, ya no contribuiría a dicho sistema, con lo que la estabilidad del giro *distal* disminuiría y con ella, la del resto de la proteína. De acuerdo con esta interpretación está el hecho de que la propensión de aminoácidos como asparagina o aspártico a ocupar la posición $i+1$ de los giros β de tipo II' es relativamente elevada y sólo superada por la de glicina [Guruprasad, 2000 #229]. Por el contrario, la mutación de asparagina a glicina parece estar estabilizando al dominio debido a que la liberación de la tensión conformacional que supone la presencia de la cadena lateral del resto asparagina en posición $i+1$ del giro β tipo II' (Vega et al., 2000). Este efecto estabilizante podría estar parcialmente compensado por el efecto desestabilizante que acompaña a la eliminación del grupo amida polar de la asparagina. Por último, la diferencia en estabilidad encontrada entre el mutante N47G y el mutante N47A ($\approx 4.0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) parece cuantificar directamente el efecto de liberación de tensión conformacional del giro distal anteriormente mencionado.

Estudios previos realizados con polipéptidos modelo de alanina han establecido mediante parametrizaciones teóricas los cambios en energías libres de Gibbs en el proceso de formación de diferentes elementos de estructura secundaria, desde α -hélices ((Tobias y Brooks, 1991) y (Yang y Honig, 1995a)), hasta láminas ((Yang y Honig, 1995b)) y giros β ((Yang et al., 1996)) a partir de las conformaciones desordenadas. El cambio en estabilidad predicho por estos autores para la diferencia de energía de Gibbs de plegamiento que produce la sustitución de alanina por glicina en la posición $i+1$ de un giro β tipo II' optimizado es de $5.4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Yang et al., 1996), algo superior aunque en acuerdo razonable con nuestro valor experimental, teniendo en cuenta la no idealidad del giro distal como giro β tipo II'.

En el caso de las mutaciones en posición 56, contrariamente a lo que ocurría en posición 47, la mutación a glicina es desestabilizante y la razón podemos encontrarla en el hecho de que al cambiar la alanina original por glicina se incrementa el número de grados de libertad conformacional de la cadena en ese resto, con lo que se estabilizan aquellos estados conformacionales en los que esa zona esté desestructurada, entre ellos lógicamente el estado desplegado con lo que, necesariamente, la proteína será ahora menos estable de lo que era originalmente. Existen referencias en la bibliografía que establecen que la estructura de un giro de vuelta de hélice 3_{10} es muy similar a la de un giro β tipo I ((Tobias y Brooks, 1991)). De acuerdo con esto, si consideramos a la posición 56 como la $i+2$ de un giro β tipo I, según estudios teóricos previos (Yang et al., 1996), la eliminación del C_β en dicha posición, supondría una desestabilización de unos $2.5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ valor éste bastante próximo a los $1.8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ que obtenemos como resultado a pH 3.0, aunque algo mayor que los $1.1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ observados a pH 7.0.

Por su parte, la mutación a serina produce un incremento en la estabilidad muy ligero y que queda incluso dentro del error experimental. De haber algún tipo de efecto estabilizante producido por la inclusión de la cadena lateral polar de serina, éste podría tener un origen similar al de la asparagina en posición 47, ya que también está descrita la existencia de un sistema de dipolos en las hélices, que contribuye a su estabilidad.

Finalmente, las mutaciones en posición 21 presentan efectos algo diferentes sobre la estabilidad de la proteína, así por ejemplo, a pH 3.0, encontramos que la mutación de la arginina original por ácido aspártico estabiliza a la proteína y la explicación la podemos encontrar en que la posición 21 se localiza en posición $i+2$ de un giro β de tipo I (Sibanda et al., 1989), en el extremo del lazo *RT*. La secuencia ideal del giro β tipo I, según las propensidades máximas de los aminoácidos presentes en este tipo de giros ((Hutchinson y Thornton, 1994), (Guruprasad y Rajkumar, 2000)) es $\text{Asn}(i)\text{-Pro}(i+1)\text{-Asp}(i+2)\text{-Gly}(i+3)$, mientras que en el dominio SH3-Spc WT el giro presenta una secuencia $\text{Ser}(i)\text{-Pro}(i+1)\text{-Arg}(i+2)\text{-Glu}(i+3)$. Al cambiar la arginina por el aspártico se favorece el plegamiento de ese giro, lo que explica la estabilización del conjunto de la proteína. En el caso de la mutación a alanina, el cambio en estabilidad a pH 3.0 es casi imperceptible mientras que la mutación a serina es claramente menos estable que la forma natural. Los resultados a pH 7.0, indican que la especie WT es la

menos estable de todas las estudiadas y le siguen los mutantes a serina y alanina, pero en cualquiera de esos dos casos, la estabilización de la proteína es muy pequeña ($+ 1.0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), dentro del error experimental. Alanina presentan una propensidad similar a arginina para ocupar la posición $i+2$ del giro β tipo I (Guruprasad y Rajkumar, 2000), lo que explica los pequeños cambios en estabilidad observados. Por el contrario, serina sí se encuentra con una frecuencia significativamente mayor en esa posición del giro, por lo que la disminución de estabilidad a pH 3.0 motivada por esta mutación debe de tener su origen en otro tipo de interacciones.

Los claros aumentos en estabilidad observados para la mutación a glicina son relativamente sorprendentes. Si se comparan las estabildades de los mutantes R21A y R21G, tenemos que la estabilidad del dominio aumenta en $2.0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ y $3.3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ a pH 3.0 y pH 7.0, respectivamente, por la sustitución de alanina por glicina en posición 21. Sin embargo, los cálculos teóricos de la estabilidad de un giro β tipo I ideal han predicho que la eliminación del C_β en posición $i+2$, al pasar del mutante en alanina al mutante en glicina, supondría un efecto desestabilizante de unos $2.5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Yang et al., 1996), lo que estaría de acuerdo con la mayor propensidad relativa de la alanina para ocupar la posición $i+2$ del giro β tipo I, tal y como se refleja del análisis de las bases de datos de las estructuras de proteínas ((Hutchinson y Thornton, 1994), (Guruprasad y Rajkumar, 2000)). Los resultados de nuestros estudios de desplegamiento global contradicen claramente aquellos resultados. Ahora bien, si se considera la posibilidad de que la mutación a glicina produzca un cambio en la conformación del giro β , de tipo I a tipo II, la eliminación de dicho C_β supondría una estabilización de unos $4.6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, lo que a su vez se encuentra en claro acuerdo con la elevada propensidad relativa de la glicina para ocupar la posición $i+2$ de un giro β tipo II ((Hutchinson y Thornton, 1994), (Guruprasad y Rajkumar, 2000)). Esta última interpretación está de acuerdo con nuestros resultados, en los que encontramos una estabilización al eliminar el C_β en dicha posición, de entre 2.0 y $3.3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, algo menor que la predicha por estos autores. Sin embargo, si tenemos en cuenta que los estudios teóricos se basan en péptidos modelo y en parametrizaciones teóricas, en los que se realizan numerosas simplificaciones y se obvian posibles interacciones que sí están presentes cuando dichos elementos de estructura se encuentran formando parte de la proteína en conjunto, se puede afirmar que el cambio en la conformación del lazo RT del dominio SH3-Spc, de giro β tipo I a

tipo II al cambiar el aminoácido en posición 21, de alanina a glicina, es cuando menos, probable.

En conclusión, las mutaciones puntuales realizadas en restos expuestos al disolvente del dominio SH3-Spc producen cambios en la estabilidad global del dominio, cuantificables mediante el uso de la CDB. La mayoría de los efectos producidos sobre la estabilidad global del dominio son claramente interpretables como cambios en la estabilidad local limitados a la región de la mutación y los valores experimentales obtenidos para estos incrementos en estabilidad son coherentes, aunque algo menores, con las predicciones teóricas existentes en la bibliografía para estos efectos locales.

Así, ha quedado parcialmente satisfecho nuestro objetivo de diseñar las mutaciones que produjeran perturbaciones energéticas localizadas, cuantificables por CDB, que no afecten significativamente a la estructura del dominio. Se hacía necesario además comprobar si las mutaciones realizadas inducen cambios significativos en el resto de la estructura del dominio o, por el contrario, los cambios se reducen efectivamente a la zona de la mutación.

5.1.3. Reasignación de los espectros de RMN de los mutantes del dominio SH3-Spc. Efectos en los desplazamientos químicos producidos por las mutaciones.

Hasta ahora, se han descrito los efectos que las mutaciones puntuales realizadas ejercen sobre la estabilidad global del dominio SH3-Spc, desde un punto de vista termodinámico. Para ello hemos hecho uso de una técnica macroscópica como lo es la CDB. No obstante, uno de los objetivos planteados a la hora de diseñar tales mutaciones era precisamente estudiar la manera en la que las perturbaciones energéticas locales provocadas por efecto de dichas mutaciones son transmitidas al resto de la estructura a través de las rutas de cooperatividad del dominio, para lo cual haríamos uso de la técnica de IHD. No obstante, tal y como se describe en el apartado 4.5.9.3 de la sección Material y Métodos, antes de realizar cualquiera de los experimentos de IHD es preciso realizar una asignación inequívoca de las señales de cruce $\text{CH}_\alpha\text{-NH}$ de los espectros COSY bidimensionales que se van a registrar para seguir la cinética del proceso de

intercambio, para cada uno de los mutantes del dominio SH3-Spc elegidos para dicho estudio. Para realizar la asignación de dichas señales hemos registrado previamente una serie de espectros bidimensionales en agua ligera, a saber: DQF-COSY, TOCSY con un tiempo de mezcla de 80ms y NOESY con un tiempo de mezcla de 150ms, espectros a los que nos referiremos como “de asignación”. Con la ayuda de estos espectros bidimensionales y en los casos en los que se observaron solapamiento de algunas señales, con ayuda también de los primeros espectros COSY sensibles a la fase de la serie de IHD de cada mutante, y siguiendo una estrategia fundamentalmente comparativa basada en la asignación previa de la forma natural de la proteína (Blanco et al., 1997), se ha podido asignar la práctica totalidad de las señales correspondientes a la zona de la “huella dactilar” del espectro DQF-COSY para cada mutante, que se ha empleado posteriormente como patrón para asignar dichas señales en los espectros COSY de IHD, tal y como se indica en el apartado 4.5.9.3 de la sección Materiales y Métodos. Los desplazamientos químicos de los picos de cruce de la huella dactilar para cada mutante del dominio SH3-Spc, utilizando como referencia la señal de ^1H -RMN del 1,4-dioxano se encuentran recogidos en el apéndice I.

Por otro lado, los desplazamientos químicos constituyen además una importante fuente de información estructural ya que, por el hecho de depender su valor de manera muy sensible del entorno químico en el que se encuentra cada protón, se pueden emplear para identificar cambios en la estructura secundaria de las proteínas (Wishart y Nip, 1998); (Wishart y Case, 2001). Así, por ejemplo, por su situación en el esqueleto polipeptídico, el protón asociado al C_α es especialmente sensible a los cambios que se producen en los ángulos ϕ y ψ del grupo peptídico. El protón asociado al nitrógeno amida, también por su situación en el esqueleto polipeptídico de la proteína y por sus características químicas, es sensible además a otros factores, entre los que podríamos citar la presencia y fortaleza de los enlaces e hidrógeno en los que está implicado. Por estas razones resulta más complicada la interpretación de cambios en los desplazamientos químicos del protón amida para la identificación de cambios en la estructura secundaria de las proteínas (Wishart y Case, 2001).

De esta manera, si consideramos los valores obtenidos para los desplazamientos químicos del C_α -H de los distintos residuos aminoacídicos de los mutantes del dominio

SH3-Spc y los comparamos con sus homólogos en la forma natural de la proteína, podemos identificar posibles cambios en la estructura secundaria del dominio, cuando se realizan sobre él las mutaciones en las tres posiciones elegidas: 47, 56 y 21.

En las figuras siguientes, fig. 5.1.3 A, B y C, se muestran las diferencias en el desplazamiento químico de los hidrógenos C_{α} -H de cada residuo entre cada pareja de variantes del dominio, agrupados por familias. Como es lógico, en cualquiera de los casos analizados, los cambios más acusados se localizan generalmente en el residuo mutado, debido fundamentalmente a los cambios en el entorno químico del protón C_{α} -H provocados por la sustitución de la cadena lateral con la mutación. Sin embargo, se pueden apreciar también cambios dentro de la región de la mutación en residuos cercanos pero diferentes al sustituido, lo que sugiere la existencia de ciertas reordenaciones de la estructura local de la proteína para “acomodarse” al nuevo residuo presente ahora en la posición en la que se ha realizado la mutación. En algunos casos se observan, además, cambios más sutiles en zonas alejadas de la región de la mutación, que sugieren ciertos efectos a larga distancia sobre la estructura.

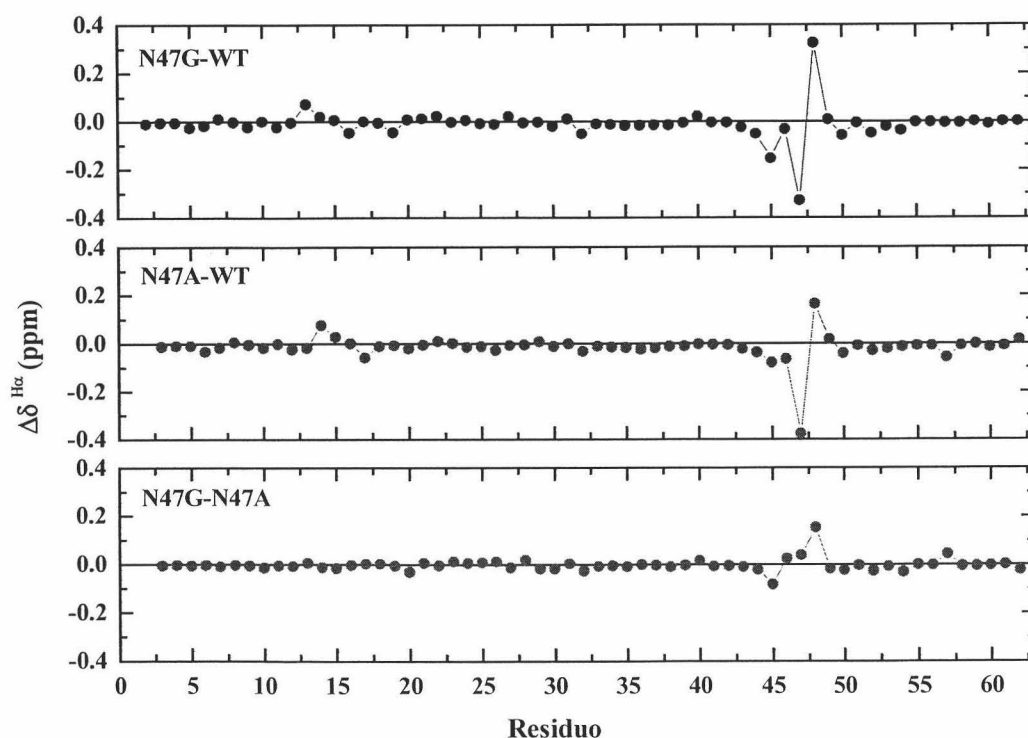


Fig. 5.1.3.A. Cambios en los desplazamientos químicos de los protones $C-H_{\alpha}$ a lo largo de la secuencia entre parejas de mutantes en posición 47. Los cambios se muestran en azul para la mutación Asn 47 a Ala, en rojo para la mutación Asn 47 a Gly y en verde se comparan los dos mutantes entre sí.

En esta figura, fig. 5.1.3.A, se muestran los cambios en desplazamiento químico de los protones C_{α} -H provocados por la mutación en posición 47, en los que claramente se aprecia cómo la zona de mayor cambio coincide con el punto de la mutación, la posición 47, y en el resto contiguo, el 48. Se aprecian asimismo cambios considerables en otros residuos adyacentes a estos dos. Los desplazamientos químicos de los protones C_{α} -H del resto de la cadena permanecen prácticamente invariables con la mutación, lo que indica que la estructura del dominio se mantiene prácticamente inalterada, salvo por ligeros cambios locales en la región de la mutación.

No obstante, al mutar la asparagina 47 por alanina o por glicina se produce una pequeña variación en los desplazamientos químicos en una zona alejada del lazo *distal*, donde se localiza la mutación. Concretamente se ven ligeramente afectados los residuos D14 y E17 situados en el largo lazo *RT*, sugiriendo ligeros cambios conformacionales en dicho lazo. En general, los cambios en los desplazamientos químicos son menores cuando ambos mutantes N47A y N47G se comparan entre sí y, además, se limitan exclusivamente a la zona de la mutación, como se aprecia en el panel inferior de la misma figura, fig. 5.1.3.A. Esto indica que las estructuras de ambos mutantes son muy parecidas entre sí a la vez que ambos presentan diferencias más notables con la estructura de la forma natural, lo que parece sugerir que la eliminación de la cadena polar de la arginina 47 juega un papel importante en una ligera reordenación de la estructura del dominio, como se describe más adelante (Casares et al., 2003), en el apartado 5.1.6. de esta sección.

En el caso de las mutaciones en posición 56, ocurre algo similar, es decir, los desplazamientos químicos permanecen prácticamente invariables en la mayoría de la secuencia del dominio, lo que indica que las mutaciones afectan poco a su estructura. Así se aprecia en la figura siguiente, fig. 5.1.3.B:

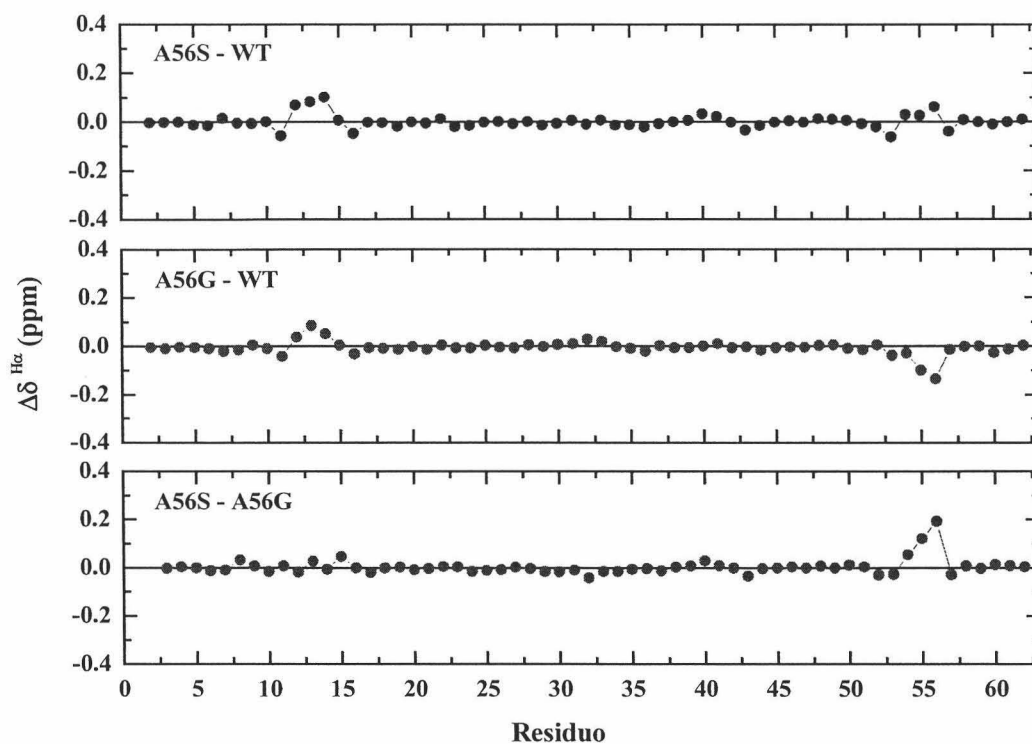


Fig. 5.1.3.B. Cambios en los desplazamientos químicos de los protones $C-H_{\alpha}$ a lo largo de la secuencia entre parejas de mutantes en posición 56. Los cambios se muestran en azul para la mutación Ala 56 a Ser, en rojo para la mutación Ala 56 a Gly, y en verde se comparan los dos mutantes entre sí.

En este caso, se aprecian también cambios en la zona de la mutación, la posición 56 y adyacentes, pero además, se observan cambios apreciables en los desplazamientos químicos de una zona alejada en la secuencia de la posición de la mutación; concretamente, se pueden observar cambios ligeros en los residuos L12, Y13, D14, situados al comienzo del largo lazo *RT*. De nuevo cuando se comparan ambos mutantes entre sí, sólo se aprecian cambios en la zona de la mutación, lo que sugiere que también en este caso las estructuras de los dos mutantes más similares entre sí que con la forma natural de la proteína. En la estructura tridimensional del dominio SH3-Spc (Musacchio et al., 1992), (Blanco et al., 1997) la zona de la hélice 3_{10} , donde se localiza la posición 56, y ese brazo del lazo *RT* se encuentran interconectados a través de una serie de contactos entre algunos de sus restos. Es lógico pensar que la mutación, que podría modificar ligeramente la conformación de la hélice, pueda inducir también una ligera reorganización de la zona de la estructura que se encuentra interconectada con ella, como se aprecia en los cambios en los desplazamientos químicos.

Parece además que la alteración que provocan ambas mutaciones en la conformación de la hélice 3_{10} es inversa, como se aprecia por el sentido opuesto del cambio en el desplazamiento químico de la zona. Por lo general se interpreta que cambios positivos en δ suponen una relajación de la hélice mientras que cambios negativos, suponen una mayor tensión en la misma, esto es se hace menos extendida (Wishart et al., 1991), (Wishart et al., 1992), (Wishart y Nip, 1998), (Wishart y Case, 2001). De cualquier manera, dado que se trata de cambios muy ligeros y que los desplazamientos químicos son muy sensibles, no se puede precisar demasiado en el cambio que las mutaciones provocan en la hélice.

Cuando consideramos los mutantes en posición 21, que se localiza en el giro β del largo lazo *RT* se observa algo similar a lo que ocurre con los demás mutantes, esto es, los desplazamientos químicos cambian poco a lo largo de la mayoría de la secuencia, excepto en la región de la mutación, lo que indica que la mutación no induce cambios importantes en la estructura del dominio. En la figura siguiente, fig. 5.1.3.C, se indican los cambios que se producen en el desplazamiento químico de los restos de los dos mutantes estudiados en posición 21, comparados entre sí y con la forma natural de la proteína:

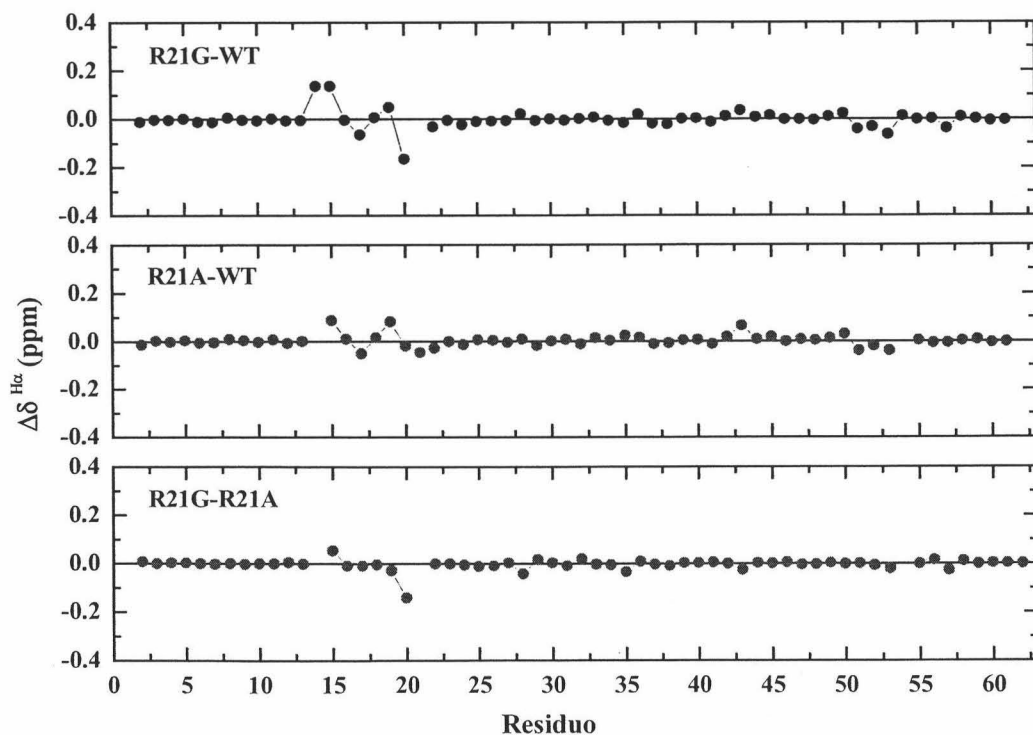


Fig. 5.1.3.C. Cambios en los desplazamientos químicos de los protones $C-H_{\alpha}$ a lo largo de la secuencia entre parejas de mutantes en posición 21. Los cambios se muestran en azul para la mutación Arg 21 a Gly, en rojo para la mutación Arg 21 a Ala, y en verde se comparan los dos mutantes entre sí.

Como se ha discutido anteriormente, la posición 21 se sitúa en posición $i+2$ de un giro β tipo I (Sibanda et al., 1989) y en dicha posición son la asparagina y el ácido aspártico los aminoácidos de mayor propensidad ((Hutchinson y Thornton, 1994), (Guruprasad y Rajkumar, 2000)). Sin embargo, la arginina, presente en la variante WT, y la alanina, presente en el mutante R21A, presentan una propensidad relativa baja y además similar ((Hutchinson y Thornton, 1994), (Guruprasad y Rajkumar, 2000)). El pequeño cambio en los desplazamientos químicos que se aprecia en una de las hebras del lazo *RT*, en particular en los restos Tyr 15, Glu 17 y Ser 19, puede deberse simplemente a una ligera reestructuración del mismo, provocada por la desaparición de la carga positiva de la arginina, mientras que el desplazamiento químico en la posición de mutación y adyacentes casi no varía entre la variante WT y el mutante R21A, indicando una estructura muy similar en el giro β .

Aunque la señal de cruce NH-C α H de la Gly 21 no ha podido ser asignada en el mutante R21G, la mutación a glicina, que estabiliza el dominio (ver apartado 5.1.2), provoca cambios mayores en los restos adyacentes que los que induce la mutación a alanina, cuya estabilidad difiere poco de la forma WT de la proteína. En particular, el desplazamiento químico del C α -H de la Pro 20, en posición $i+1$ del giro, disminuye claramente indicando una cierta reestructuración. Como se ha discutido en el apartado anterior, es posible que por efecto de la mutación tenga lugar un cambio conformacional en el giro β de tipo I que podría pasar a ser de tipo II, lo que podría explicar los mayores efectos en el desplazamiento químico observados.

En conclusión, los valores de desplazamientos químicos de los protones C α H del esqueleto de los diferentes mutantes estudiados cambian muy poco a lo largo de la mayor parte de cadena del dominio SH3-Spc. Sólo existen diferencias claras en las posiciones de mutación y menores en regiones adyacentes en el espacio, lo que sugiere que las mutaciones inducen únicamente pequeños cambios conformacionales locales sin afectar significativamente el resto de la estructura del dominio.

5.1.4. Análisis del efecto de las mutaciones sobre el Intercambio hidrógeno-deuterio.

Uno de los objetivos fundamentales de este trabajo experimental era determinar la manera en que las mutaciones puntuales sobre el dominio SH3-Spc provocan una alteración en su estabilidad termodinámica. En el apartado 5.1.2 se han descrito los experimentos de *Calorimetría Diferencial de Barrido* realizados, que otorgan valores para las magnitudes termodinámicas del desplegamiento global de cada una de las variantes estudiadas del dominio SH3-Spc. Sin embargo, son los estudios de las cinéticas de IHD hidrógeno-deuterio, seguidos por RMN bidimensional, los que permiten la determinación de las energías libres de Gibbs aparentes de los procesos conformacionales por los que el hidrógeno amida de cada resto aminoacídico de la proteína, se expone al disolvente y tiene lugar el proceso de intercambio (ver apartado 4.6.2.3 de la sección de Materiales y Métodos).

En este apartado se describen los diferentes experimentos de IHD realizados con cada una de las variantes del dominio SH3-Spc estudiadas, a saber: N47G, A56G, A56S, R21G y R21A, además de la forma natural, WT, como referencia.

La idea inicial era escoger una pareja de mutantes para cada una de las familias en estudio (N47X, A56X y R21X) en las que una de las mutaciones estabilizara al dominio y la otra lo desestabilizara. Preferentemente se trató de escoger parejas de mutantes alanina-glicina para tratar de simplificar al máximo la naturaleza de la perturbación local introducida por la mutación, que para este caso se reduce a la presencia o ausencia de cadena lateral expuesta al disolvente en ese punto, lo cual, en principio, produce una simple alteración del número de grados de libertad de la cadena que influye la estabilidad del dominio.

En el caso de la familia N47X, sólo se pudo realizar el estudio de IHD con el mutante a glicina, debido a que la mutación a alanina inducía una lenta agregación en la muestra en las condiciones en las que se llevaron a cabo todos los experimentos de IHD que impidió seguir su cinética de intercambio. Estudios preliminares realizados con ese mutante en particular han indicado que la mutación a alanina en posición 47 induce la

formación de agregados fibrilares de carácter amiloide, de los que se pretende continuar el estudio posteriormente.

Por su parte, se escogieron los mutantes a glicina y a serina en posición 56 ya que de los cuatro diseñados inicialmente, sólo esas dos mutaciones tenían efectos contrapuestos apreciables sobre la estabilidad del dominio.

Por último, de la familia en posición 21, de nuevo se escogieron el mutante a alanina y el mutante a glicina a pesar de que en el caso del mutante R21A el cambio en estabilidad con relación a la forma WT eran poco significativos. Sin embargo, dado el incremento tan notable en la afinidad por el decapeptido rico en prolina p41 que produjo dicha mutación a alanina en posición 21, se decidió escoger también este mutante ya que serviría como referencia para los estudios de IHD que se realizarían más tarde con el complejo proteína-ligando, como se expondrá más adelante.

El diseño de cualquiera de los experimentos de IHD realizados sobre cualquier variante del dominio se describe detalladamente en el apartado 4.6.1 de la sección Materiales y Métodos. Todos ellos se realizaron en las mismas condiciones de pH* y temperatura y aproximadamente a la misma concentración de proteína, concretamente, pH* 3.0 (no se corrigió en ningún caso ese valor por el efecto isotópico), 27.1°C de temperatura y una concentración en torno a 4.5mM. En todos los casos fue posible seguir el IHD de entre 40 y 45 residuos de la proteína de los 59 posibles, esto es, aquéllos que no son prolinas ni la metionina N-terminal. En la figura siguiente, fig. 5.1.4, se han representado algunos de los espectros COSY sensibles a la fase registrados para seguir el IHD de una de las variantes del dominio en estudio, a modo de ejemplo, concretamente los del mutante N47G, que es una de las variantes más estables del dominio de cuantas se han estudiado, razón por la que los tiempos de IHD de los hidrógenos amida más protegidos, son bastante largos.

Se aprecia claramente como a medida que transcurre el tiempo desde que la proteína es disuelta en el tampón deuterado, la intensidad de los picos de cruce $\text{CH}_\alpha\text{-NH}$, de los espectros COSY sensibles a la fase registrados, que es el observable que se ha considerado para seguir el IHD, va disminuyendo como resultado de la disminución de la población de moléculas de proteína que contienen hidrógeno en sus grupos amida

peptídicos por razón de su intercambio con el deuterio del disolvente. Como es lógico, cuanto más estable sea la proteína más tiempo va a tardar en tener lugar su intercambio completo, por eso en este caso, dada la alta estabilidad de la variante considerada en este caso, N47G, es preciso esperar algo más de cinco días para que la práctica totalidad de las señales del espectro COSY desaparezcan en las condiciones experimentales elegidas. Por supuesto, en otros casos en los que la variante estudiada era menos estable, el tiempo total de intercambio es menor.

Dado que el número de espectros promediados por incremento durante la adquisición de los espectros COSY de IHD variaba entre 4 y 128, con objeto de distribuir adecuadamente los puntos en las cinéticas, las intensidades absolutas de las diferentes señales en cada espectro COSY para cada valor de tiempo no podía emplearse como observable del que extraer la información del proceso de IHD, de manera que se consideraron intensidades relativas de cada una de las señales observadas con respecto a la de una señal correspondiente a un tipo de hidrógeno que no intercambia, la correspondiente al grupo $C_{\beta}H_3$ de la alanina 55 (ver apartado 4.6.1.1. de la sección Materiales y Métodos).

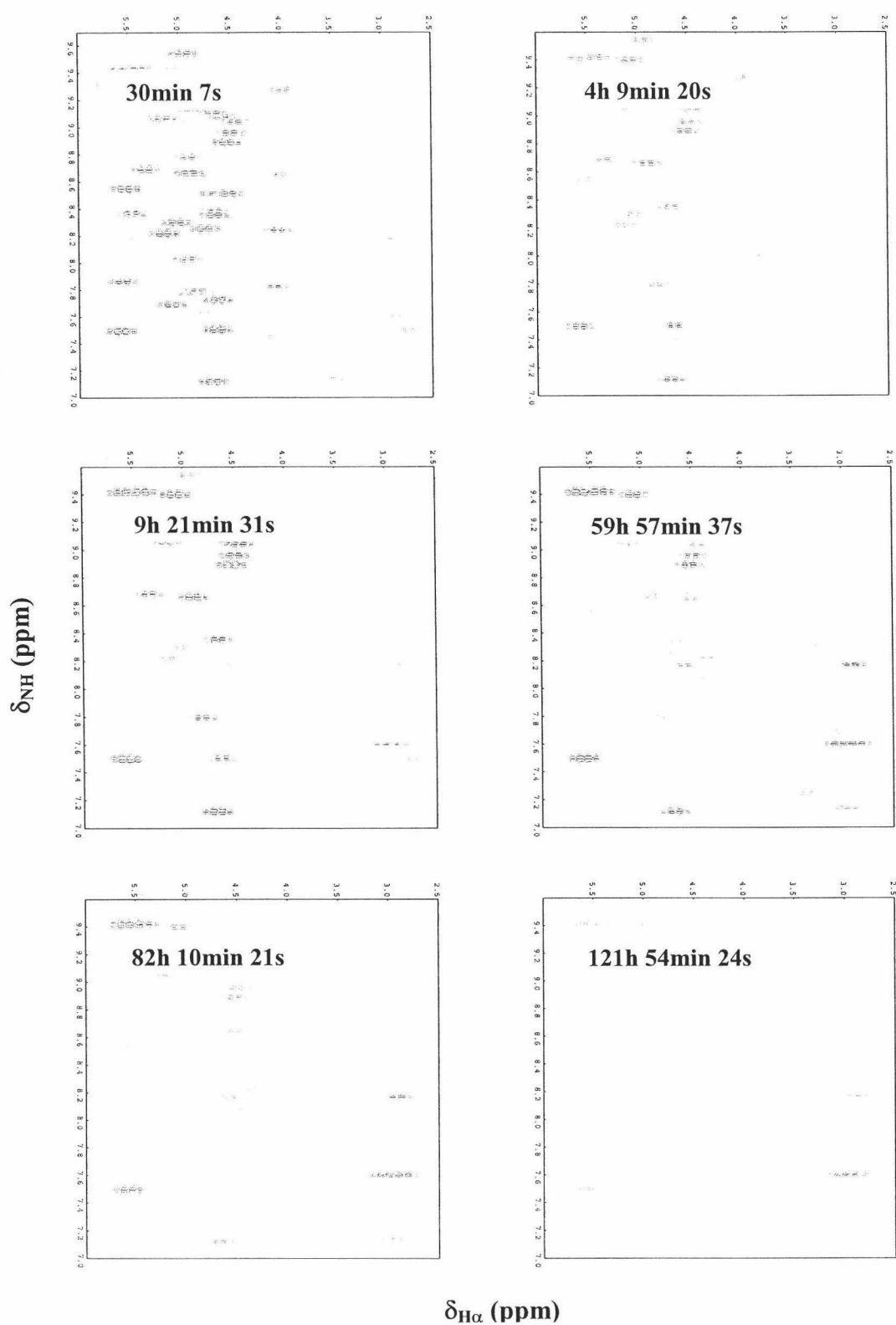


Fig. 5.1.4. Detalle de las regiones de las "huellas dactilares" $CH_{\alpha}-NH$ de algunos de los espectros COSY sensibles a la fase del mutante N47G del dominio SH3-Spc a diferentes tiempos de intercambio en 20mM glicina deuterada a pH* 3.0 y 27.1°C de temperatura.

Las intensidades relativas de dichas señales de cruce $\text{CH}_\alpha\text{-NH}$ de los diferentes residuos de la variante considerada en cada caso, se representaron frente al tiempo de IHD, considerando la mitad del tiempo de adquisición de cada espectro, resultando que la dependencia es del tipo exponencial simple, de pseudo-primer orden.

Para poder extraer resultados “fiables” de constantes cinéticas de IHD, k_{obs} , es preciso que las cinéticas de IHD se encuentren bien descritas, con una buena distribución de puntos experimentales. Por ello, sólo se han considerado como “fiables” aquellas cinéticas descritas por más de tres puntos de intensidad superior al ruido de los espectros COSY registrados a cada valor de tiempo, con lo que fue preciso disponer de un mayor número de puntos experimentales en la etapa inicial del experimento de IHD. Por ello, los primeros datos están determinados con mayor incertidumbre, ya que fue preciso rebajar el número de acumulaciones por incremento del tiempo t_1 en los espectros COSY iniciales, aún a costa de reducir así la relación señal-ruido, para poder registrar un mayor número de puntos (Sadqi, 2000).

En la figura siguiente, fig. 5.1.5, se representan las intensidades relativas de dichos picos de cruce correspondientes a algunos de los residuos de tres de las variantes en estudio en función del tiempo de IHD. Concretamente y a modo de ejemplo se han escogido los mutantes a glicina de las tres familias estudiadas: N47G, A56G y R21G.

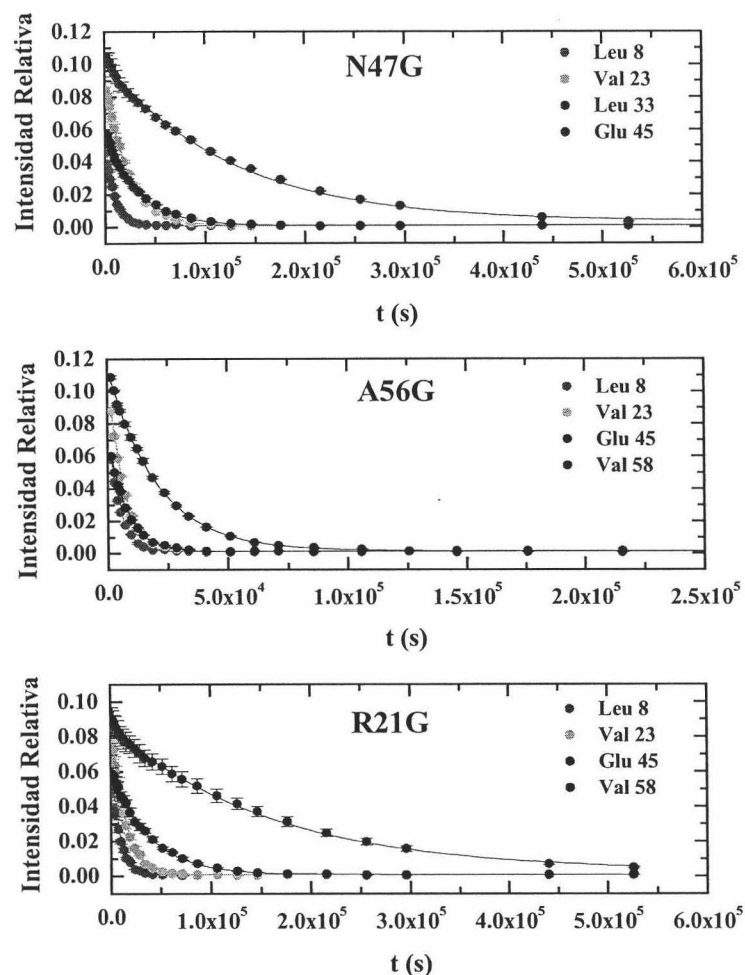


Fig. 5.1.5. Representaciones gráficas de la disminución de intensidad de las señales de cruce $CH_{\alpha}NH$ frente al tiempo para los mutantes a glicina de las tres familias en estudio, en 20mM glicina deuterada, pH* 3.0 y 27.10°C de temperatura. Los símbolos representan valores experimentales de intensidad relativa a cada valor de tiempo y las líneas continuas se corresponden con los ajustes de mínimos cuadrados no lineales de los datos experimentales a una función exponencial simple.

En estas gráficas se puede apreciar claramente el hecho de que cuanto mayor es la estabilidad del mutante considerado más dura el proceso de IHD del mismo; así por ejemplo, considerando un mismo residuo en los tres mutantes arriba indicados, se observa como las cinéticas más cortas son las del mutante a glicina en posición 56 mientras que las de los mutantes a glicina en posiciones 47 y 21 son más largas. Además, se aprecia una gran variabilidad en las velocidades de IHD de los distintos residuos aminoacídicos de la proteína, lo que indica las proteínas no constituyen un todo homogéneo sino que merced a la naturaleza dinámica de las mismas, las diferentes regiones de la proteína se comportan de manera diferente frente al proceso de IHD.

Del ajuste de los datos de intensidades decrecientes a esa función exponencial, mediante mínimos cuadrados no lineales tal y como se indica en la sección 4.6.3.2 de la sección Material y Métodos, se obtienen las constantes de velocidad aparentes de IHD para cada uno de los restos “observables” del dominio, k_{obs} . Los valores obtenidos para las k_{obs} de los diferentes restos del dominio, son bastante fiables en todos los casos estudiados dado que los ajustes obtenidos son en general bastante buenos. El error asociado a los valores de k_{obs} viene determinado por el intervalo de confianza para dicho parámetro ajustable que proporciona el programa Origin 6.1 empleado para llevarlos a cabo. Por supuesto, a partir de los valores de k_{obs} obtenidos de este modo y los valores de k_{int} calculados para nuestras condiciones experimentales a partir de la secuencia de aminoácidos de cada una de las variantes estudiadas (Bai et al., 1993), se han determinado los *factores de protección* frente al IHD como se indica en la sección 4.6.1.2 de la sección Materiales y Métodos (ecuación 4.6.4.). En el apéndice II se han tabulado los valores de las constantes de velocidad aparente de IHD determinados experimentalmente, k_{obs} , los valores de las constantes intrínsecas calculadas, k_{int} , y los factores de protección determinados a partir de ambas para cada uno de los restos del dominio en las diferentes variantes estudiadas del mismo.

5.1.4.1. Estabilidad Termodinámica Local de los dominios. Valores de ΔG_{ap} .

A partir de los valores de factores de protección determinados a partir de los valores experimentales medidos de k_{obs} para cada residuo de las diferentes variantes del dominio SH3-Spc, se pueden determinar los valores de ΔG_{ap} para cada uno de dichos residuos. Los valores de ΔG_{ap} reflejan los cambios aparentes en la energía de Gibbs que acompañan a los procesos conformacionales que sufre el dominio y que dan lugar a que cada resto en cuestión se exponga al disolvente y sufra el fenómeno de IHD.

En la figura siguiente, fig. 5.1.6, se representan los valores de ΔG_{ap} a lo largo de la secuencia de aminoácidos del dominio SH3, para cada una de las 6 variantes estudiadas. En estas gráficas se aprecia claramente cómo ciertas regiones del dominio se encuentran más protegidas frente al IHD y presentan valores de ΔG_{ap} más altos mientras

que en otras los valores de ΔG_{ap} son menores. No obstante, no ha podido seguirse el IHD de todos los restos aminoacídicos de cada variante del dominio debido al solapamiento de las señales de algunos de dichos restos, bien entre sí o bien con la señal residual del agua, o porque intercambian muy rápidamente, dentro del tiempo muerto del experimento. En esos casos, aparece un hueco en la gráfica correspondiente de ΔG_{ap} frente al número de residuo, fig. 5.1.6.

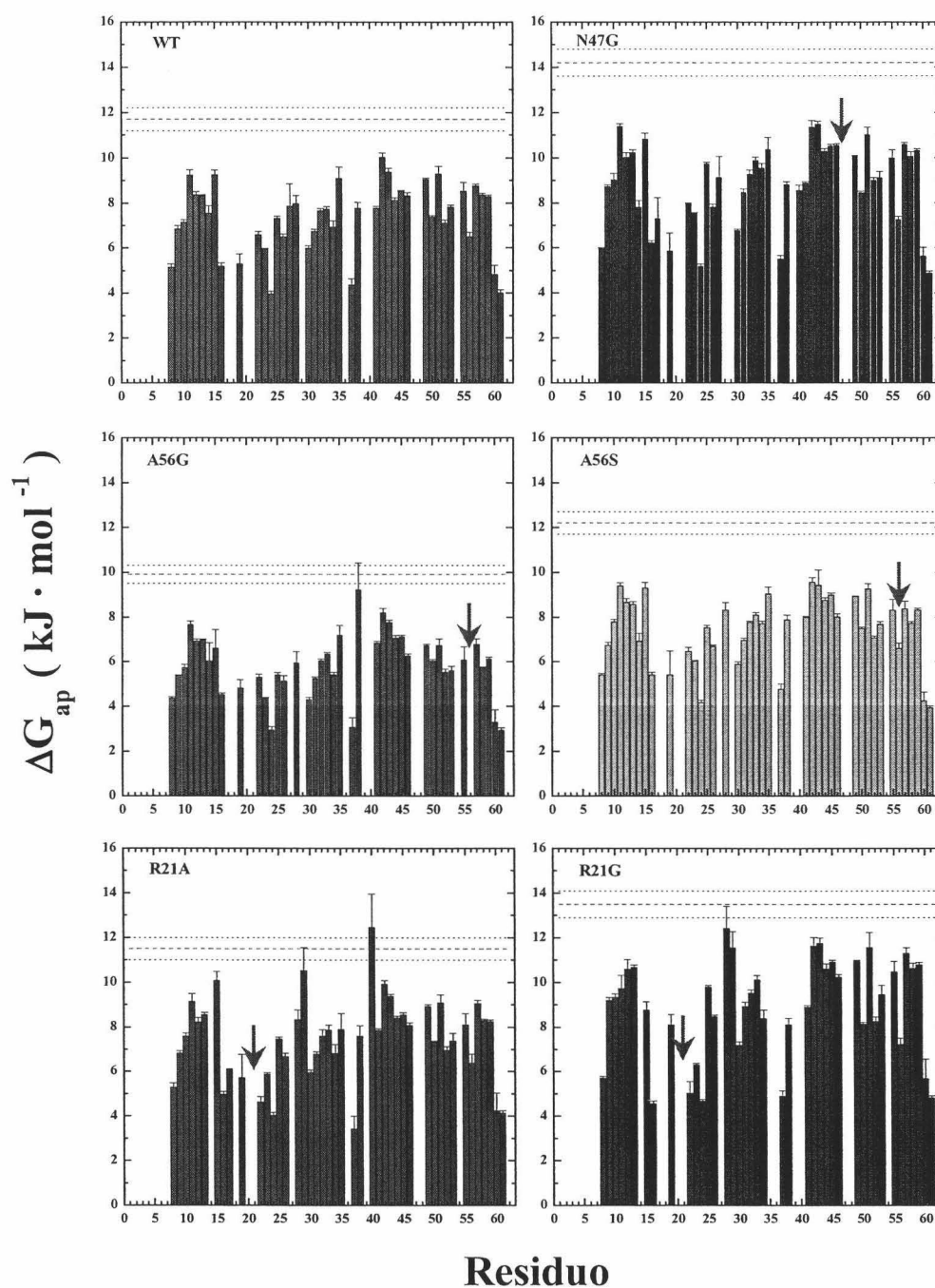


Fig. 5.1.6. Valores de ΔG_{ap} de intercambio, obtenidos del análisis de las cinéticas de IHD para los diferentes residuos de cada una de las variantes del dominio SH3-Spc a pH* 3.0 y 27 °C. Las barras representan los valores experimentales de ΔG_{ap} obtenidos, cuyas barras de error se han determinado a partir de los errores en las velocidades de intercambio en cada caso como semisuma de los límites de confianza superior e inferior del valor de k_{obs} . En las gráficas se representan también los valores de ΔG_D (25°C) para el desplegamiento global del dominio (líneas rojas discontinuas), a pH 3.0, determinados por CDB (apartado 5.1.2), junto con sus intervalos de error experimental (líneas azules punteadas). Las flechas rojas indican la posición de la mutación realizada en cada variante.

En dichas gráficas, fig.5.1.6, se han representado asimismo los valores de energía de Gibbs para el proceso de desplegamiento global, determinados por CDB (ver apartado 5.1.2), para cada variante del dominio, junto con sus intervalos de error correspondientes, suponiendo que el desplegamiento térmico del dominio SH3 sigue un modelo de dos estados en las condiciones experimentales consideradas (apartado 5.1.2, (Viguera et al., 1994)).

A primera vista, se aprecia cómo en la práctica totalidad de residuos del dominio para cualquiera de las variantes estudiadas, los valores de ΔG_{ap} son sistemáticamente menores que el valor de ΔG_D encontrado para cada variante por CDB. Este hecho se concibe teniendo en cuenta por un lado que la técnica de CDB es una técnica macroscópica y que la interpretación de los datos que proporciona para este dominio se hace a la luz de un modelo, el de *dos estados*, según el cual sólo existen dos *macroestados* accesibles al sistema, el nativo {N} y el desplegado {D}. Estos macroestados deben entenderse como un conjunto o colectivo de *microestados* o estados conformacionales de la proteína que podrían ser diferentes desde el punto de vista estructural, pero parecidos desde el punto de vista termodinámico, es decir, {N} y {D} son cada uno un conjunto de microestados termodinámicamente homogéneo.

Como se explica en el Apartado 4.6. de Materiales y Métodos, las medidas de intercambio H/D mediante RMN permiten obtener información termodinámica sobre la estabilidad de una proteína, pero en este caso, dicha información se encuentra enfocada sobre cada residuo de la cadena e informa exclusivamente sobre los procesos conformacionales que afectan a dicho residuo, es decir, informa sobre subconjuntos de los microestados que constituyen cada uno de los macroestados nativo y desplegado.

El problema fundamental que se plantea cuando se comparan magnitudes termodinámicas procedentes de experimentos de desplegamiento macroscópicos, como la CDB, con magnitudes termodinámicas con un carácter microscópico como las obtenidas por IHD consiste en saber qué se puede comparar. La mayor dificultad procede del hecho de que las magnitudes sobre el desplegamiento global en un experimento macroscópico se obtienen en condiciones desnaturalizantes, en las que los dos macroestados presentes son bastante homogéneos y dominan el equilibrio conformacional de la proteína. Las magnitudes termodinámicas suelen extrapolarse a

condiciones de estabilidad elevada manteniendo el modelo de dos macroestados. En estas condiciones el macroestado $\{N\}$ es, con mucho, el más poblado, mientras que el macroestado $\{U\}$ se encuentra muy poco poblado. Además el equilibrio conformacional suele ser mucho más heterogéneo que en condiciones desnaturalizantes. Se han descrito bastantes proteínas, principalmente mediante estudios de intercambio H-D, en las que existen macroestados parcialmente plegados $\{PUF\}$ claramente diferenciados de los anteriores (referencias). Sobre este tipo de estados los experimentos de desplegamiento macroscópico no suelen informar debido a su propia naturaleza, que implica una extrapolación desde condiciones desnaturalizantes (Mayne y Englander, 2000).

La constante de equilibrio de desplegamiento global, determinada por CDB, K_U , viene dada por la relación entre las poblaciones de los macroestados $\{N\}$ y $\{U\}$ (ecs. 5.1.1. y 5.1.2.):

$$K_U = \frac{\sum_{\{U\}} P_i}{\sum_{\{N\}} P_i} \quad (5.1.1.)$$

$$\Delta G_U = -RT \ln K_U \quad (5.1.2.)$$

Mientras que la constante de equilibrio aparente obtenida para el hidrógeno amida de un determinado residuo de la proteína es:

$$K_{ap,j} = \frac{\sum_{\{j,ex\}} P_i}{\sum_{\{j,nex\}} P_i} \quad (5.1.3.)$$

$$\Delta G_{ap,j} = -RT \ln K_{ap,j} \quad (5.1.4.)$$

donde $\{j,ex\}$ y $\{j,nex\}$ son los conjuntos de microestados que exponen y que no exponen el residuo j al disolvente, respectivamente.

Existen varias situaciones posibles cuando se comparan estos dos valores de energía de Gibbs observables:

a) $\Delta G_{ap,j} \approx \Delta G_U$, lo que se interpreta generalmente como:

$$\sum_{\{U\}} P_i \approx \sum_{\{j,ex\}} P_i \quad (5.1.5.)$$

$$\sum_{\{N\}} P_i \approx \sum_{\{j,nex\}} P_i \quad (5.1.6.)$$

Por tanto, $\{U\} \approx \{j,ex\}$ y $\{N\} \approx \{j,nex\}$, es decir, el proceso conformacional que conduce al intercambio H-D del residuo j se corresponde con el proceso de desplegamiento global de la proteína.

b) $\Delta G_{ap,j} < \Delta G_U$: que aparece cuando concurren cualquiera o las dos situaciones siguientes:

$$\text{b-i) } \sum_{\{j,ex\}} P_i > \sum_{\{U\}} P_i :$$

En este caso algunos microestados por lo que el residuo j intercambia con el disolvente son más probables (tienen menor energía) que los que componen el macroestado $\{U\}$, lo que se interpreta de forma que los microestados que exponen el residuo al disolvente son conformaciones parcialmente plegadas (PUF) (Bai et al., 1995) (Chamberlain et al., 1996), (Milne et al., 1999). Este escenario es el más informativo desde el punto de vista de la investigación sobre el plegamiento de las proteínas.

$$\text{b-ii) } \sum_{\{j,nex\}} P_i < \sum_{\{N\}} P_i :$$

Esto implica que parte de los microestados que componen el macroestado nativo $\{N\}$ exponen el hidrógeno amida del residuo j al disolvente. Esto puede ocurrir para residuos cuyo H amida no se encuentra implicado en un puente de hidrógeno, se encuentra parcialmente expuesto al disolvente o bien la región la proteína en la que se encuentra muestra una estabilidad marginal. De esta forma, una fluctuación local puede producir el intercambio de dicho residuo.

c) $\Delta G_{ap,j} > \Delta G_U$:

Este caso, conocido como superprotección, es relativamente raro y se ha interpretado de diversas maneras, aunque la más aceptada es la presencia de un cierto grado de protección frente al intercambio dentro el macroestado desplegado {U}, es decir, dicho macroestado está compuesto por conformaciones que pueden poseer cierta estructura residual que protege al residuo j del intercambio H-D (Grantcharova y Baker, 1997), (Neira et al., 1999).

A raíz de los resultados arrojados por los experimentos de IHD, reflejados en los valores de ΔG_{ap} , se observa cómo en las condiciones en las que se han llevado dichos experimentos, con muy pocas excepciones, prácticamente ninguno de los restos de cualquiera de las variantes del dominio estudiados requiere de un proceso de desplegamiento global para exponerse al disolvente y sufrir el fenómeno de IHD sino que éste tiene lugar por medio de estados conformacionales con energías de Gibbs menores, que indican que son fluctuaciones locales o parciales de la estructura del dominio, de manera que en estas condiciones, en las que el macroestado nativo es el más poblado, el equilibrio predominante no se establece entre los “macroestados” {N} y {D}, como considera el modelo de *dos estados*, sino que se establece entre multitud de “microestados” que presentan cambios conformacionales locales o desplegamientos parciales resultantes de la pérdida de interacciones nativas en diferentes localizaciones de la estructura de la proteína. Estos resultados obtenidos para los mutantes del dominio SH3-Spc estudiados están en perfecto acuerdo con los de otros estudios anteriores realizados con la variante natural del dominio (Sadqi et al., 1999; Sadqi et al., 2002a; Sadqi et al., 2002b).

En las gráficas representadas en la figura anterior, fig. 5.1.6, se observa asimismo que, independientemente de cuál sea la variante considerada del dominio, las zonas más flexibles de la estructura, como son los giros, lazos y extremos de la cadena, presentan valores más bajos de ΔG_{ap} , que en el caso de algunos residuos incluso no se ha podido determinar por la rapidez con la que intercambian. Por otro lado, las zonas centrales de los elementos de estructura secundaria, como las hebras β o la pequeña porción de hélice 3_{10} , se encuentran mucho más protegidas frente al IHD y presentan valores de ΔG_{ap} mayores. Se aprecia asimismo como dentro incluso de un mismo motivo de estructura secundaria, los valores de ΔG_{ap} observados no son homogéneos

sino que presentan una cierta gradación, con un máximo localizado aproximadamente en el centro de dicho motivo estructural, fenómeno que ya descrito en la literatura con el nombre de “fraying” o *deshilachamiento*, según el cual, los extremos de un elemento de estructura secundaria son menos estables que la parte central del mismo, y esto se refleja en los valores de ΔG_{ap} que se observan en este dominio.

En trabajos precedentes a éste en nuestro Grupo de Investigación, se ha estudiado la naturaleza de los estados conformacionales en los que se produce el intercambio en la variante WT del dominio SH3-Spc en condiciones nativas (Sadqi et al., 1999; Sadqi et al., 2002a; Sadqi et al., 2002b), (Sadqi, 2000) mediante el análisis termodinámico-estadístico de los efectos del pH y la temperatura sobre los valores de ΔG_{ap} obtenidos por IHD. Estos estudios han permitido la obtención de varias magnitudes termodinámicas promedio que caracterizan los estados conformacionales responsables del intercambio de cada residuo del dominio, lo que ha permitido obtener una idea de las características estructurales de dichos estados conformacionales. En la figura 5.1.7. se muestra, sobre un esquema de la estructura del dominio SH3-Spc, una representación en códigos de colores que indica el grado de distorsión estructural que, en promedio, tienen los microestados por los que se produce el IHD de cada residuo del dominio SH3-Spc (Sadqi et al., 2002b)



Fig. 5.1.7.. Representación esquemática del dominio SH3-Spc mostrando en código de colores el grado de distorsión estructural que acompaña al intercambio H-D de cada región del dominio. Colores tendiendo al azul indican residuos que requieren la pérdida de gran parte de la estructura terciaria del dominio para sufrir el IHD, mientras colores hacia el rojo indican residuos que puede sufrir IHD mediante fluctuaciones locales, que casi dejan la estructura inalterada (tomada de (Sadqi et al., 2002b)).

La figura anterior se obtuvo analizando el efecto del pH sobre el IHD del dominio. Similares conclusiones se obtienen al analizar el efecto de la temperatura, que proporciona los valores medios de la entalpía y la entropía de los microestados responsables del IHD de cada residuo (Sadqi et al., 2002a).

En general, las regiones del dominio con los valores de ΔG_{ap} más elevados suelen ser también las regiones en las que se produce una mayor distorsión estructural y mayor pérdida de interacciones concomitante con el IHD, aunque para regiones con valores de ΔG_{ap} menores no hay una correlación clara entre ΔG_{ap} y las características estructurales de los microestados en los que ocurre el IHD.

La similitud en las distribuciones de los valores de ΔG_{ap} para las diferentes variantes estudiadas en esta Memoria (Fig. 5.1.6) junto con la naturaleza conservadora de las mutaciones realizadas permiten asumir como válida la descripción anterior de la naturaleza de los estados conformacionales responsables del IHD en la variante WT para el resto de los dominios mutantes estudiados.

5.1.4.2. Efectos de las mutaciones. Cambios en el ΔG_{ap} ($\Delta\Delta G_{ap}$).

Hasta ahora se ha podido comprobar cómo las mutaciones realizadas en el dominio SH3-Spc modifican su estabilidad, en términos de ΔG_D para el desplegamiento global del mismo ($\Delta\Delta G_D$). Obviamente, debido al carácter cooperativo de las proteínas, también los valores de ΔG_{ap} para cada uno de los restos del dominio se van a ver afectados por la perturbación energética introducida por la mutación, esto es, dependiendo de que la perturbación estabilice o desestabilice al dominio, en general, los valores de ΔG_{ap} del mismo aumentarán o disminuirán, tal y como se aprecia en las gráficas de la figura anterior, fig. 5.1.6, con respecto a los de la variante natural.

Ahora bien, la cooperatividad de las proteínas, incluso cuando son pequeñas como es este caso, no es absoluta, de manera que, a pesar de que las mutaciones puntuales alteran la estabilidad de las mismas, no toda la estructura se afecta por igual, por la misma razón por la que anteriormente comentábamos que la visión del modelo de

dos estados incluso para proteínas pequeñas, es excesivamente simplista. Así pues, los resultados de los estudios de IHD indican precisamente que, debido a la multitud de microestados que la estructura de las proteínas puede adoptar, una mutación puntual afectará de manera diferenciada a cada microestado y, en consecuencia, como vamos a ver más adelante, a las distintas regiones de la estructura de las mismas.

Desde un punto de vista teórico, una mutación puntual realizada sobre una proteína, da lugar a una perturbación local en la energía, $\Delta\Delta G_{\text{local}}$. Merced al carácter cooperativo de las proteínas, esa perturbación energética se transmite al resto de la estructura produciendo finalmente un cambio en su estabilidad global, como hemos visto anteriormente. Dicho cambio se puede determinar mediante experimentos típicos de desplegamiento y se mide como un cambio en la diferencia de energía de Gibbs entre el macroestado desplegado y el macroestado nativo, $\Delta\Delta G_{\text{D}}$. Si consideramos el caso ideal de una proteína extremadamente cooperativa, $\Delta\Delta G_{\text{local}}$ y $\Delta\Delta G_{\text{D}}$ deberían coincidir bastante bien. Ahora bien, de acuerdo con los estudios de IHD la cooperatividad estructural de las proteínas no es absoluta ya que las proteínas son en realidad un colectivo de microestados en equilibrio que presentan conformaciones y estabilidades diferenciadas.

Para ilustrar las consecuencias de esta cooperatividad parcial supongamos, por ejemplo, el caso de una mutación desestabilizante localizada en un lazo flexible de una proteína. Habrá un número elevado de microestados que difieren relativamente poco en energía y que forman parte del macroestado nativo $\{N\}$, por ejemplo los etiquetados con los números del 1 al 4 en el esquema siguiente. Estos microestados podrían, por ejemplo, diferir en la conformación local del lazo flexible. La mutación en el lazo flexible desestabilizará más unas conformaciones que otras. En este ejemplo extremo, los microestados 1 y 2 aumentan su energía por la perturbación local, mientras que los microestados 3 y 4 no son afectados. Otros microestados parcialmente plegados como el etiquetado con 5, fuera del macroestado $\{N\}$, se podrían ver también afectados si la mutación cambia la energía de su conformación. De esta forma, se produce cambio en el orden de las energías de los diferentes microestados lo que produce una redistribución de poblaciones por efecto de la mutación. Debido a esta redistribución, el cambio en la

estabilidad global que se determinaría macroscópicamente sería menor que la perturbación local introducida, como se aprecia en el esquema.

Este ejemplo ilustra la plasticidad de las proteínas que, debido a su naturaleza estadística, pueden acomodar y atenuar parcialmente interacciones y perturbaciones energéticas mediante este mecanismo de redistribución de poblaciones que es en realidad una redistribución de energía. Este fenómeno lo hemos visto reflejado en el apartado 5.1.2 al comparar las predicciones teóricas para las perturbaciones energéticas locales introducidas por las mutaciones con los cambios experimentales en la estabilidad macroscópica global del dominio, determinados mediante CDB.

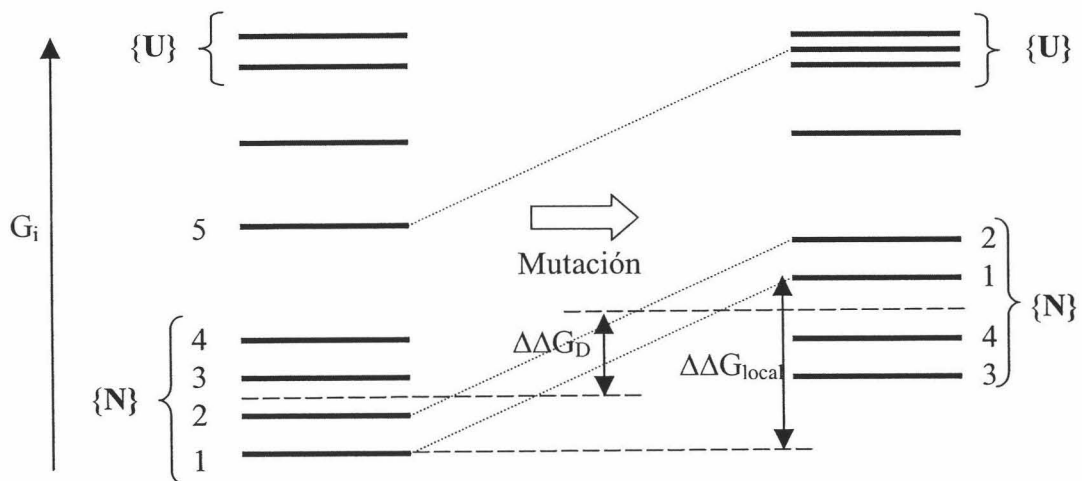


Figura 5.1.8.: Diagrama esquemático de los niveles de energía de Gibbs para el caso hipotético de una mutación sobre una zona flexible de una proteína. $\Delta\Delta G_{local}$ indica la magnitud energética de la perturbación local introducida por la mutación. $\Delta\Delta G_D$ representa la variación macroscópica en la energía de Gibbs de desplegamiento global producida por la mutación.

El efecto de una perturbación en una zona flexible, que produce una redistribución de poblaciones que atenúa la perturbación energética, está en contraposición con lo que se observa para una perturbación en una zona muy estable de la proteína, que se ilustra en el esquema siguiente. La desestabilización de la región estable afecta por igual a las energías de todos los microestados que constituyen el macroestado nativo, ya que todos ellos mantienen la región estable plegada de forma similar y sólo difieren en la conformación de las zonas flexibles menos estables. No se produce en este caso redistribución de poblaciones y la desestabilización global coincide con la desestabilización local introducida en la zona estable.

Un efecto que se deduce de estos esquemas consiste en que un cambio energético en una región flexible modifica, aunque parcialmente, la estabilidad de las regiones estables, ya que las energías de los microestados en los que estas regiones se encuentran desplegadas, por ejemplo los microestados correspondientes al macroestado desplegado $\{U\}$, cambian con respecto al macroestado nativo, cambiando por tanto su probabilidad. Por el contrario, un cambio energético en una región estable, no alteraría la estabilidad de las zonas flexibles, que mantienen la misma energía relativa con respecto al macroestado de referencia y, por tanto, las mismas probabilidades relativas.

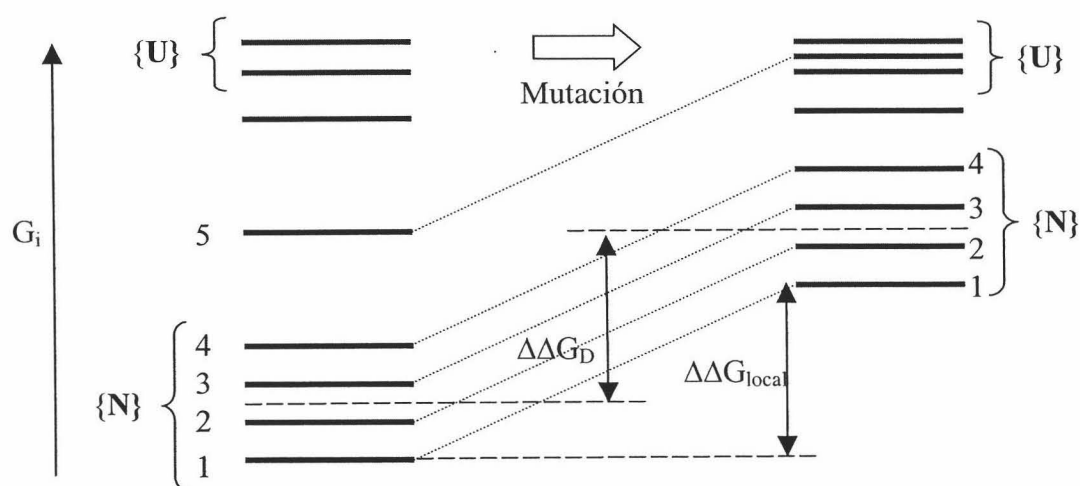


Figura 5.1.9.: Diagrama esquemático de los niveles de energía de Gibbs para el caso hipotético de una mutación sobre una zona estable de una proteína. $\Delta\Delta G_{local}$ indica la magnitud energética de la perturbación local introducida por la mutación. $\Delta\Delta G_D$ representa la variación macroscópica en la energía de Gibbs de desplegamiento global producida por la mutación.

En la discusión de los ejemplos anteriores, no se ha considerado el hecho de que un cambio energético local suele afectar a la energía en regiones alejadas, es decir, no se ha considerado la cooperatividad entre las interacciones entre diferentes regiones. En realidad, el carácter estadístico de las proteínas se encuentra “modulado” o modificado por el carácter cooperativo de sus redes de interacciones. Esta cooperatividad se manifiesta en que, por ejemplo, dos regiones A y B de una proteína, conectadas por interacciones cooperativas, tendrán relativamente mayor probabilidad de estar plegadas o desplegadas al mismo tiempo y relativamente menor probabilidad de estar plegadas o desplegadas por separado. Así, una perturbación energética local en la región A alterará de forma más significativa las probabilidades relativas de estados en los que ambas regiones se encuentran plegadas o desplegadas y, por este mecanismo, modificará la estabilidad de la región B. De esta forma la perturbación se transmite a través de la red

de interacciones de la proteína a regiones distantes en la misma. Las proteínas son, por tanto, colectivos de microestados que presentan una cooperatividad parcial.

Los estudios teóricos-experimentales pioneros sobre la transmisión de interacciones cooperativas en proteínas han sido realizados por el grupo de E. Freire de la Universidad Johns Hopkins (Baltimore, USA) (Hilser et al., 1996a; Hilser et al., 1996b), (Hilser y Freire, 1996; Hilser y Freire, 1997; Hilser et al., 1998), (Luque y Freire, 2002; Luque et al., 2002), (Freire, 1998; Freire, 1999; Freire, 2000). En estos trabajos los autores utilizan modelos teóricos simplificados para representar los múltiples estados conformacionales en que puede existir una proteína y calculan la energía de dichas conformaciones de forma semi-empírica utilizando una parametrización termodinámico-estructural de la energía de las interacciones en proteínas. De esta forma los autores interpretan de forma teórica los efectos en la estabilidad regional de las proteínas, medidos principalmente por IHD, producidos por perturbaciones energéticas locales, tales como las producidas por mutaciones puntuales conservativas, como las que se estudian en esta Memoria. No obstante, existen pocos estudios experimentales del efecto de mutaciones sobre el IHD.

Si consideramos la concepción termodinámico-estadística del IHD, es posible cuantificar experimentalmente los efectos cooperativos producidos por mutaciones puntuales. Para la variante natural (WT) de la proteína, la constante del proceso de “apertura” para la exposición de un cierto residuo j al disolvente viene dada por la ecuación siguiente, ec. 5.1.7.:

$$K_{op,j}^{WT} = \frac{\sum_{i(j-ex)} e^{-\Delta G_i^{WT}/RT}}{\sum_{i(j-nex)} e^{-\Delta G_i^{WT}/RT}} \quad (5.1.7.)$$

Cuando se realiza una mutación puntual sobre la proteína, cada uno de los estados del colectivo de conformaciones de la proteína se verá afectado por la mutación a través de un cambio en su energía de Gibbs, relativa a la del estado nativo de la proteína, tal y como se expresa en la ecuación siguiente, ec. 5.1.8..

$$\Delta\Delta G_i = \Delta G_i^{MUT} - \Delta G_i^{WT} \quad (5.1.8)$$

Según esto, la constante de apertura, K_{ap} , de un residuo j para la proteína mutante, viene dada por:

$$K_{ap,j}^{MUT} = \frac{\sum_{i(j-ex)} \left(e^{-\Delta G_i^{WT}/RT} \cdot e^{-\Delta\Delta G_i/RT} \right)}{\sum_{i(j-nex)} \left(e^{-\Delta G_i^{WT}/RT} \cdot e^{-\Delta\Delta G_i/RT} \right)} \quad (5.1.9)$$

Y si ahora se divide miembro a miembro las ecuaciones 5.1.9. y 5.1.7., se obtiene que:

$$\frac{K_{ap,j}^{MUT}}{K_{ap,j}^{WT}} = \frac{\frac{\sum_{i(j-ex)} \left(e^{-\Delta G_i^{WT}/RT} \cdot e^{-\Delta\Delta G_i/RT} \right)}{\sum_{i(j-ex)} e^{-\Delta G_i^{WT}/RT}}}{\frac{\sum_{i(j-nex)} \left(e^{-\Delta G_i^{WT}/RT} \cdot e^{-\Delta\Delta G_i/RT} \right)}{\sum_{i(j-nex)} e^{-\Delta G_i^{WT}/RT}}} \quad (5.1.10)$$

Al término exponencial en $\Delta\Delta G_i$ lo denominaremos como “parámetro de cooperatividad”, así:

$$\phi_i^{MUT} = e^{-\Delta\Delta G_i/RT} \quad (5.1.11.)$$

El *parámetro de cooperatividad*, ϕ_i^{MUT} , es una medida de la magnitud en que el peso estadístico de cada estado conformacional de la proteína se ve afectado por la mutación. Este parámetro contiene la información sobre la transmisión cooperativa de energía provocadas por la mutación a cada uno de los microestados del sistema, y no es accesible experimentalmente de forma directa.

Si ahora tomamos logaritmos naturales en ambos miembros de la ecuación 5.1.10. y multiplicamos por $-RT$ nos queda finalmente la ecuación siguiente, ec. 5.1.12.:

$$\begin{aligned} \Delta\Delta G_{ap,j} &= \Delta G_{ap,j}^{MUT} - \Delta G_{ap,j}^{WT} = -RT \ln \left(\frac{K_{ap,j}^{MUT}}{K_{ap,j}^{WT}} \right) \\ &= -RT \ln \left[\frac{\frac{\sum_{i(j-ex)} \left(e^{-\Delta G_i^{WT}/RT} \cdot \phi_i^{mut} \right)}{\sum_{i(j-ex)} e^{-\Delta G_i^{WT}/RT}}}{\frac{\sum_{i(j-nex)} \left(e^{-\Delta G_i^{WT}/RT} \cdot \phi_i^{mut} \right)}{\sum_{i(j-nex)} e^{-\Delta G_i^{WT}/RT}}} \right] = -RT \ln \frac{\langle \phi \rangle_{j-ex}^{mut}}{\langle \phi \rangle_{j-nex}^{mut}} \quad (5.1.12.) \\ &= -RT \ln \langle \phi \rangle_{ex,j}^{mut} \end{aligned}$$

En esta ecuación se puede definir un “parámetro de cooperatividad medio” de todos los estados que exponen el residuo j al disolvente para una mutación determinada, $\langle \phi \rangle_{j-ex}^{mut}$, y el correspondiente para los estados que no exponen dicho residuo j al disolvente, $\langle \phi \rangle_{j-nex}^{mut}$. Por otro lado, el término $\langle \phi \rangle_{ex,j}^{mut}$ es el factor de cooperatividad medio relativo de los estados que exponen el residuo j al disolvente respecto de los que no lo exponen, por efecto de la mutación producida.

De este modo, el resultado fundamental de asociar los estudios de IHD a las técnicas de mutagénesis dirigida, es que el valor del cambio en energía libre de Gibbs que se mide por IHD para cada residuo de la proteína, $\Delta\Delta G_{ap}$, otorga información sobre la medida en que la perturbación energética local provocada por la mutación realizada sobre la proteína, se extiende al resto de la misma, estabilizando o desestabilizando, por término medio, el conjunto de los microestados que exponen al disolvente cada uno de los residuos. Por esta razón ese *factor de cooperatividad medio* informa del grado medio de conexión o cooperatividad existente entre el punto en el que se ha realizado la mutación y cada uno de los demás residuos de la proteína.

En la figura siguiente, fig. 5.1.10., se han representado el cambio en ΔG_{ap} ($\Delta\Delta G_{ap}$) para los diferentes residuos de cada una de las variantes del dominio SH3-Spc en estudio, con relación a los de la forma natural del dominio, considerada como referencia. Los valores de $\Delta\Delta G_{ap}$ se han determinado como diferencia entre los valores de ΔG_{ap} de cada mutante y los correspondientes a la forma natural (WT) de la proteína. Asimismo se han representado los valores de $\Delta\Delta G_D$ para el desplegamiento global del dominio, determinados a partir de los experimentos de CDB (ver apartado 5.1.2).

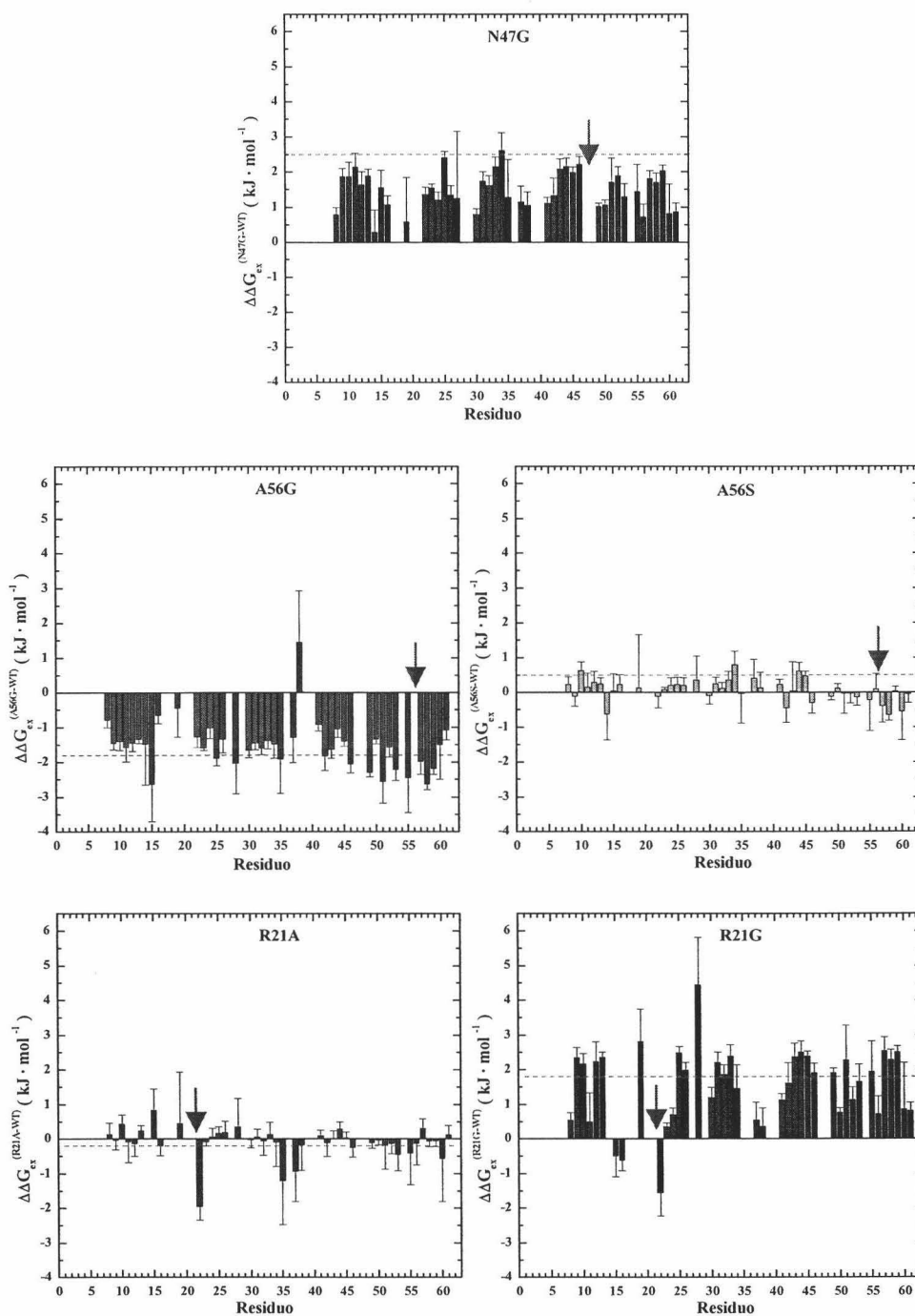


Fig. 5.1.10. Cambios en la ΔG_{ap} ($\Delta\Delta G_{ap}$) por residuo, obtenidos por comparación de los valores de ΔG_{ap} de cada mutante del dominio con los de la forma natural (WT) del mismo, esto es, $\Delta\Delta G_{ap} = \Delta G_{ap}^{MUT} - \Delta G_{ap}^{WT}$. Las barras representan los valores de $\Delta\Delta G_{ap}$ determinadas de esa manera y las barras de error se han determinado como suma de los errores de ΔG_{ap}^{MUT} y ΔG_{ap}^{WT} . También se han incluido los valores de $\Delta\Delta G_D$ a 25°C (líneas rojas discontinuas) obtenidos para el desplegamiento global de cada variante del dominio, por CDB (ver apartado 5.1.2) aunque en este caso no se han incluido sus intervalos de error. No se han incluido los valores de $\Delta\Delta G_{ap}$ para el mutante N47A dado que no se ha podido seguir su IHD en las condiciones experimentales elegida; su $\Delta\Delta G_D$ a 25°C, para el desplegamiento global es de $-1.6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Las flechas rojas indican la posición de la mutación realizada en cada caso.

De acuerdo con lo que ya se estableció cuando se estudiaron los cambios en los desplazamientos químicos de los picos de cruce $\text{CH}_\alpha\text{-NH}$ de cada mutante del dominio con respecto a la forma natural del mismo, los cambios estructurales inducidos por las mutaciones son mínimos. Este hecho se corrobora posteriormente para algunos de los mutantes en los resultados derivados de un análisis más profundo de sus estructuras tridimensionales obtenidas por difracción de rayos X.

No obstante, a pesar del efecto reducido de las mutaciones sobre la estructura del dominio, los datos de la Figura 5.1.7 indican claramente que el dominio SH3-Spc presenta una cooperatividad elevada, esencialmente debido a su pequeño tamaño y estabilidad reducida (Hilser et al., 1998). Los cambios energéticos producidos por las mutaciones introducidas se transmiten en mayor o menor medida a prácticamente todas las zonas del dominio. En general, las mutaciones que producen mayores cambios en la estabilidad global (N47G, A56G y R21G) producen también cambios de magnitud similar en la estabilidad local en residuos cuyos hidrógenos amida se encuentran formando puentes de hidrógeno en las partes centrales de los elementos de estructura secundaria (láminas β y hélice 3_{10}).

En residuos localizados en lazos, giros o extremos de las estructuras secundarias, o bien que no están protegidos por puentes de hidrógeno, presentan efectos más variables aunque en general menores. Así, por ejemplo, en cualquiera de las tres mutaciones los restos L8, Q16, T37, W41, Q50, A56, K60 y L61, situados en extremos de hebras β , o en lazos flexibles, muestran cambios en estabilidad parciales, aunque del mismo signo, en comparación con el cambio global inducido por la mutación. Otros residuos, también situados en regiones más flexibles, presentan efectos más variables dependiendo de la mutación concreta.

Mayor detalle sobre la transmisión cooperativa de estabilidad a través de la estructura del dominio se puede apreciar en la Figura 5.1.11., donde se han representado los valores de $\Delta\Delta G_{\text{ap}}$ para cada mutación en código de colores sobre representaciones esquemáticas de la estructura tridimensional del dominio SH3-Spc.

Como se ha mencionado anteriormente en el apartado 5.1.1, las mutaciones realizadas se localizan en tres regiones claramente diferentes desde el punto de vista del plegamiento y la estabilidad del dominio SH3-Spc. La posición 47 se encuentra en un giro bastante rígido, con una tensión estructural elevada, cuya formación al menos parcial parece ser un paso obligatorio en el plegamiento de este dominio (Martinez et al., 1998; Martinez y Serrano, 1999), (Vega et al., 2000).

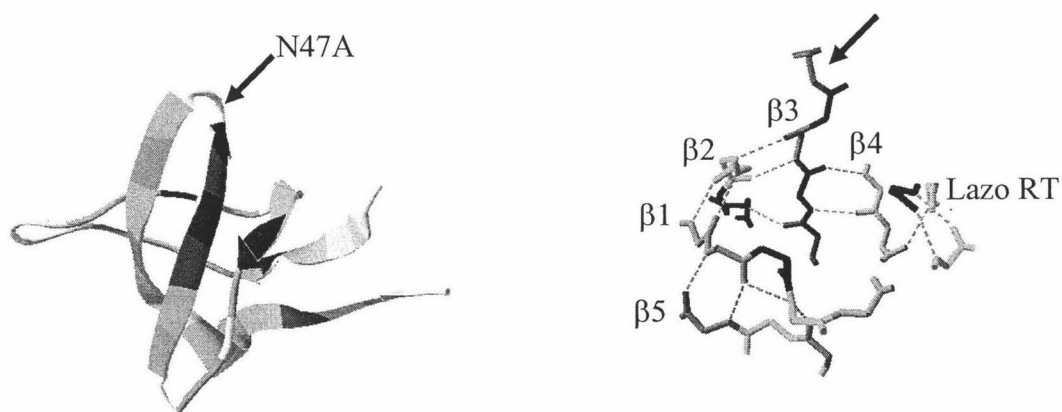


Fig. 5.1.11.: Representación de la transmisión de cooperatividad en el dominio SH3 de α -espectrina al mutar la asparagina en posición 47 por alanina. Se indica en código de color (ver texto) el valor de $\Delta\Delta G_{ap}$ por residuo, sobre la estructura tridimensional de la forma natural, WT (código 1shg).

La estabilización del giro por la mutación N47G se transmite cooperativamente de forma muy eficiente a lo largo de la hebra $\beta 3$ adyacente y de ésta a parte de las hebras β complementarias (restos en rojo, naranja y amarillo). También hay una transmisión eficiente a algunos restos de las otras dos hebras β y a restos en la parte intermedia del largo lazo RT, que presenta un segmento corto de lámina β (Tyr15 y Met25). Es interesante hacer notar que prácticamente todos los restos con cooperatividad elevada con la posición 47 se encuentran conectados por una red de puentes de hidrógeno, lo que sugiere que la formación cooperativa de estos puentes podría ser el mecanismo principal para la transmisión de estabilidad. No obstante, entre los residuos que presentan mayor cooperatividad se encuentran Ala11, Met25, Val44, y Val58, que forman parte del *core* hidrofóbico del dominio, lo que sugiere también la participación de este tipo de interacciones en la transmisión cooperativa de estabilidad para esta mutación. Es llamativo que la estabilidad se transmite de forma claramente menos eficiente a buena parte de la hebra $\beta 4$, adyacente al giro distal, y a parte de la

hélice 3₁₀, ambos considerados parte del núcleo de plegamiento del dominio. Esto indica que la estructura del dominio SH3-Spc no es totalmente cooperativa, sino que muestra un carácter estadístico acentuado que le confiere plasticidad. Los valores de $\Delta\Delta G_{ap}$ más bajos, aunque aún significativos, ocurren en las zonas menos estables, lo que está de acuerdo con la discusión anterior sobre el carácter estadístico de las proteínas, que predice que un cambio energético en una zona estable del dominio se transmite de forma poco eficiente a las zonas menos estables. En cualquier caso, la cooperatividad general del dominio es elevada, como lo demuestra el hecho de que los valores de $\Delta\Delta G_{ap}$ son considerables en gran parte de la estructura del dominio.

En el caso de la mutación en posición 56, el cambio energético producido en la cara expuesta al disolvente de la hélice 3₁₀ se transmite de manera muy acusada a los elementos de estructura secundaria a lo largo de la cadena (hélice 3₁₀ y hebras β 4 y β 5). También hay valores altos de $\Delta\Delta G_{ap}$ en algunos restos del lazo RT, de nuevo Tyr15 y Met25, así como en el llamado *giro divergente*, especialmente Gly28. Algo menos de cooperatividad ocurre en las otras hebras β . Es notorio que los efectos de la mutación en posición 56 son diferentes aunque en cierto modo complementarios de los producidos por la mutación en posición 47. Igual que en ésta, el cambio en estabilidad de una zona bastante estable, como la hélice 3₁₀, se transmite de forma poco eficiente a las zonas menos estables, como los lazos RT, n-Src y los extremos de la cadena.

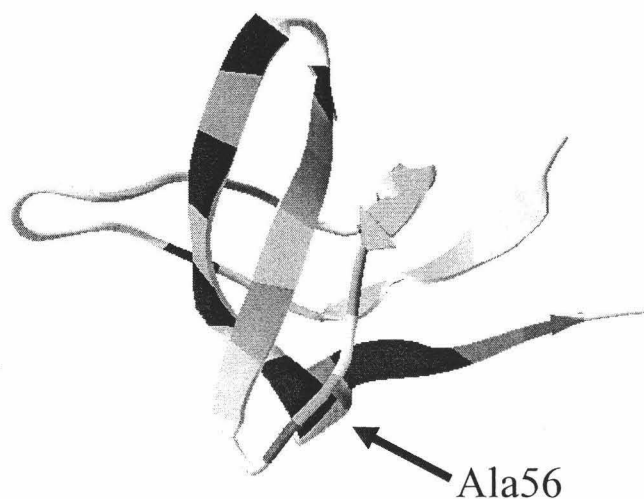


Fig. 5.1.12.: Representación de la transmisión de cooperatividad en el dominio SH3 de α -espectrina al mutar la alanina en posición 56. Se indica en código de color (ver texto) el valor de $\Delta\Delta G_{ap}$ por residuo, sobre la estructura tridimensional de la forma natural, WT (código 1shg).

Un efecto interesante es el que se observa en Asn38 en el lazo n-Src, cuyo $\Delta\Delta G_{ap}$ es positivo, en contraposición al efecto global desestabilizante producido por la mutación A56G. Inspección de la estructura tridimensional del dominio SH3-Spc revela que el hidrógeno amida de este resto está oculto del disolvente aunque no está implicado en ningún puente de hidrógeno. Aunque su energía de Gibbs de intercambio, ΔG_{ap} , es elevada para todos los mutantes estudiados, los procesos conformacionales que producen el IHD en el lazo n-Src son de carácter local o regional, como se deduce de estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo (Sadqi et al., 2002a; Sadqi et al., 2002b). Una posible explicación a este efecto es que la mutación desestabilizante en la hélice 3₁₀, la cual presenta algunos contactos con el lazo n-Src que está contiguo en la estructura del dominio, pudiera producir una redistribución en las poblaciones de los microestados que protegen y que exponen el resto Asn38, favoreciendo la población de conformaciones que protegen eficientemente este resto del IHD.

La situación sería parecida a la ilustrada en el esquema 1 de la figura 5.1.11.. Dado que el resto Asn38 intercambia mediante microestados local o regionalmente desplegados, que muy posiblemente mantienen plegada la hélice 3₁₀, como podría ser, por ejemplo, el etiquetado con el número 5 en el esquema, este tipo de microestados ven aumentada su energía por la mutación desestabilizante, mientras que el conjunto de microestados que mantienen Asn38 protegido del intercambio (microestados 1-4) cambia menos su energía. De esta forma, el valor de ΔG_{ap} aumenta debido a la redistribución de poblaciones, en lugar de disminuir por el efecto global desestabilizante. Este mecanismo de redistribución de poblaciones ha sido propuesto por el grupo de Ernesto Freire como la base del alosterismo en proteínas (Freire, 1998), (Freire, 1999), (Freire, 2000). Es importante resaltar que un efecto anticooperativo como el que se observa en Asn38 sólo es posible si el resto se encuentra en una región poco estable, que puede desplegarse de forma local o regional, ya que de otra forma no se produciría la redistribución de poblaciones entre los conjuntos de microestados que exponen y ocultan al residuo del disolvente.

El caso de la mutación en posición 21 es diferente a los anteriores ya que se realiza en una región poco estable del dominio, en el extremo del lazo RT. El efecto estabilizante producido por la mutación a glicina se transmite eficientemente a las

regiones estables del dominio, como ya se ha discutido con anterioridad. Las zonas de mayor cooperatividad con esta mutación coinciden en buena medida con las zonas centrales de los elementos de estructura secundaria, como se observó para la mutación N47G, incluyendo principalmente gran parte de la hebra β_3 , la hélice 3_{10} y el principio de la hebra β_5 , además de algunos restos de las otras hebras β y el resto Met25. Las zonas con menor cooperatividad son, de nuevo, el resto de las regiones flexibles, igual que en las mutaciones discutidas con anterioridad.

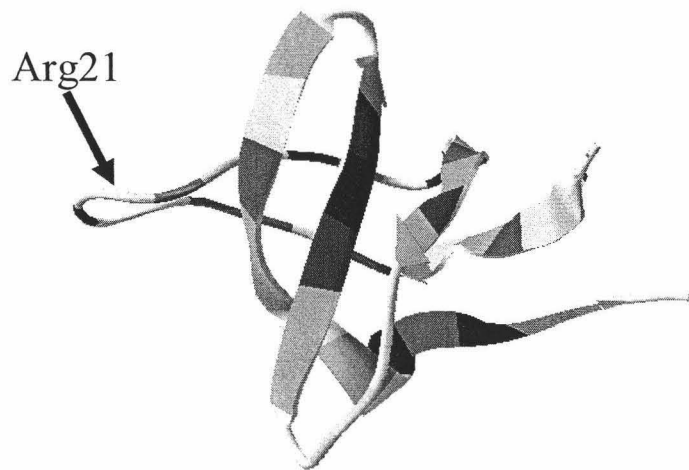


Fig. 5.1.13.: Representación de la transmisión de cooperatividad en el dominio SH3 de α -espectrina al mutar la alanina en posición 21. Se indica en código de color (ver texto) el valor de $\Delta\Delta G_{ap}$ por residuo, sobre la estructura tridimensional de la forma natural, WT (código 1shg).

En el caso de esta mutación hay dos efectos de interés, que se aprecian en la Figura 5.1.7 y 5.1.13. Por un lado la gran estabilización del resto Gly28 en el llamado giro divergente, al final del largo lazo RT, cuyo $\Delta\Delta G_{ap}$ es claramente superior a la estabilización global del dominio provocada por la mutación, es decir, el resto Gly28 muestra supercooperatividad con la posición de la mutación.

El hidrógeno amida de Gly28 se encuentra protegido del intercambio por un puente de hidrógeno con el grupo carbonilo de Ala11. El elevado valor de $\Delta\Delta G_{ap}$ hace suponer que la mutación en posición 21 produce una disminución acusada en la energía de ciertos microestados o conformaciones en los que se produce un refuerzo de esta interacción, mientras que los microestados en los que se rompe esta interacción y el

hidrógeno amida es expuesto al disolvente son selectivamente desestabilizados, disminuyendo su población relativa. De esta forma el valor de $\Delta\Delta G_{ap}$ supera al de $\Delta\Delta G_D$. Curiosamente, el valor de $\Delta\Delta G_{ap}$ del hidrógeno amida de Ala11, protegido por el carbonilo de Asp29, es particularmente bajo, en contraste con lo que se observa en otras mutaciones y a pesar de que este resto se encuentra en una de las zonas más estables del dominio. Mientras que la energía de Gibbs de intercambio, ΔG_{ap} , de estos dos restos es diferente en la variante WT del dominio, lo que indica que intercambian en conjuntos de microestados diferentes (Figura 5.1.6), en el mutante R21G los valores de ΔG_{ap} pasan a ser iguales, sugiriendo que la exposición al disolvente de estos dos restos pasa a ser controlada por el mismo conjunto de microestados, es decir, se hace cooperativa.

Por tanto, aunque en esta región del dominio no se aprecian cambios estructurales significativos, la mutación parece favorecer cambios bien diferenciados en las energías de los microestados que protegen cada uno de estos residuos produciendo, de nuevo, la redistribución de sus poblaciones.

El otro efecto interesante consiste en los valores negativos de $\Delta\Delta G_{ap}$ para Tyr15, Gln16, y Glu22, en el lazo RT relativamente cercanos a la posición de mutación. De nuevo, este efecto anticooperativo tiene su explicación en una redistribución de las poblaciones de microestados dentro del macroestados nativo, que desfavorece las conformaciones que protegen a estos residuos favoreciendo aquellas en las que estos restos intercambian. Este efecto podría estar relacionado con el posible cambio en la conformación del giro β en el extremo del lazo RT, que pasaría de tipo I a II, como se ha discutido anteriormente. Este cambio conformacional podría producir una reorganización sutil de contactos que se transmitiría a lo largo del lazo RT hasta los restos Gly28 y Ala11, dando lugar a los efectos observados. Desafortunadamente no disponemos de la estructura del mutante R21G que confirme dicho cambio conformacional.

En los otros dos mutantes estudiados por IHD, A56S y R21A, los cambios en ΔG_{ap} son pequeños, tal como era de esperar según los pequeños cambios en estabilidad producidos por estas mutaciones. Hay algunas excepciones claras para ciertos restos en

el mutante R21A, como Glu22, Asn35 o Thr37, y algo menos evidentes en el mutante A56S, como Leu34 o Val44, por citar algunos ejemplos.

Es interesante que los valores de $\Delta\Delta G_{ap}$ no siempre tienen el mismo signo que el cambio en la energía de Gibbs de desplegamiento global, $\Delta\Delta G_D$, para cada mutación, lo que indica que en estas mutaciones producen también cambios energéticos selectivos en los diferentes microestados del dominio y, consecuentemente, una cierta redistribución en sus poblaciones relativas. A modo de ejemplo se puede observar una tendencia de la mutación A56S a desestabilizar de forma selectiva, aunque ligera, la hélice 3_{10} y la hebra β_5 , en la parte final de la cadena, mientras que el resto de las regiones del dominio, son preferentemente estabilizadas, lo que finalmente redonda en una estabilización global ligera.

En el caso de la mutación R21A ocurre algo similar, aunque los efectos son más localizados, con una desestabilización acusada de ciertas regiones como el lazo n-Src (restos 35-38) y una parte del lazo RT (Glu22), que dominan sobre la pequeña estabilización de otra zona del lazo RT (Tyr15) y otros efectos menores, con el resultado de una ligera desestabilización global.

Estos dos ejemplos ilustran el carácter de las proteínas como colectivos estadísticos de estados conformacionales diferentes que presentan estabilidades diversas y que confieren una marcada plasticidad a la estructura proteica.

Mención especial merece la comparación entre parejas de variantes en las que la modificación se centra en un cambio **alanina-glicina**, ya que permite observar el efecto producido por la existencia o no de un C_β en la posición considerada. La mutación Ala-Gly en posición 56 ya se ha discutido con anterioridad ya que la variante WT contiene alanina precisamente en esa posición.

En la figura siguiente, fig. 5.1.8, se muestran los valores de $\Delta\Delta G_{ap}$ que se obtienen cuando se comparan las variantes con alanina o glicina en posición 21.

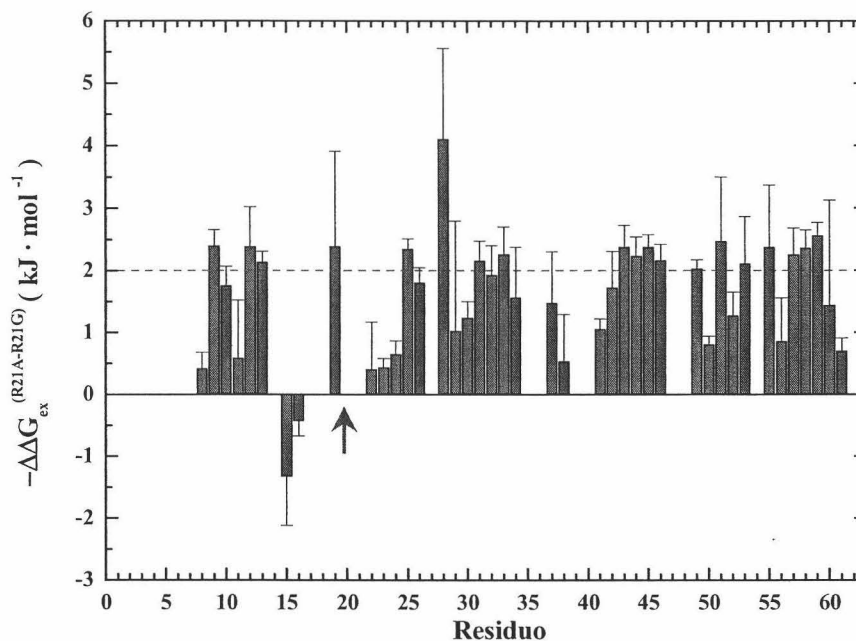


Fig. 5.1.8. Cambios en ΔG_{ap} ($\Delta\Delta G_{ap}^{A/G}$) producidos por la presencia de un C_{β} en la posición considerada (posición 21), obtenidos por comparación de los ΔG_{ap} de la variante con alanina en dicha posición con la variante con glicina. Además de los valores de $\Delta\Delta G_{ap}^{A/G}$ se han incluido los valores de $\Delta\Delta G_D^{A/G}$ (líneas rojas discontinuas) obtenidos mediante una comparación análoga a la realizada con los $\Delta\Delta G_{ap}$, pero con los valores de ΔG_D obtenidos por DSC. La flecha roja indica la posición de la mutación.

En la gráfica anterior, fig. 5.1.8, se puede observar cómo el efecto de eliminar el C_{β} en la posición 21, supone un efecto similar en los diferentes elementos de estructura secundaria definida del dominio, como son las láminas β o la hélice 3_{10} y además, los valores de $\Delta\Delta G_{ap}^{A/G}$, obtenidos mediante estudios de IHD son prácticamente iguales a los $\Delta\Delta G_D^{A/G}$ obtenidos por CDB, salvo para ciertos restos contados, como pueden ser la Gly 28 o la Asn 38, de manera que podemos ver que existe un buen acuerdo entre los resultados arrojados por las dos técnicas, CDB e IHD.

Lo más llamativo de la gráfica anterior cuando se compara con la gráfica correspondiente a la pareja de variantes WT y R21G, en la Figura 5.1.7, es que se incrementan los valores de $\Delta\Delta G_{ap}$ para los restos del lazo n-Src y desaparece el efecto anticooperativo para Glu22, cuyo valor de $\Delta\Delta G_{ap}$ pasa a ser ligeramente positivo. Esto indica que la eliminación de la cadena lateral de Arg21 cargada positivamente, presente en WT, tiene una influencia desestabilizante en Glu22 contiguo y en el lazo n-Src, como ya se apreció en la Figura 5.1.6 al comparar la variante WT con el mutante R21A.

5.1.5. Determinación y cálculos basados en las estructuras del dominio SH3 natural y de los mutantes en posición 47 y 56.

5.1.5.1. Determinación de las estructuras de los mutantes.

A continuación se describen las condiciones y los procedimientos empleados para la cristalización y en la resolución de las estructuras de los mutantes en posición 47 y en posición 56 del dominio SH3-Spc que se han estudiado en esta memoria, a saber, N47A y N47G (Vega et al., 2000) por un lado y A56G y A56S por otro. Tanto la cristalización de los cuatro mutantes como la determinación de la estructura fueron realizadas por la Dra. Cristina Vega, del laboratorio del Dr. Luis Serrano en el E.M.B.L. (Heidelberg, Alemania).

Los cuatro mutantes fueron cristalizados empleando el método de difusión de vapor en gota colgante, de forma similar a como ya se había realizado con la forma natural, WT, del dominio (Musacchio et al., 1992). Los cristales presentaban un aspecto de prisma rectangular y en todos los casos resultaron ser muy sensibles a cualquier tipo de manipulación bajo el haz de nitrógeno (se empleó el sistema de enfriamiento de *Oxford Cryosystems*), el cual se equilibró a 100K de temperatura. El crioprotector más conveniente resultó ser el glicerol a una concentración del 10% sobre la disolución de depósito. El crecimiento de los cristales en todos los casos se situó dentro de un periodo de tiempo comprendido entre tres y siete días.

Los patrones de difracción de los mutantes en posición 47 se recogieron en el sincrotrón de Hamburgo (Alemania) en el anillo DORYS de almacenamiento y difractaron a 2Å , se procesaron con DENZO y escalados y fusionados con SCALEPACK (Otwinosky, 1993) completándose hasta un 75% total de datos para el mutante N47G y del 93% para el mutante N47A. En ambos casos se emplearon las coordenadas de la forma natural, WT, del dominio (código PDB: 1shg, (Musacchio et al., 1992)) como modelo de partida para la determinación de la estructura usando el programa AMoRe (Navaza, 1994). La solución final de ambos mutantes se encontró empleando la F_{obs} entre 12 y 2.5Å y presenta un coeficiente de correlación de 0.69 para

el mutante N47G y de 0.59 para el N47A. Los factores-R fueron de 0.40 en ambos casos. El refinamiento se llevó a cabo con el programa X-PLOR (Brünger, 1992b; Brünger, 1992a). Durante el refinamiento, los mapas de densidad electrónica se visualizaron con el programa de gráficos TURBO (Cambillau y Horjales, 1987). Ambas estructuras se depositaron en el Banco de Datos de Proteínas (PDB) con códigos 1qkw, para el N47G y 1qkx para el N47A (Vega et al., 2000).

Por su parte, los difractogramas de los mutantes en posición 56 se recogieron en intervalos de 1° en un ánodo rotante Siemens MacScience MX18 a una longitud de onda de 1.5418Å. Se empleó un image-plate de *MarResearch GmbH* como detector y ambos mutantes difractaron a 3Å. Los datos del mutante A56G fueron procesados con el programa *Mosflm* (Leslie, 1992) y escalados con SCALA (Evans, 1993) mientras que los del mutante A56S se procesaron con DENZO y se escalaron con SCALEPACK (Otwinosky, 1993) completándose en este caso el 91% de los datos para el mutante A56G y el 92% para el A56S. También el caso de estos mutantes la resolución de la estructura se realizó con el programa AMoRe (Navaza, 1994) por reemplazo molecular usando como modelo la estructura de la forma natural del dominio (1shg) (Musacchio et al., 1992). El refinamiento final se llevó a cabo con el programa CNS (Brunger et al., 1998), con posterior corrección manual del modelo propuesto usando el programa TURBO-FRODO (Cambillau y Horjales, 1987) para representar el mapa de densidad electrónica. El factor R final fue de 23.8 para el mutante A56G y de 23.4 para el A56S. Ninguna de las dos estructuras de los mutantes en posición 56 ha sido aún depositada en el PDB.

En los cuatro mutantes cuya estructura se encuentra resuelta, se confirma el mantenimiento del plegamiento del dominio SH3 con respecto a la forma natural del mismo.

5.1.5.2. Superposición de estructuras. Desviación cuadrática media del esqueleto polipeptídico.

En una primera aproximación al estudio de los posibles cambios estructurales producidos por las mutaciones realizadas, hemos llevado a cabo la superposición de los esqueletos polipeptídicos de cada una de las formas mutadas con el esqueleto de la

forma natural del dominio SH3-Spc. Entendemos, como es frecuente, por superposición al proceso de minimización de la desviación cuadrática media de los átomos del esqueleto. En la figura 5.1.9. se muestran las superposiciones resultantes y en la siguiente tabla se recogen los valores RMS correspondientes:

Tabla 5.1.2.. Valores RMS de la superposición del esqueleto de SH3 WT de α -espectrina con los mutantes estudiados.

FORMAS SUPERPUESTAS	VALORES RMS (Å)
SH3 WT y N47A	0,2340
SH3 WT y N47G	0,2768
SH3 WT y A56S	0,1974
SH3 WT y A56G	0,4371

El valor RMSD promedio de las cuatro superposiciones es 0.2863 Å. La superposición del dominio SH3_WT de espectrina con el de abl (resultado no mostrado en la figura 5.1.9.) presenta un valor RMSD de 3.7089.

Estos resultados indican que ninguna de las cuatro mutaciones realizadas introducen cambios estructurales importantes y que los pequeños cambios conformacionales tienen un alcance espacial limitado. Para analizar estos cambios se han calculado la distancia entre los correspondientes C α de cada par de moléculas SH3WT-Mutante, después de realizar la superposición. Los resultados se muestran en la figura 5.1.10. (panel superior). En las tres formas mutadas N47A, N47G y A56S las distancias C α - C α de la mayoría de los restos aminoácidos están por debajo de 0,4 Å, y solamente los restos próximos al resto mutado sobrepasa ligeramente este umbral.

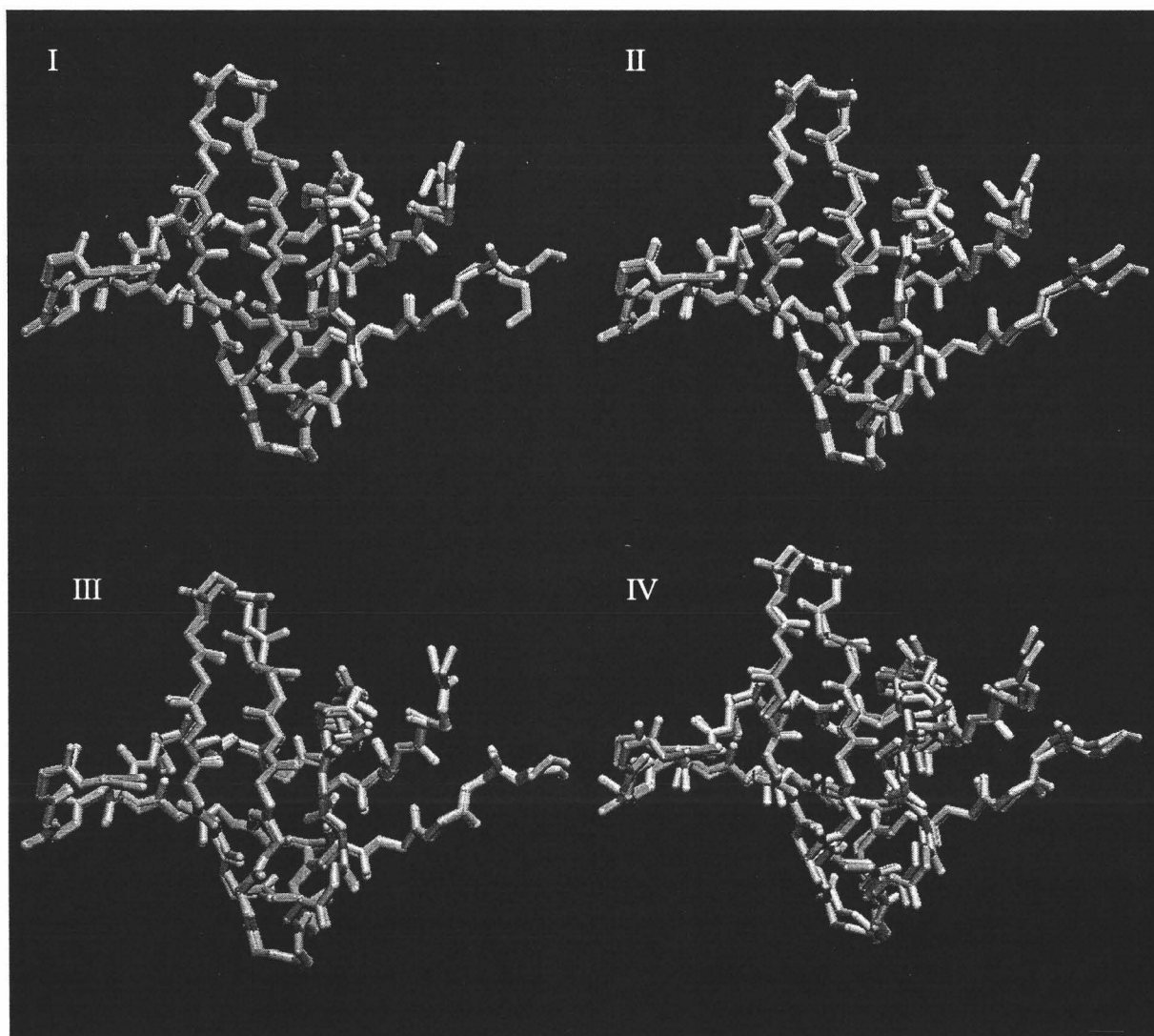


Fig. 5.1.9.: Superposición del esqueleto polipeptídico de la forma natural, WT, del dominio (color azul) con los mutantes N47A (I), N47G (II), A56S(III) y A56G(IV) (color rosa).

La forma mutada A56G presenta distancias algo mayores a lo largo de toda la cadena, lo que parece indicar una resolución de la estructura menos precisa, pero que en todo caso no sobrepasan el umbral de 1 Å. Si tenemos en cuenta que la resolución de la estructura cristalina de estas moléculas es de 1.8-2.0 Å, podemos afirmar que las mutaciones no introducen cambios estructurales importantes del esqueleto polipeptídico del dominio SH3.

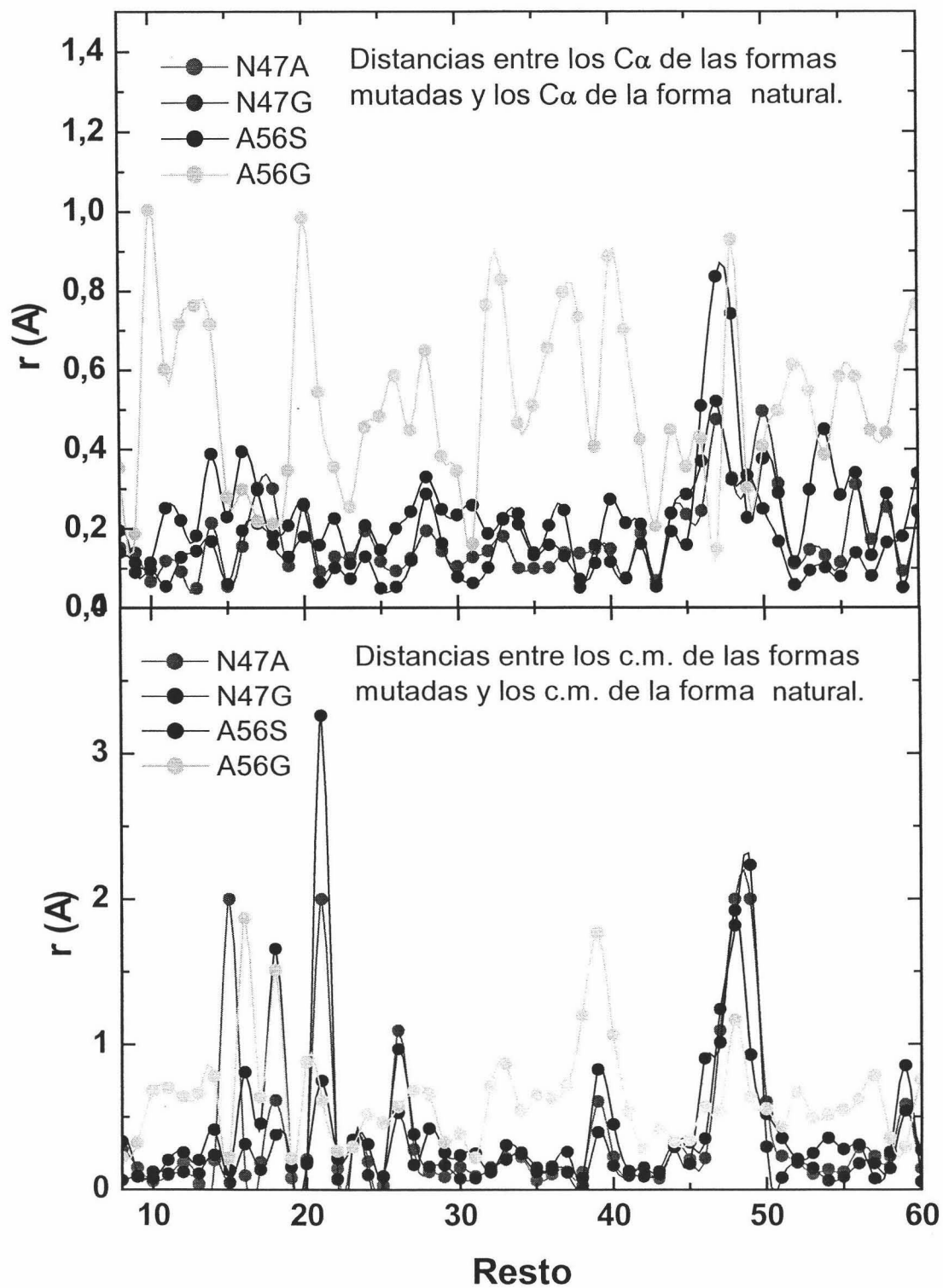


Fig. 5.1.10.. **Arriba:** distancias entre los C α de las formas mutadas y los correspondientes C α de la forma silvestre, resultantes en la superposición de los respectivos esqueletos. **Abajo:** distancias entre los centros de masas de los correspondientes aminoácidos de las formas mutadas y la forma silvestre. Las líneas son el resultado de aplicar "Splines" cúbicos a los puntos obtenidos.

Aunque la estructura del esqueleto se conserve ampliamente, las mutaciones pueden introducir cambios de orientación en las cadenas laterales que modifiquen las interacciones intramoleculares y por consiguiente a la estabilidad de la molécula. Para estimar el alcance de estos cambios hemos calculado las distancias entre los centros de masas (c.m.) de los correspondientes aminoácidos para cada par de formas superpuestas. Los resultados de estos cálculos, mostrados en el panel inferior de la figura 5.1.10., indican que los cambios más notables se dan en las regiones del giro distal y en el lazo RT; no obstante las distancias de los centros de masas caen, con pocas excepciones, por debajo de 2 Å, indicando que, en general, los cambios de orientación de las cadenas laterales en las especies mutadas no son importantes.

5.1.5.3. Contactos atómicos en las diferentes variantes del dominio SH3-Spc.

Como se explica en el apartado de Materiales y métodos se han calculado los contactos atómicos para la forma natural del dominio SH3 y los mutantes en las posiciones 47 y 56. Estos contactos se definen como pares de átomos cuyos núcleos están a una determinada distancia, normalmente suma de los radios de van der Waals de ambos átomos. En este trabajo se han analizado los contactos para esta distancia y se extiende el estudio a contactos 0,5 y 1,0 Å superiores a dicha distancia.

En la figura 5.1.11. se muestran dos representaciones tridimensionales de contactos atómicos entre restos de la forma natural del dominio SH3 de α -espectrina. En el panel superior de esta figura se representan los contactos definidos como suma de los radios de van der Waals (r_{vdw}), y en el panel inferior los contactos ampliando la distancia a los radios de van der Waals + 0,5 Å. En ambos casos se han excluido los obvios contactos entre restos vecinos en la secuencia.

Para analizar los contactos atómicos de una proteína es más útil y frecuente el uso de mapas bidimensionales, donde las coordenadas vertical y horizontal son los índices de la secuencia de aminoácidos y el número de contactos atómicos que establece cada aminoácido se representa por un “punto” escalado con una gama policromática o de tonalidades grises. Se han calculado estos mapas de contacto para la forma natural del dominio SH3 de Espectrina, para distancias sumas de los radios de van der Waals y

hasta 1 Å superiores a éstas, encontrándose un lógico aumento en el número de contacto pero apareciendo en las mismas regiones. Así en la figura 5.1.12. hemos representado estos mapas de contacto bidimensionales a las distancias r_{vdW} y $r_{vdW} + 0,5$ Å.

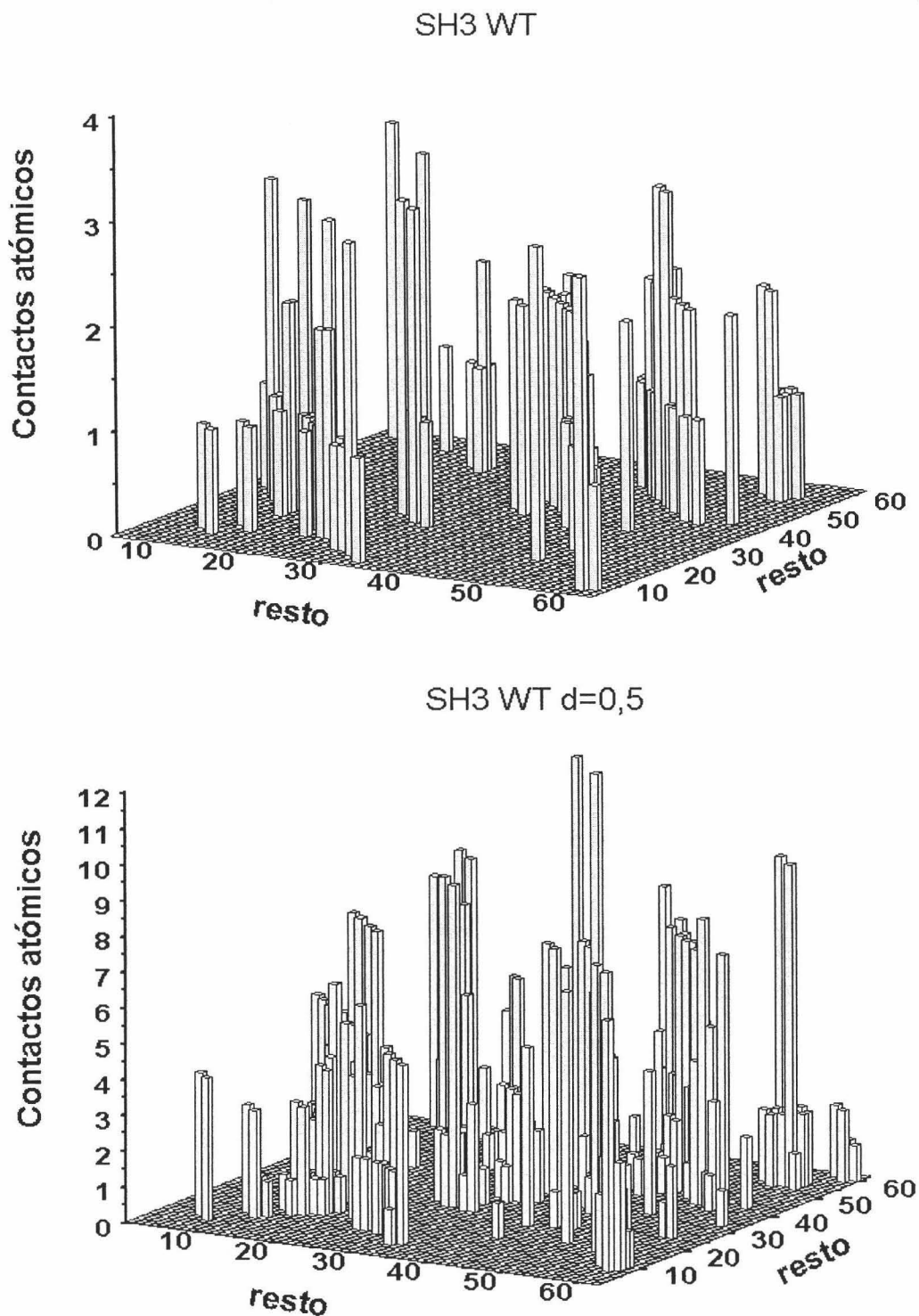


Fig. 5.1.11.. Representaciones tridimensionales de contactos atómicos entre restos de la forma silvestre del dominio SH3 de Espectrina. *Arriba*: contactos definidos como suma de los radios de van der Waals. *Abajo*: contactos definidos como suma de los radios de van der Waals + 0,5 Å. En ambos casos se han excluido los contactos entre restos vecinos en la secuencia.

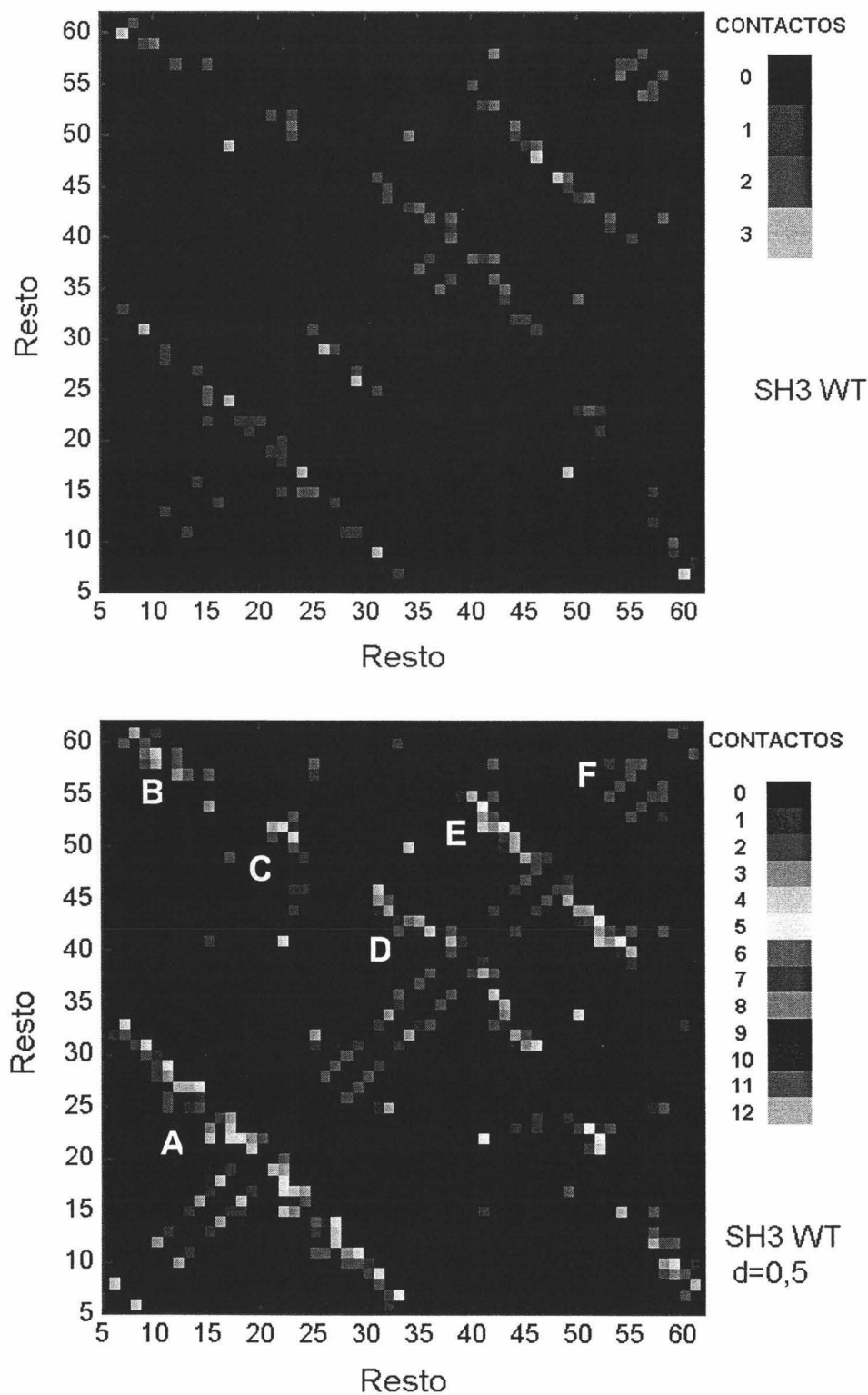


Fig. 5.1.12.: Mapas bidimensionales de contactos atómicos entre restos de la forma silvestre del dominio SH3 de Espectrina. **Arriba:** contactos definidos como suma de los radios de van der Waals. **Abajo:** contactos definidos como suma de los radios de van der Waals + 0,5 Å. En todos los casos se han excluido los contactos entre restos vecinos en la secuencia. Los contactos de las regiones indicadas con letras en el panel inferior se especifican en el texto.

En el mapa de contactos de la figura 5.1.12., para distancias $r_{vdW} + 0,5 \text{ \AA}$, se han marcado con letras mayúsculas las regiones de contacto más relevantes; estas son:

- La región **A** corresponde en su mayoría a contactos atómicos entre restos del lazo RT, incluye contactos entre las hebras β_a y β_b y de estas con restos del lazo RT.
- La región **B** representa contactos entre las hebras β_a y β_e de la lámina β_I , y contactos entre restos del lazo RT y restos de la hebra β_d , así como con los átomos de tirosina 57 de la hélice 3_{10} .
- La región **C** contiene contactos de la valina 23 del lazo RT y restos de la hebra β_d , contactos de la fenilalanina 52 de esta hebra con restos del lazo RT.
- La región **D** muestra los contactos que se establecen entre las hebras β_b y β_c ; destacando los contactos entre el triptófano 42 y la serina 36, así como los contactos entre lisina 43 y leucina 34.
- La región **E** corresponde principalmente a los contactos entre restos de la hebra β_c y β_d . Incluye esta región los contactos del triptófano 42 (hebra β_c) con la alanina 55 de la hélice 3_{10} y los contactos de la valina 46 (hebra β_c) con la arginina 49 (hebra β_d).
- La región **F** representa los contactos de la hélice 3_{10} con restos de las hebras β_d y β_e , principalmente los contactos entre la prolina 54 y la tirosina 57.

Con objeto de analizar las modificaciones, de corto y largo alcance, que las mutaciones estudiadas podrían introducir en la estructura del dominio SH3, se ha repetido este estudio de contactos para cada una de las formas mutadas y se han analizado las diferencias encontradas. Así, la figura 5.1.13. muestra los resultados obtenidos para el caso del mutante N47A, donde podemos comprobar que se conservan las regiones de contacto observadas para la forma natural de la molécula. Las diferencias en el número de contactos atómicos, suma de radios de van der Waals, por resto entre la forma mutada N47A y la especie natural del dominio SH3 de espectrina se representan en la figura 5.1.14.; los valores positivos de estas diferencias representan la “aparición” de contactos en la forma mutante, respecto a la forma natural, mientras que los valores negativos representan la “desaparición” de contactos.

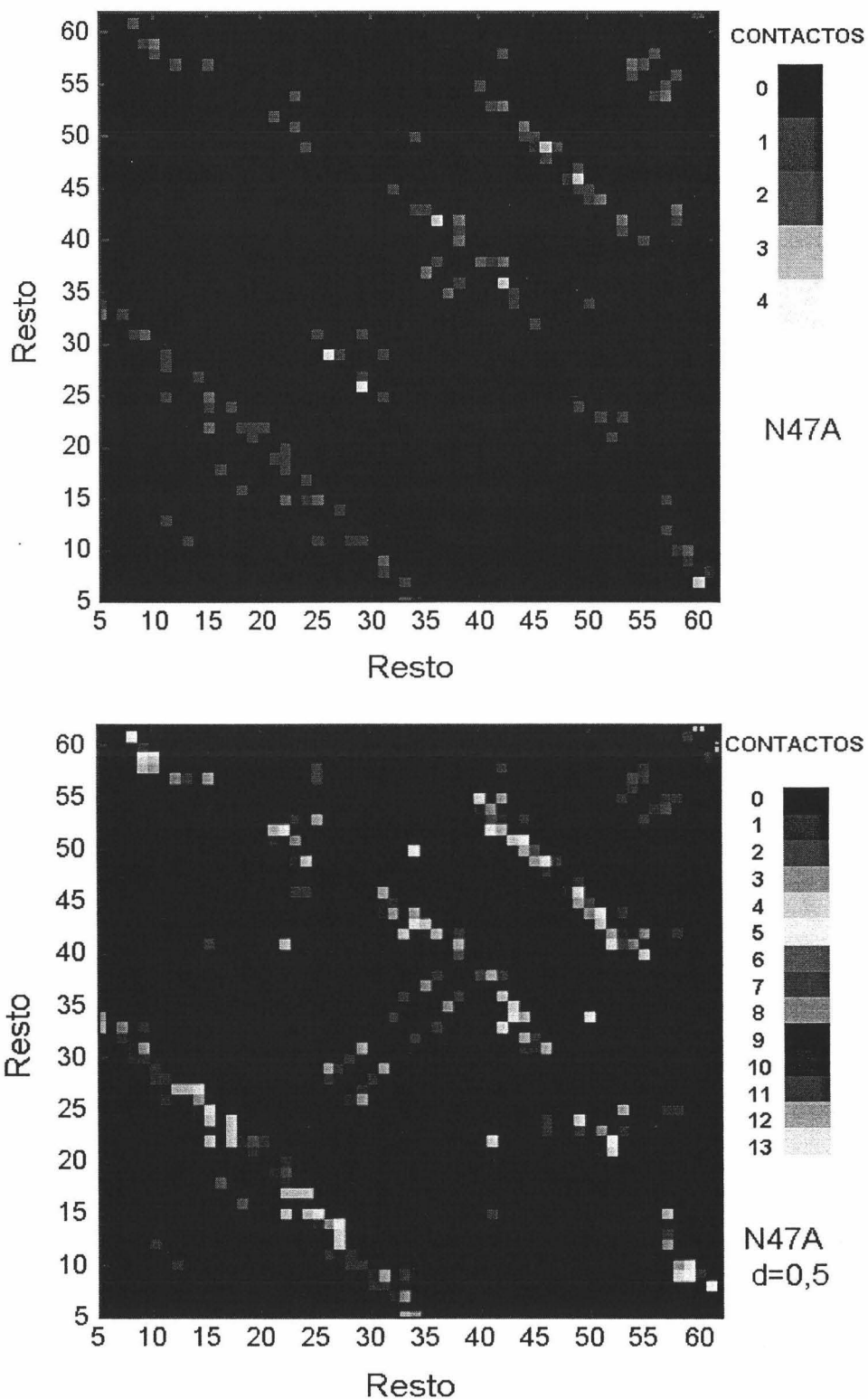


Fig.5.1.13.: Mapas bidimensionales de contactos atómicos entre restos del mutante N47A del dominio SH3 de Espectrina. *Arriba*: contactos definidos como suma de los radios de van der Waals. *Abajo*: contactos definidos como suma de los radios de van der Waals + 0,5 Å. En todos los casos se han excluido los contactos entre restos vecinos en la secuencia.

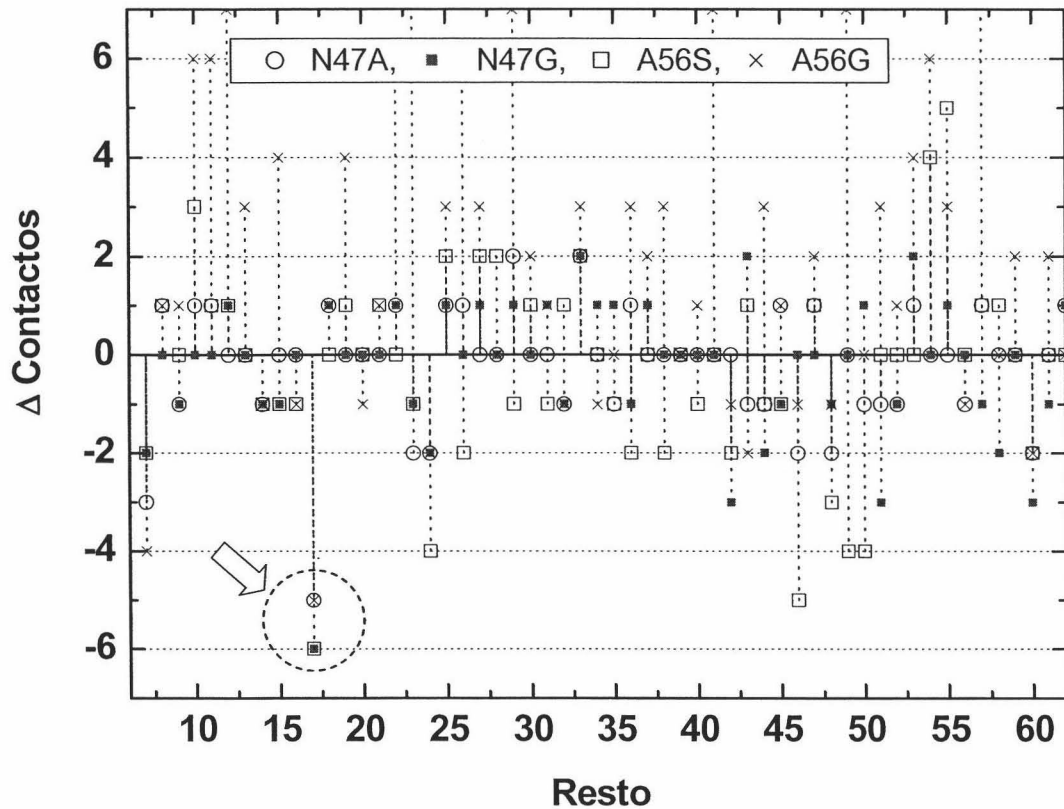


Fig. 5.1.14.. Diferencias en el número de contactos atómicos, suma de radios de van der Waals, por resto entre las formas mutadas y la especie silvestre del dominio SH3 de espectrina..

Observamos en la figura 5.1.14. que la mayoría de los restos aminoácidos de las formas mutadas han modificado sus contactos en el estrecho intervalo de ± 3 contactos y que la distribución entre aparición y desaparición parece ser aleatoria. Estos resultados confirman lo ya encontrado en el estudio de superposición, es decir, no se observan cambios estructurales relevantes inducidos por la mutación que no puedan explicarse en términos de la incertidumbre en las coordenadas atómicas derivada de la limitada resolución de las estructuras. No obstante, hay una desaparición entre 5 y 6 contactos del aminoácido E17 que aparece coherentemente en las cuatro formas mutadas, indicada en la figura 5.1.14. por una flecha. Esto parece indicar la desaparición del puente salino que, entre este resto y la cadena lateral del resto R49 (lazo distal) se encuentra en la forma natural del dominio.

5.1.5.4. Área superficial accesible a la molécula de agua (ASA) en las diferentes variantes del dominio SH3-Spc.

Los cambios en la estructura de una proteína inducidos por la mutación de uno o más restos aminoácidos modifican la accesibilidad de la molécula del disolvente a los átomos de la macromolécula; así, la magnitud de los cambios del área superficial accesible (ASA) a la molécula de agua nos informa sobre el alcance de los cambios estructurales.

Como en el estudio de superposición y de contactos atómicos, con objeto de estimar la amplitud de los cambios estructurales, hemos hecho un estudio de accesibilidad del agua tal y como se especifica en materiales y métodos. El cálculo del ASA total por resto, incluyendo los átomos de la cadena lateral y el esqueleto polipeptídico, da lugar a los resultados representados en la figura XX7 para la forma natural y las cuatro formas mutadas.

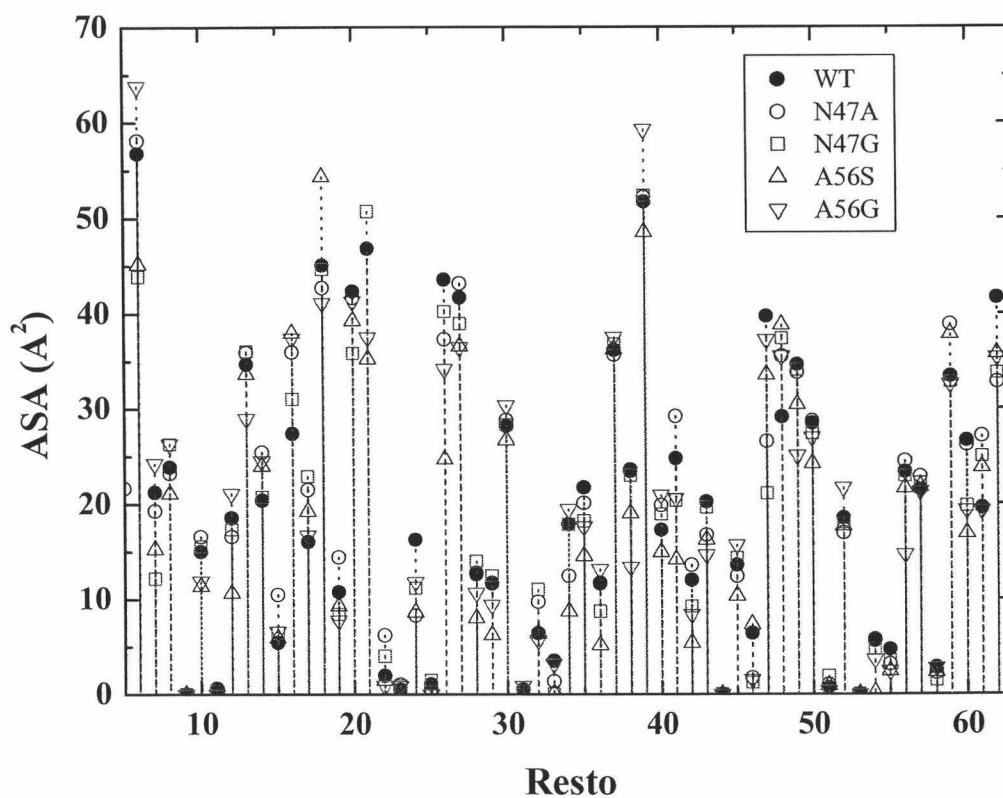


Fig.5.1.15.: Área Superficial Accesible al agua por resto para la forma silvestre y las formas mutadas del dominio SH3 de Espectrina.

En general los valores de estas ASA de cada aminoácido de las formas mutadas, exceptuando pocos restos, se agrupan sin mucha dispersión en torno al valor de la forma natural. Este hecho viene a confirmar lo ya encontrado en el estudio de superposición y contactos atómicos; es decir, los cambios estructurales inducidos por las mutaciones están próximos a la incertidumbre con la que se determinan las estructuras de estas moléculas.

Información más significativa contienen las diferencias del ASA entre las formas mutadas y la forma natural. Si además tenemos en cuenta que los cambios en el valor absoluto del ASA dependen marcadamente del tamaño de la cadena lateral, hemos normalizado las diferencias con la accesibilidad de cada tipo de resto promediada en una amplia base de datos de proteínas; los resultados se muestran en la figura 5.1.16.

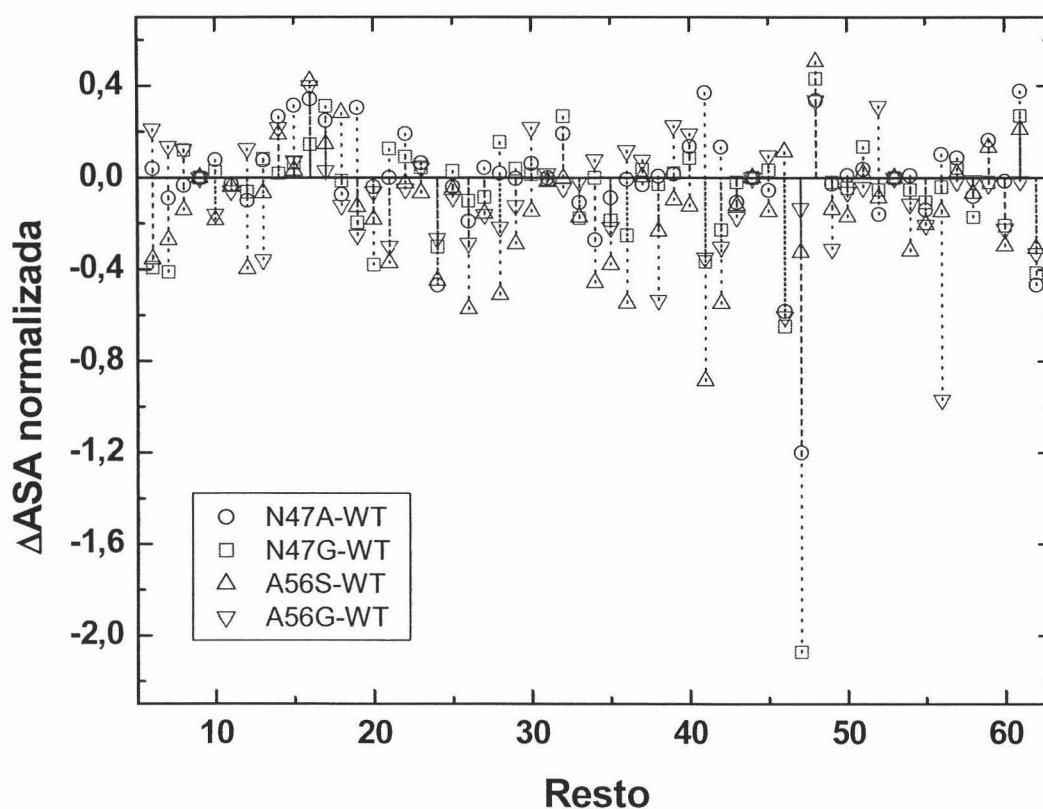


Fig. 5.1.16.: Diferencias del ASA entre las formas mutadas y la forma silvestre, normalizada con el ASA de cada tipo de resto, promediada en un amplio conjunto de archivos PDB.

Observamos en la figura 5.1.16. que, en general, las diferencias normalizadas del ASA se dispersan aparentemente de forma aleatoria en torno al valor nulo; esta observación viene a redundar en lo dicho anteriormente. No obstante, se observan claramente algunos puntos que se apartan del comportamiento general y que admiten una interpretación coherente; así, el elevado valor del Δ ASA normalizado del resto 47 en los mutantes N47A y N47G pone de manifiesto la marcada diferencia del ASA entre la asparagina y la alanina y/o glicina.

Otro valor que destaca es el correspondiente al resto 56 en A56G y que podemos interpretar también en términos de la diferencia del ASA entre la alanina y la glicina, además de la mayor flexibilidad que introduce este último resto. El valor pequeño que observamos para este resto en A56S puede explicarse por la casi igualdad del ASA de estos dos aminoácidos.

Por último destaca el valor elevado del Δ ASA del resto W41 en la forma A56S presentando mayor accesibilidad en la forma natural que en la forma mutada. Este resultado puede interpretarse en los siguientes términos, la diferencia en el número de contactos del resto W41 entre la forma A56S y la forma natural en función de la distancia de contacto considerada toma los siguientes valores:

Distancia de contacto (Å)	Δ contactos WT \rightarrow A56S del resto W41
r_{vdW}	0
$r_{vdW} + 0,5$	6
$r_{vdW} + 1,0$	24

es decir, el triptófano “gana” contactos intramoleculares con la mutación. Una posible explicación de este hecho podría ser que la serina introducida en la posición 56 de la secuencia, a través de la A-55 (muy próxima al W-41), modifica la orientación y/o posición de la cadena lateral del W41 haciéndolo más inaccesible al disolvente.

5.1.6. Conclusiones generales sobre la transmisión cooperativa de interacciones en el dominio SH3-Spc.

- Los resultados presentados en este Apartado demuestran que mediante la realización de mutaciones simples en puntos expuestos al disolvente del dominio SH3-Spc es posible producir cambios o perturbaciones energéticas localizadas sin afectar de manera importante a la estructura del dominio. Los cambios energéticos producidos por las mutaciones se manifiestan en un incremento de estabilidad global frente al desplegamiento térmico que han sido cuantificados por CDB.
- El estudio de IHD permite concluir que el dominio SH3-Spc presenta una elevada cooperatividad, de forma que los cambios energéticos locales inducidos por las mutaciones puntuales se transmiten en mayor o menor medida a la práctica totalidad de la estructura. Sin embargo, la cooperatividad del dominio no es absoluta, de forma que hay regiones que manifiestan mayores cambios de estabilidad y regiones que se ven afectadas en menor medida.

Aunque se observan excepciones, en general los cambios de estabilidad más acusados se producen en las regiones que han sido caracterizadas como de mayor estabilidad (Sadqi et al., 1999) y cuyo IHD se produce a través de estados altamente desestructurados (Sadqi et al., 2002a; Sadqi et al., 2002b), que suelen corresponder a zonas centrales de estructuras secundarias. Los cambios de estabilidad medidos por IHD para estas zonas estables coinciden en buena medida con los incrementos en estabilidad global obtenidos en experimentos de desplegamiento térmico por CDB.

No obstante, la técnica de IHD otorga un gran nivel de detalle en los cambios en estabilidad producidos en cada región del dominio, lo que permite obtener las siguientes conclusiones:

- a) Dependiendo de la posición concreta en que se realice, un cambio en estabilidad local se transmite de forma más eficiente a unas regiones que a otras, lo que indica la existencia de unas rutas de cooperatividad definidas.

En estas rutas parecen ser importantes tanto las redes de puentes de hidrógeno como las interacciones en el interior hidrofóbico.

- b) En general, un cambio de estabilidad local en una región estable se transmite de forma bastante eficiente a otras regiones estables y menos eficientemente a las regiones poco estables. Por el contrario, un cambio en la estabilidad de una región poco estable se transmite de forma eficiente a las regiones más estables. No hay, por tanto bidireccionalidad en la transmisión de cooperatividad entre zonas estables y zonas flexibles del dominio.

- c) Es posible observar efectos anticooperativos y efectos de supercooperatividad, que son manifestación de la existencia de fenómenos de redistribución de las poblaciones de ciertos microestados o conformaciones producida por efecto de la mutación. Estos efectos son una manifestación del carácter estadístico de las proteínas.

Una consecuencia que se puede extraer de este estudio es que a la hora de diseñar cambios en la estabilidad de una proteína puede no ser suficiente con producir cambios en la energía de Gibbs de desplegamiento global, ya que en condiciones nativas las proteínas muestran su carácter mixto entre estadístico y cooperativo, con la existencia de multitud de estados conformacionales diferentes que hacen que la estabilidad local o regional no sea la misma en todas las zonas de su estructura y, por las mismas razones, los efectos sobre la estabilidad producidos por una mutación pueden ser diversos dependiendo de la región considerada.



5.2 Estudio de la interacción entre el dominio SH3-Spc y el decapeptido de diseño p41 (APSYSPPPPP).

Dentro del planteamiento general de la Tesis de estudiar la transmisión cooperativa de interacciones a través de la estructura del dominio SH3-Spc, el segundo objetivo principal de este trabajo consistía en estudiar los efectos cooperativos producidos por la interacción de un ligando en el sitio de unión del dominio.

Como se describe en el Capítulo de Antecedentes, aunque la mayoría de los dominios SH3 reconocen secuencias peptídicas ricas en prolina con afinidad moderada a través de una interacción bastante conservada, hasta la fecha no se habían descrito ligandos para el dominio SH3-Spc, objeto de estudio del presente trabajo. Sin embargo, uno de los ligandos de una serie de decapeptidos de diseño para el dominio SH3-Abl (Pisabarro y Serrano, 1996), denominado p41 y cuya secuencia es APSYSPPPPP, muestra una afinidad baja aunque significativa por el dominio SH3-Spc (M. Pisabarro, comunicación personal), mientras que para SH3-Abl la afinidad es bastante alta (del orden de 1 μ M). Como ventaja adicional, se dispone de la estructura tridimensional del complejo entre SH3-Abl y p41.

La disponibilidad de un ligando de afinidad moderada para el dominio SH3-Spc nos abría la oportunidad de estudiar la termodinámica de su unión desde un punto de vista macroscópico mediante métodos calorimétricos y posteriormente, mediante el uso combinado de la RMN y el IHD analizar los efectos de la interacción sobre la estructura y sobre la estabilidad regional del dominio. En este estudio subyacía la idea de extrapolar las conclusiones obtenidas del estudio de la transmisión cooperativa de perturbaciones energéticas locales, descrito en el apartado anterior, a una perturbación energética más extensa y compleja, como es esta interacción proteína-ligando.

5.2.1 Análisis estructural del complejo SH3-Abl con p41.

Como paso inicial de este estudio se ha procedido a realizar un análisis de la estructura tridimensional del complejo entre SH3-Abl y el decapeptido p41 (PDB: 1BBZ) con el fin de comprender la naturaleza de la interacción. Se ha llevado también a cabo un análisis comparativo entre las estructuras tridimensionales de los dominios SH3-Spc y SH3-Abl.

La interacción entre p41 y SH3-Abl presenta dos componentes bien diferenciados. Por un lado existe una interacción entre la región rica en prolina del péptido con una región del sitio de unión del dominio que presenta dos cavidades hidrofóbicas poco profundas tapizadas por cadenas laterales apolares o aromáticas. En estas cavidades se insertan las cadenas laterales de las prolina de p41 o, en otros ligandos, de otros aminoácidos hidrofóbicos. La secuencia consenso del ligando para esta interacción conservada es $\Phi P x \Phi P$ (Mayer, 2001), donde Φ es un resto hidrofóbico y x es cualquier resto. Esta interacción confiere un marcado carácter hidrofóbico a la unión de este tipo de ligandos ricos en prolina. En la Figura 5.2.1 se representa la superficie molecular del dominio SH3-Abl junto con el decapeptido p41. Se puede apreciar que las cadenas laterales de las prolina 6, 7, 9 y 10 se insertan en sendas cavidades o valles. Adicionalmente se establece un puente de hidrógeno entre el grupo fenólico de Tyr52 del dominio y el carbonilo de la Pro8 del ligando. Para establecer esta interacción el péptido debe adoptar una conformación en hélice de poliprolina II, lo cual está obviamente favorecido por su secuencia. Este tipo de interacción está altamente conservada en las interacciones entre las diferentes variantes de dominios SH3 y sus ligandos peptídicos.

Existe una tercera cavidad en el sitio de unión, llamada *bolsillo de especificidad*, que es mucho más variable entre los diversos dominios SH3 y que confiere especificidad a esta interacción. En esa cavidad se inserta la cadena lateral de la prolina 2 de p41, junto con el anillo de la tirosina 4, en una interacción de tipo hidrofóbico. A esta interacción se unen otras de carácter polar. En particular, la cadena lateral de la tirosina 4 del ligando p41 establece un puente de hidrógeno múltiple con varios restos localizados en el lazo RT, como se aprecia en la Figura 5.2.1. Otros restos polares

situados en el lazo n-Src también presentan contactos con el ligando aunque menos evidentes.

Se ha postulado muy recientemente que una buena parte de las interacciones polares que se establecen entre el dominio y el péptido se encuentran mediadas por moléculas de agua (I. Luque, comunicación personal). Estas moléculas de agua se encuentran bastante conservadas en las estructuras cristalográficas de los complejos

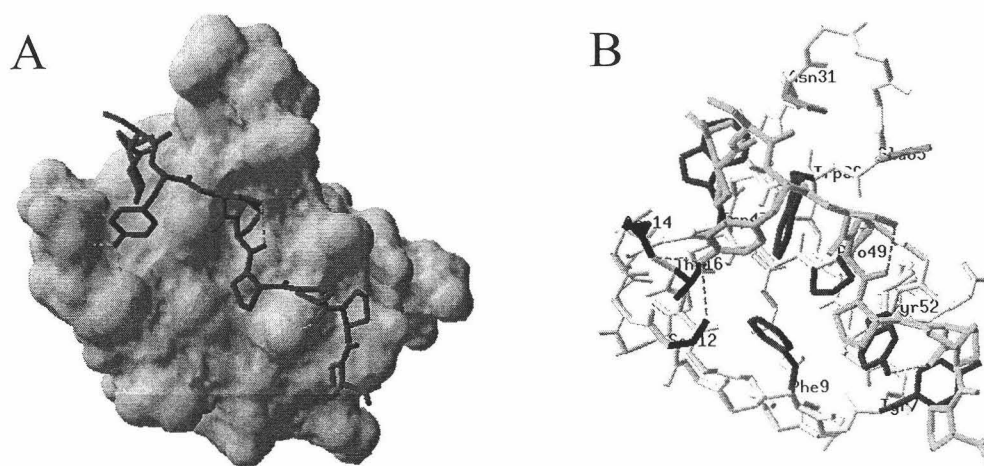


Figura 5.2.1. Representaciones esquemáticas de la estructura tridimensional del complejo entre SH3-Abl y el decapeptido p41. A: Representación de la superficie molecular del dominio. La estructura de p41 se ha representado en modelo de varillas en color rojo. B: Representación en modelo de varillas del complejo. Se han resaltado en colores las cadenas laterales del dominio que se encuentran a menos de 4 Å de distancia del ligando p41. En color rojo se han representado las de los residuos que componen la superficie hidrofóbica conservada entre los dominios SH3 que reconoce las secuencias consenso ricas en prolina. En verde y azul se han resaltado las cadenas laterales de restos situados en los lazos n-src y RT, respectivamente, responsables de la especificidad de la interacción. Los puentes de hidrógeno entre el dominio y el ligando se representan con líneas verdes discontinuas.

entre SH3-Abl y varios de sus ligandos. Como se discutirá más adelante, la suposición de un papel importante para estas moléculas de agua en esta interacción puede explicar de forma satisfactoria el carácter aparentemente inusual de las magnitudes termodinámicas de la interacción entre los dominios SH3 y los péptidos ricos en prolinas.

En la figura 5.2.2 se muestra la superposición entre las estructuras cristalográficas de las formas libres de los dominios SH3-Abl y SH3-Spc. Las estructuras tridimensionales son muy similares, con un RMSD de 0.84 Å para las cadenas principales. Las mayores diferencias se aprecian como es lógico en los lazos y extremos de las cadenas.

El sitio de unión de SH3-Spc presenta muchas similitudes con el de SH3-Abl, en particular en la región de interacción para las secuencias ricas en prolina. Se puede apreciar que las cadenas laterales que establecen la interacción hidrofóbica con las prolinas se encuentran muy conservadas, con la única sustitución de Phe por Tyr y de Trp por Phe en posiciones equivalentes. Además la disposición espacial de estas cadenas laterales es muy parecida. Esto explica la capacidad, aunque limitada del dominio SH3-Spc para unir p41. Por el contrario, los lazos RT y n-src de ambos dominios muestran muchas más diferencias entre sí tanto en su secuencia como en su conformación, como se aprecia en la figura.

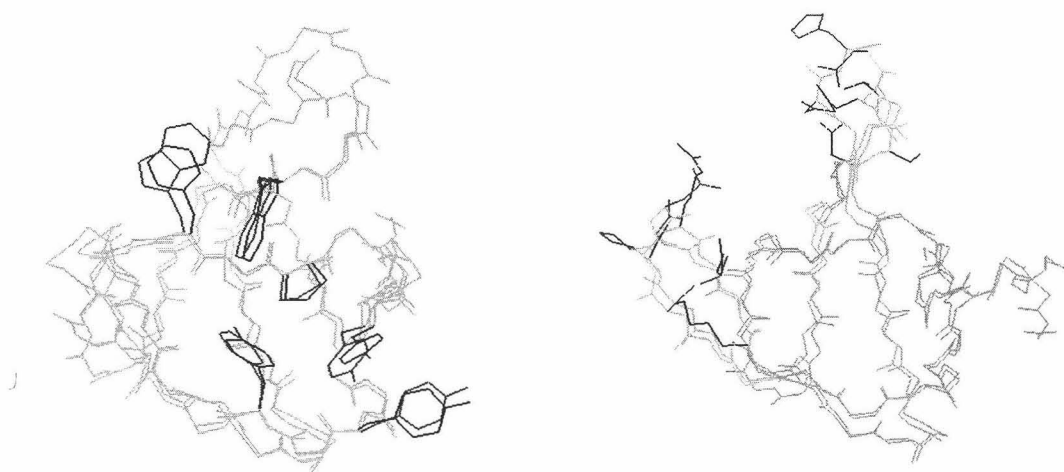


Figura 5.2.2. Superposición de las estructuras tridimensionales de los dominios SH3-Abl y SH3-Spc, en las que se han resaltado las cadenas laterales de los restos implicados en la interacción con ligandos ricos en prolina. Las cadenas principales se han representado en color azul claro (Spc) y naranja (Abl). Las cadenas laterales se han coloreado en azul (Spc) y rojo (Abl). El panel A muestra la disposición similar de las cadenas laterales en la zona conservada del sitio de unión. El panel B muestra las diferentes conformaciones de los lazos RT y n-src en ambos dominios.

El lazo n-Src tiene en SH3-Abl una inserción (His95) que lo hace más protuberante, lo que permite su mayor acercamiento al ligando. Por su parte el lazo RT es más flexible en SH3-Abl y presenta una conformación más irregular, mientras que en SH3-Spc, debido a la presencia de Pro20, la conformación parece ser más rígida, con una estructura de giro β tipo I, como se ha descrito anteriormente. Además, SH3-Spc tiene una arginina en posición 21, cuya voluminosa cadena lateral, con carga positiva, se encuentra orientada de manera que forma una protuberancia sobre la superficie del sitio de unión, lo que supone un posible impedimento estérico para la unión del ligando p41 y su interacción adecuada con el bolsillo de especificidad. Esto contrasta con la

disposición del lazo en SH3-Abl, que presenta un aspártico con su cadena lateral más corta, en orientación similar y con carga negativa, la cual interacciona favorablemente con el resto Tyr4 del ligando, como ya se ha mencionado.

Estas acusadas diferencias en las regiones de especificidad de los dominios parecen ser la razón de la relativamente baja afinidad de SH3-Spc por p41 en comparación con SH3-Abl.

En conclusión, los dominios SH3-Spc y SH3-Abl muestran una elevada homología estructural y una alta conservación de la región consenso del sitio de unión para las secuencias ricas en prolina. En contraste con esto, las regiones del sitio de unión responsables de la especificidad muestran marcadas diferencias, con conformaciones y secuencias diferentes para los lazos n-src y RT. Del análisis de las estructuras, como uno de los aspectos más notables, se ha observado una posible interferencia de la cadena lateral de Arg21 en SH3-Spc con la interacción del ligando con el bolsillo de especificidad, lo que podría estar contribuyendo, entre otros factores, a la baja afinidad de este dominio por p41. Dado que disponíamos de mutantes para esta posición concreta de la secuencia de SH3-Spc, se abría la posibilidad de estudiar el efecto de sustituir dicha cadena lateral sobre la unión de p41 a SH3-Spc.

5.2.2. Estudio de la unión entre el dominio SH3-Spc y el p41 seguido por espectroscopía de fluorescencia.

Tal y como se describe en el apartado 5.1, dos de las familias de mutantes del dominio SH3-Spc estudiadas se realizaron en posición 21 y en posición 56, con el objetivo fundamental de analizar las rutas de transmisión cooperativa de energía a través de la estructura del dominio desde dos zonas del sitio de unión con estabilidades diferentes.

Dentro de este contexto resultaba interesante analizar el efecto de las mutaciones sobre la afinidad de unión del ligando p41 (APSYSPPPP) diseñado específicamente

para el dominio SH3-Abl (Pisabarro y Serrano, 1996) por el dominio SH3-Spc. En su variable WT el dominio SH3-Spc muestra una afinidad relativamente baja por p41, con un valor que dificulta bastante el estudio termodinámico de esta interacción. Por esta razón, se decidió explorar si alguno de los mutantes mostraba un incremento en la afinidad que permitiera un estudio más preciso de esta interacción y que, además, arrojara luz sobre los factores que influyen en la especificidad de la unión de los ligandos peptídicos a estos dominios.

Paralelamente a los estudios de estabilidad, descritos en el Apartado 5.1 que se han llevado a cabo con los mutantes, se procedió a la realización de una serie de experimentos preliminares de titulación mediante espectroscopía de fluorescencia de los mismos con el p41, con el objeto de determinar la afinidad de p41 por cada uno de los mutantes. El péptido p41 de síntesis empleado en todos los experimentos de titulación de las diferentes variantes del dominio SH3-Spc estudiadas, se encontraba acetilado en su extremo N-terminal y amidado en su extremo C-terminal con el objeto de eliminar las cargas de los extremos, dejando al ligando ausente de cargas lo que facilitaría, en principio, la interpretación de las magnitudes termodinámicas de la interacción. Las titulaciones se llevaron a cabo a 25°C en todos los casos y en dos tampones de pH diferente, a saber:

- a) Glicina 20mM, pH 3.0
- b) Fosfato sódico 20mM, pH 7.0

De esta manera también se podrían apreciar posibles efectos derivados del pH.

Si bien inicialmente se pensó únicamente en los mutantes en posición 21 y en posición 56 por ser ambas familias las específicamente diseñadas para estudiar los efectos de las mutaciones puntuales en dos regiones diferentes del sitio de unión, posteriormente se decidió realizar también experimentos de titulación con los mutantes en posición 47. Con estos experimentos se trataba de observar la medida en las mutaciones puntuales en posiciones alejadas del sitio de unión eran capaces de modificar la afinidad del dominio por el p41, lo cual sin duda sería además una buena manera de observar cómo la elevada cooperatividad del dominio se manifiesta en modificación de propiedades funcionales del mismo, completando así los resultados obtenidos en los estudios de estabilidad y plegamiento.

Como se explica en la sección de Materiales y Métodos, inicialmente los experimentos de titulación de los diferentes mutantes del dominio SH3-Spc se realizaron por adiciones sucesivas de volúmenes crecientes de una disolución stock de p41 de concentración 2mM aproximadamente sobre un volumen inicial de una disolución de proteína de concentración en torno a 20-25 μ M. Los espectros de fluorescencia de las diferentes muestras consideradas se registraron utilizando los parámetros instrumentales siguientes:

- La longitud de onda de excitación se situó a 298nm para provocar la excitación selectiva de los grupos indólicos de los triptófanos de la proteína.
- Las rendijas de excitación y de emisión se dispusieron a 2.5 y 5nm respectivamente, para evitar problemas de saturación de la señal.
- Se registraron los espectros de emisión de las muestras entre 300 y 400 nm en todos los casos.

En la figura 5.2.3 se representan, a modo de ejemplo, la serie de espectros de emisión de fluorescencia correspondiente a un experimento de titulación realizado por adición de volúmenes de ligando p41 a la forma natural del dominio, WT.

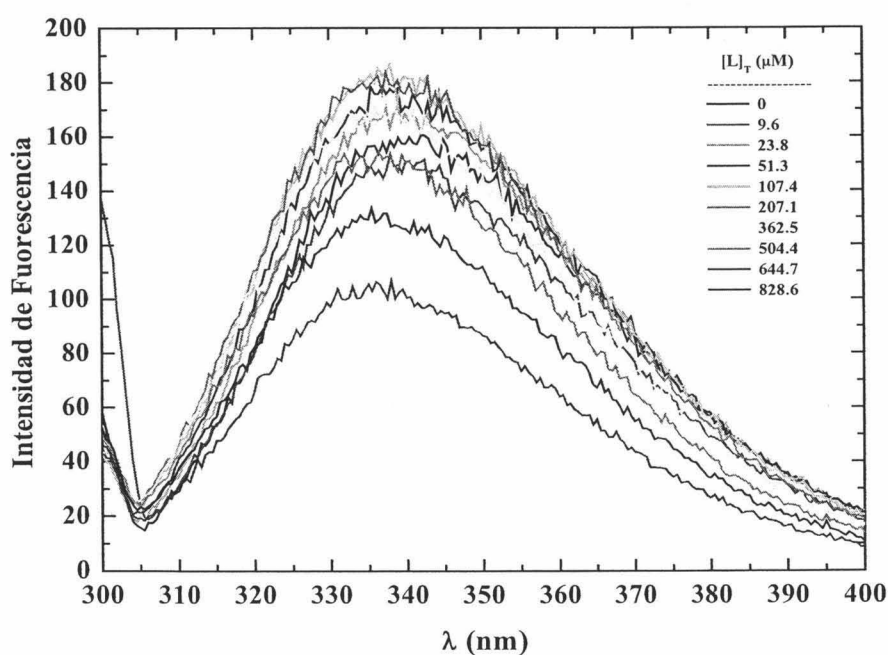


Fig. 5.2.3.: Espectros de emisión de fluorescencia de la forma natural del dominio SH3-Spc, WT, libre (en negro) y en presencia de diferentes concentraciones (en colores) del decapeptido de diseño p41 (APSYSPPPPP). El experimento de titulación se realizó por adición de volúmenes crecientes de disolución stock de p41 sobre una disolución madre de proteína. En este caso se muestra el experimento realizado a pH 3.0 y 25°C de temperatura.

300 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400

λ (nm)

En la figura anterior, fig. 5.2.3, se puede apreciar con claridad cómo a medida que se añade ligando p41 en la muestra la señal de fluorescencia se hace cada vez más intensa y al mismo tiempo se produce un desplazamiento del máximo de los espectros hacia el azul, lo que es compatible con un enterramiento del grupo indólico de las cadenas laterales de triptófano, desde un medio más polar (disolvente) hasta un medio más apolar (interfase de contacto péptido-proteína), y que es justo lo que parece estar ocurriendo con el triptófano presente en la posición 41 del dominio SH3-Spc, situado en la superficie del sitio de unión.

No obstante, se aprecia asimismo cómo a partir de una cierta cantidad de ligando añadido la intensidad de los espectros subsiguientes va disminuyendo a pesar de que se siga apreciando ese desplazamiento hacia el azul del máximo de los mismos. Este efecto está causado por la dilución de la proteína a medida que se van añadiendo volúmenes crecientes de disolución stock de p41. Así, en las primeras adiciones, a pesar de que la proteína también se está diluyendo, como se añaden volúmenes pequeños, el efecto de dilución es poco apreciable y predomina el incremento en la intensidad de fluorescencia debido al proceso de unión. Sin embargo, cuando las adiciones que se van haciendo son cada vez mayores, el efecto de dilución se hace cada vez más evidente hasta llegar a un punto en que supera al de unión del ligando y así, los espectros van disminuyendo su intensidad a pesar de seguir desplazándose sus máximos hacia el azul. Por esa razón, fue preciso normalizar las intensidades de fluorescencia de estos experimentos de titulación por la concentración real de proteína en la cubeta en cada punto de la misma. Además, debido al efecto de desplazamiento del máximo de los espectros hacia el azul, en lugar de considerar intensidades de fluorescencia a una determinada longitud de onda, se consideraron las “áreas totales de fluorescencia”, obtenidas por integración entre 305 y 400 nm de cada uno de los espectros obtenidos en cada punto de la titulación, obteniéndose curvas de titulación típicas como la representada en la figura siguiente, fig. 5.2.4:

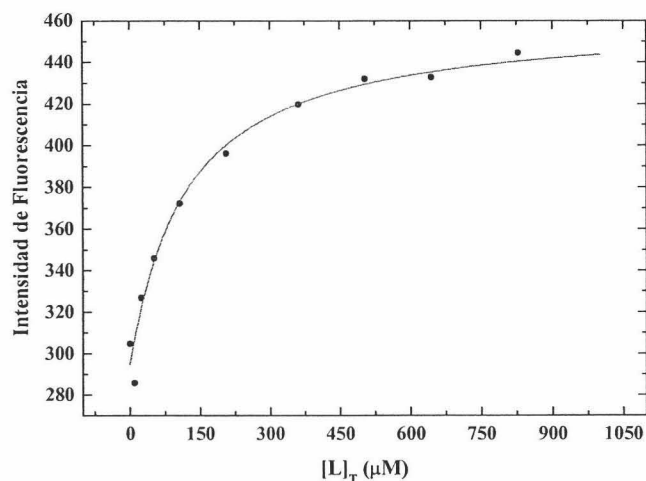


Fig. 5.2.4: Curva de titulación de la forma natural, WT, del dominio SH3-Spc con p41. Experimento realizado por adición de volúmenes crecientes de disolución stock de p41 sobre una disolución “madre” de proteína. Los puntos representan datos de “área total de fluorescencia” normalizada por la concentración de proteína en cada punto y la línea roja representa al ajuste por mínimos cuadrados de dichos datos a la ecuación VI.xvi. (ver apéndice VI).

Debido a que la muestra se excita a 298nm y a esa longitud de onda las tirosinas también absorben ligeramente, fue preciso tener en cuenta la fluorescencia residual del ligando libre, debida a la Tyr4 de su secuencia, que se hace notable a medida que se añade más cantidad de disolución stock de ligando. Para poder tener en cuenta este hecho se registraron espectros de fluorescencia de disoluciones de ligando libre a diferentes concentraciones, se determinó la fluorescencia específica de dichas muestras de forma similar a como se ha indicado con las muestras de titulación y finalmente se introdujo un factor corrector en la ecuación de ajuste de los datos experimentales de las titulaciones (ver Apéndice VI).

Baste como ejemplo el espectro de emisión de fluorescencia de una disolución de ligando libre de elevada concentración como el que se representa en la figura siguiente, fig. 5.2.5, registrado en las mismas condiciones experimentales en las que se han registrado los espectros de titulación:

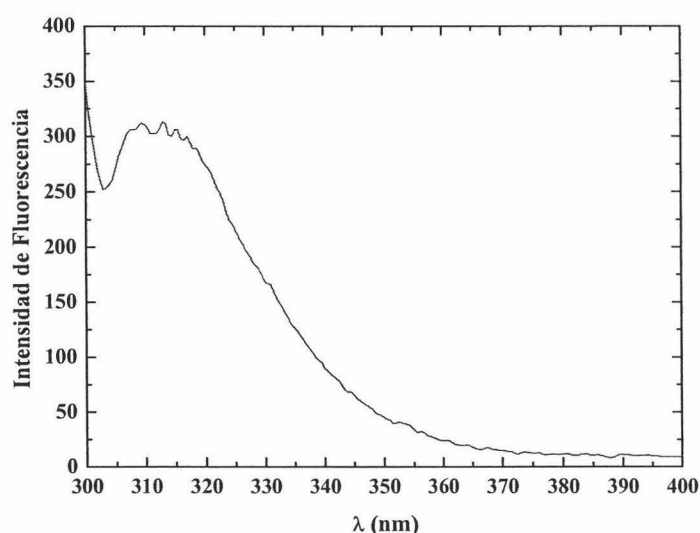


Fig. 5.2.5: Espectro de emisión de fluorescencia de una disolución del decapeptido p41 de concentración 9.78mM en tampón 20mM glicina a pH 3.0 y 25°C de temperatura.

Con todo ello fue posible finalmente determinar las constantes de disociación del complejo formado por las diferentes variantes del dominio SH3-Spc y el p41, tanto a pH 3.0 como a pH 7.0 tal y como se muestra en la Tabla 5.2.1:

Tabla 5.2.1.: Constantes de disociación de los complejos entre cada una de las diferentes variantes del dominio SH3-Spc y el ligando p41, a 25°C, y dos valores de pH diferentes, obtenidas mediante titulación por adición de volúmenes crecientes de una disolución stock de ligando, seguida por espectrofluorimetría.

VARIANTE	pH 3.0	pH 7.0
	K _d (μM)	K _d (μM)
WT	112 ± 32	83 ± 7
N47A	179 ± 19	125 ± 13
N47G	173 ± 18	131 ± 20
A56G	349 ± 27	422 ± 145
A56S	133 ± 6	116 ± 26
R21A	63 ± 7	40 ± 5
R21S	69 ± 12	51 ± 5
R21D	115 ± 11	181 ± 12
R21G	90 ± 12	108 ± 11

Lo primero que se observa en la Tabla es que la variante WT del dominio SH3-Spc muestra una afinidad relativamente baja por el ligando p41, con una constante de disociación que se sitúa alrededor de 100 μM , como ya se mencionó anteriormente, algo menor a pH 7.0 que a pH 3.0. Otro resultado evidente es que el efecto de las diferentes mutaciones es muy variado, dependiendo de la posición y de la naturaleza de la mutación realizada en cada caso.

En posición 47, bastante alejada del sitio de unión, ambas mutaciones tienen claro un efecto de disminución de la afinidad de la misma magnitud en los dos mutantes, en claro contraste con los cambios de estabilidad provocados por las dos mutaciones, que van en sentidos opuestos. La eliminación del grupo polar de la cadena lateral de la asparagina original al realizar cualquiera de las dos mutaciones, A o G, parece tener un papel primordial en esta disminución de afinidad. La disminución de la afinidad es mayor a pH 3.0 que a pH 7.0, sugiriendo la implicación de algún grupo carboxílico ionizable en la transmisión de este efecto al sitio de unión. Los análisis estructurales y la deriva de desplazamientos químicos indican que los cambios estructurales producidos por las mutaciones son muy leves y parecen limitarse a la región de la mutación y en menor medida a ciertas zonas del lazo RT. No obstante, como se describe en el apartado 5.1.5, un puente salino presente en la forma natural, WT, entre los restos glutámico 17 y arginina 49 parece estar roto en ambos mutantes N47G y N47A. Esta interacción, junto con otros contactos que conectan la posición 47 con el sitio de unión, parece servir de ruta cooperativa que explique la disminución de afinidad en ambos mutantes.

En cuanto a los mutantes en posición 56, ésta se localiza en una zona estable, la cara expuesta de la hélice 3_{10} que, como ya se ha mencionado anteriormente, forma parte de la región del sitio de unión que reconoce los péptidos ricos en prolina (región consenso, (Viguera et al., 1994)). En SH3-Abl la posición equivalente a la de esta mutación la ocupa asparagina. Aunque en la estructura del complejo entre SH3-Abl y p41 no se aprecian contactos directos entre esta asparagina y el ligando, adyacente se encuentra una tirosina cuyo grupo fenólico forma un puente de hidrógeno con el ligando, como se describe en el apartado anterior, por lo que la afinidad debería ser muy sensible a pequeños cambios conformacionales en esta posición. Así, la mutación a

glicina, que desestabiliza fuertemente la hélice 3₁₀ tal y como se discute en el apartado 5.1.4.2, produce la mayor reducción de afinidad de todas las mutaciones, especialmente a pH 7.0. Esto parece ser debido a un aumento en la libertad conformacional de la hélice 3₁₀ que, como se discute más adelante, dificultaría el establecimiento de interacciones con el ligando en esta zona. Por su parte, la mutación a serina también reduce algo la afinidad del dominio por el péptido aunque en mucha menor medida, quedando en un valor muy similar a la variante WT.

En el caso de las mutaciones en posición 21, localizada en el lazo *RT*, esto es, en una zona flexible poco conservada del dominio y que es la responsable de la especificidad de la unión, los cambios en la afinidad encontrados son algo más “sutiles” que los que se advierten en el caso de las mutaciones en posición 56, debido precisamente al carácter flexible de esa región del dominio. Las variantes que presentan mutaciones a alanina y a serina son las de mayor afinidad a ambos valores de pH, con una disminución de la constante de disociación a prácticamente la mitad para ambas mutaciones. La razón de esto podría encontrarse muy posiblemente en que con las mutaciones se ha eliminado la larga cadena lateral de la arginina que, como se describe en el Apartado anterior, parece suponer un impedimento estérico a la interacción del ligando con el bolsillo de especificidad. De esta forma, la introducción de una cadena lateral de pequeño tamaño permitiría el establecimiento de contactos adicionales en dicha región del sitio de unión. Este resultado resalta la importancia de las zonas de especificidad del sitio de unión en este tipo de interacción.

La mutación a glicina también elimina la cadena lateral de la arginina pero, como se ha discutido anteriormente, esta mutación parece inducir una reestructuración en el lazo *RT*, con el posible cambio de tipo de giro β , de tipo I a II, que podría estar teniendo lugar dada la mayor propensidad de la glicina a ocupar esa posición en un giro β tipo II (Sibanda et al., 1989), (Hutchinson y Thornton, 1994), (Guruprasad y Rajkumar, 2000). Así, esta mutación parece estar seleccionando conformaciones en el lazo *RT* menos proclives a establecer contactos favorables con el ligando. Este efecto compensaría la eliminación de la cadena lateral de arginina y finalmente la afinidad de dicha variante del dominio por el ligando p41 no es muy diferente a la de la forma natural, WT.

Por su parte, dado que en una orientación similar a la cadena lateral de arginina 21 de SH3-Spc, en SH3-Abl existe una cadena lateral de aspártico que participa en interacciones favorables con el ligando, se propuso mutar la arginina 21 por aspártico esperando un incremento en la afinidad con esta mutación. No obstante, a pH 3.0, donde el grupo carboxilo de la cadena lateral del aspártico se encuentra mayoritariamente protonado, la afinidad de la variante R21D es similar a la de la forma natural, WT. A pH 7.0, con la cadena lateral de aspartato desprotonada y con una carga libre, la afinidad disminuye de forma acusada. La cadena lateral de aspartato en SH3-Spc no parece estar contribuyendo a establecer contactos favorables con la cadena lateral de Tyr 4 del ligando p41 similares a los que se observan en su complejo con SH3-Abl. Es evidente que en la formación de estas interacciones específicas con el ligando intervienen factores más complejos. El hecho de que no se disponga de la estructura tridimensional resuelta de ninguno de los mutantes en posición 21 dificulta mucho la interpretación de estos datos experimentales. Precisamente por eso la resolución de estas estructuras se encuentra en proceso actualmente.

Como conclusión general al comparar todas las variantes del dominio para las que se ha realizado el estudio espectrofluorimétrico del proceso de unión, se puede afirmar que no existe correlación entre la estabilidad termodinámica frente al desplegamiento y la afinidad en la unión de p41. Así, las variantes más estables del dominio, entre las que encontramos el N47G o el R21D, no son las que presentan mayor afinidad por el péptido. Esta falta de correlación estabilidad-afinidad es particularmente evidente en los mutantes en posición 47.

Un resultado importante es que disponemos de variantes del dominio SH3-Spc con una afinidad de unión por p41 bastante aumentada, lo que facilitará el subsiguiente estudio termodinámico de esta interacción. En particular hemos elegido el mutante R21A por poseer la mayor afinidad por p41, por lo que en adelante se utilizará esta variante para caracterizar la termodinámica de la interacción SH3-p41 y sus efectos cooperativos sobre las diferentes regiones del dominio.

Con el fin de determinar con la máxima precisión las afinidades de unión para el mutante R21A y la forma natural de la proteína, WT, se repitió el experimento de

titulación, esta vez siguiendo el método de preparación de disoluciones independientes para cada valor del grado de saturación de la proteína, manteniendo la concentración de esta última constante en todos los casos. Así, se prepararon diferentes mezclas proteína-ligando a diferentes grados de saturación de la proteína y se registraron los espectros de emisión de fluorescencia de forma idéntica a como se registraron en los experimentos de volumen variable. Así, en la figura siguiente, fig. 5.2.6, se muestran como ejemplo los espectros de emisión de fluorescencia para el experimento de titulación de la forma natural, WT, con p41, realizado con muestras independientes de concentración de proteína constante:

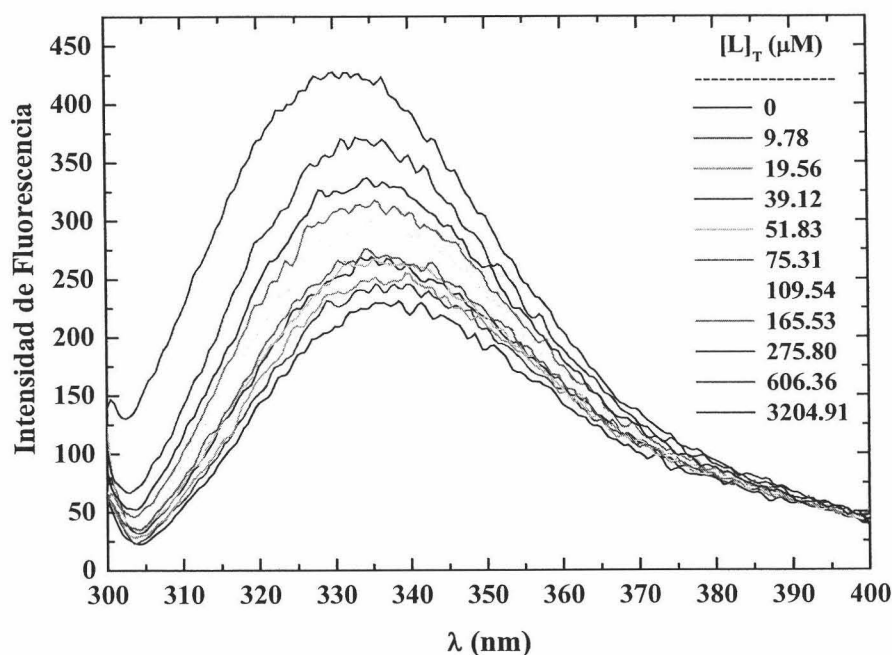


Fig. 5.2.6: Espectros de emisión de fluorescencia de la forma natural del dominio SH3-Spc, WT, libre (en negro) y saturada en diferentes grados (en colores) con el decapeptido de diseño p41 (APSYSPPPPP). Experimento de titulación realizado preparando disoluciones independientes en las que la concentración de proteína se mantiene constante en torno a 20μM. La titulación se realizó a pH 3.0 y 25°C de temperatura.

Las condiciones experimentales de estos nuevos experimentos de titulación realizados con las variantes R21A y WT, que serán los definitivos, fueron las mismas que las consideradas en el caso de las titulaciones realizadas con volumen variable, esto es, muestras preparadas en tampón 20mM glicina pH 3.0 y 25°C de temperatura. Los datos experimentales se analizaron también de forma similar a como se hizo con los experimentos de titulación por adición de volúmenes, es decir, los espectros de fluorescencia registrados para cada valor de saturación de la proteína, se integraron entre 305 y 400nm y los valores de “área total de fluorescencia” obtenidos se

representaron frente a la concentración de ligando total en cada muestra, obteniéndose las curvas de saturación típicas como la que muestra la figura siguiente, fig. 5.2.7:

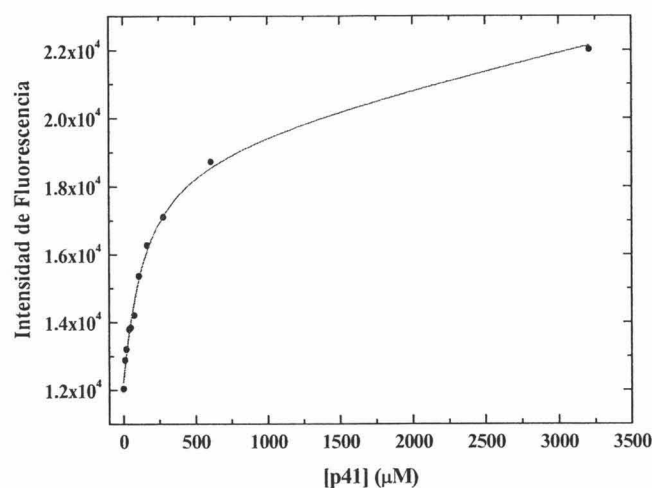


Fig. 5.2.7.: Curva de titulación de la forma natural, WT, del dominio SH3-Spc con p41. Experimento realizado con muestras independientes para cada valor de saturación explorado de la proteína. Los puntos representan el "área total de fluorescencia" obtenidos experimentalmente mientras que la línea roja representa el ajuste no lineal por mínimos cuadrados de los mismos a la ecuación VI.xvi. (ver apéndice VI).

En la curva representada en la figura anterior, fig. 5.2.7., se aprecia mucho más claramente el efecto de la fluorescencia residual del ligando libre que ya se comentaba anteriormente. De forma análoga a como se hizo en el caso de las titulaciones por adición de volúmenes, se llevaron a cabo medidas de fluorescencia de disoluciones de ligando libre a diferentes concentraciones y en las mismas condiciones en las que se habían realizado los experimentos de titulación y se determinó un factor corrector "FL" que de nuevo tenía en cuenta este efecto, en la ecuación final de ajuste de los datos experimentales.

Con estos nuevos experimentos de titulación se pudieron revisar los valores de constantes de disociación de los complejos de SH3-Spc con p41, obteniéndose así valores más fiables para las mismas, que se usarían posteriormente como referencia para la realización de estudios de afinidad mediante otras técnicas. Estos valores se indican en la Tabla 5.2.2.

Los valores de las constantes de disociación obtenidos mediante este método son muy similares a los obtenidos con anterioridad a partir de los experimentos de titulación realizados por adición sucesiva de volúmenes, teniendo en cuenta los intervalos de error de ambos tipos de experimentos. Por otra parte, podemos concluir que no resulta necesario realizar el experimento de titulación empleando disoluciones independientes porque los resultados arrojados por los experimentos de titulación realizados por adición de volúmenes resultan ser perfectamente fiables y reproducibles. No obstante, estos últimos valores de K_d para las variantes natural y R21A del dominio, servirán de base para el diseño de otros experimentos de titulación seguidos por otras técnicas experimentales.

Tabla 5.2.2.: Valores de las constantes de disociación de los complejos formados entre la variante natural, WT, y la de mayor afinidad, R21A, del dominio SH3-Spc y el p41, a 25°C en condiciones de pH 3.0 obtenidos a partir de los experimentos de titulación realizados con disoluciones independientes para cada saturación de la proteína, seguidos por espectrofluorimetría.

VARIANTE	K_d (μ M)
WT	143 ± 18
R21A	67 ± 9

5.2.2.1. Diseño y estudio de nuevas construcciones mutantes múltiples del dominio SH3-Spc.

Finalmente, y con objeto de tratar de determinar la importancia de la secuencia de aminoácidos del giro *RT* en la afinidad de la unión del dominio al p41 y tratando de mimetizar esta zona del sitio de unión del dominio SH3-Abl en SH3-Spc, se diseñaron, produjeron y purificaron una serie de mutantes múltiples, realizados a partir de la variante R21S, a saber:

- P20D-R21S, mutante **DS**, en el que además del cambio de arginina a serina en posición 21, se mutaba la prolina 20 por aspártico.

- S19G-P20D-R21S, mutante **GDS**, que incluía las mutaciones anteriores (DS) y además se cambiaba la serina en posición 19 por glicina.
- S19G-P20D-R21N-E22T, mutante **GDNT**, en la que se “trasplantaba” la secuencia homóloga del giro *RT* del dominio SH3-Abl en el dominio SH3-Spc en estudio.

Con todas estas variantes se realizaron los experimentos de titulación por adición de volúmenes, y el resultado, en términos de constantes de disociación de los complejos proteína-ligando formados se indica en la siguiente tabla, Tabla 5.2.3:

Tabla 5.2.3.: Valores de las constantes de disociación de los complejos formados entre las diferentes construcciones mutantes múltiples del dominio SH3-Spc y el p41, a 25°C en condiciones de pH 3.0 y pH 7.0 obtenidos a partir de los experimentos de titulación realizados por adición de volúmenes, seguidos por espectrofluorimetría.

VARIANTE	pH 3.0	pH 7.0
	K_d (μ M)	K_d (μ M)
DS	153 \pm 19	62 \pm 6
GDS	186 \pm 14	48 \pm 5
GDNT	93 \pm 10	65 \pm 7

En ninguna de las tres variantes múltiples, sin embargo, se consiguió el objetivo buscado, esto es, ninguna de las tres mostró un incremento notable de la afinidad por el péptido con respecto a la variante R21S. En particular, a pH 3.0 se producen disminuciones de afinidad acusadas en algunas de las variantes, mientras que a pH 7.0 todas las variantes tienen afinidades bastante similares a R21S.

Esto nos lleva a la conclusión de que dotar de más flexibilidad al lazo *RT* mimetizando la secuencia de SH3-Abl no supone un incremento notable de la afinidad del dominio por el péptido y que incrementarla supone tener en cuenta otros factores, incluyendo la compleja red de interacciones cooperativas que se establecen a lo largo de toda la estructura del dominio. De nuevo, la ausencia de estructuras tridimensionales para las diferentes variantes dificulta enormemente la interpretación de estos resultados.

5.2.3. Estudio termodinámico del proceso de unión del dominio SH3-Spc al p41 por Calorimetría isotérmica de titulación (CIT).

En el apartado anterior, se han descrito los experimentos de titulación iniciales que se llevaron a cabo con todas y cada una de las variantes del dominio SH3-Spc en estudio y el decapeptido p41 seguidos mediante espectroscopía de fluorescencia. Dichos experimentos nos sirvieron para identificar cuál de las variantes diseñadas y producidas presentaba la mayor afinidad de todas por el p41 y que por tanto, era susceptible de un estudio posterior más profundo para tratar de determinar los parámetros termodinámicos del proceso de unión mediante el empleo de una técnica adecuada para ello, como lo es la Calorimetría Isotérmica de Titulación (CIT). Dos fueron las variantes escogidas para realizar dicho estudio termodinámico en profundidad: el mutante R21A, por ser el de mayor afinidad por el p41, y la forma natural, WT, que serviría como referencia.

De forma similar a como se hizo en el caso de las titulaciones seguidas por espectrofluorimetría, se escogieron como condiciones experimentales 25°C y dos valores de pH: 3.0 y 7.0. Ahora bien, con el fin de discriminar entre el calor implicado en el proceso de unión del ligando y el calor asociado a posibles procesos de protonación o desprotonación del tampón utilizado, concomitantes con el proceso de unión (ver apartado 4.3 de la sección de Materiales y Métodos), resulta necesario realizar los experimentos en un mínimo de tres tampones diferentes para un mismo valor de pH a cada temperatura escogida, teniendo en cuenta, eso sí, que las entalpías de protonación de cada uno de los tampones elegidos estén suficientemente separados entre sí. De esta manera, mediante una simple extrapolación a entalpía de protonación del tampón nula, se podrán determinar, los parámetros termodinámicos del proceso de unión, como ya se ha indicado, y además también podrán identificarse posibles efectos de ionización concomitantes al de unión, en los que el propio tampón esté implicado intercambiando protones con cualquiera de los dos integrantes del complejo.

En la tabla siguiente, tab. 5.2.4, se indican los tampones escogidos para cada uno de los valores de pH considerados así como los valores de sus entalpías de ionización a 25°C (Christensen et al., 1976):

Tabla 5.2.4.: Valores de las entalpías de ionización de los diferentes tampones empleados para la realización de los experimentos de titulación seguidos por calorimetría isotérmica, a 25°C y en el rango de pH escogido en cada caso.

	TAMPÓN	ΔH_i^{298} (kJ · mol ⁻¹)
pH 3.0	Ácido Monocloracético	- 4.2
	Glicina	4.1
	Pirazol	14.6
pH 7.0	Fosfato	5.1
	HEPES	21.0
	Imidazol	36.6

Debido a las características intrínsecas del sistema en estudio, especialmente por la relativamente baja afinidad por el péptido que presenta el dominio en estudio, todos los experimentos de titulación seguidos por CIT se realizaron de la misma manera, similar a como se realizaron las titulaciones seguidas por fluorescencia, con el método de adición de volúmenes diferentes (ver Apartado 5.2.2.), es decir, se fueron adicionando cantidades crecientes de una disolución stock de ligando, p41, de una concentración entre 4 y 5 mM sobre una disolución “madre” de proteína de una concentración en torno a 0.1 mM, empleando para ello la jeringa de inyección automatizada (inyector) del calorímetro. Previamente a cada experimento, la proteína se dializó extensivamente frente al tampón considerado en cada caso y el péptido p41 se disolvió en el mismo tampón reajustándosele el pH al valor correspondiente.

En la figura siguiente, fig. 5.2.8, se representan los termogramas de *dilución del ligando* (A), *unión* (B) y *neto* (C) de uno de los experimentos de CIT realizados. De esta manera, como se aprecia claramente en la figura cualquier titulación típica seguida por calorimetría isotérmica, como los realizados en esta memoria cuenta en realidad con dos experimentos diferentes, a saber:

- *Unión*, en el que se mide el calor puesto en juego en el proceso de interacción proteína-ligando.
- *Dilución del ligando*, en el que se mide el calor que se manifiesta cuando tiene lugar la dilución del ligando en el tampón correspondiente, de ahí la importancia de que el pH del tampón y el de la disolución del ligando sean

idénticos para evitar efectos indeseados de protonación-desprotonación del ligando ajenos al proceso de unión, que interferirían en la correcta determinación del calor de interacción neto, tal y como se ha indicado anteriormente.

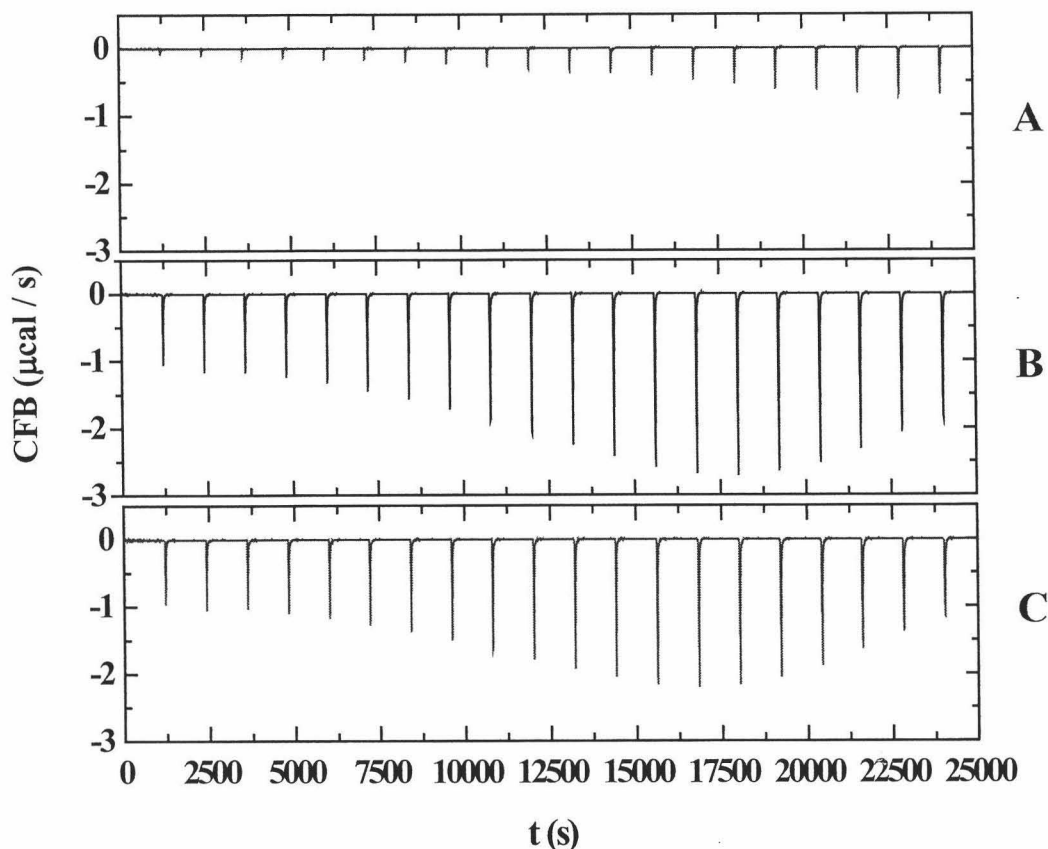


Fig. 5.2.8: Termogramas de dilución (A), unión (B) y neto (C) para el experimento de titulación de la forma natural, WT, del dominio SH3-Spc en 20mM glicina, pH 3.0 y 25°C de temperatura, seguido por calorimetría isotérmica de titulación (CIT). Tanto al termograma de dilución como al de unión se les ha restado ya la línea base instrumental para mayor claridad.

Una vez que se ha determinado el termograma diferencia neto, se integran los “picos de calor” del mismo, y se obtienen los calores individuales que corresponden a cada una de las inyecciones (adiciones) de ligando sobre la disolución de proteína. Cada uno de esos “calores” se normaliza por el incremento de número de moles totales de ligando en la célula de reacción ($\Delta\text{mol L}$) y finalmente se obtienen representaciones gráficas típicas de un experimento de titulación, similares a las que se representaban en el caso de las titulaciones espectrofluorimétricas, tales como las que se muestran en las figuras siguientes, figs. 5.2.9-a y 5.2.9-b, para los experimentos de titulación de las

variantes natural, WT, y R21A del dominio respectivamente, a pH 3.0 y 25°C de temperatura:

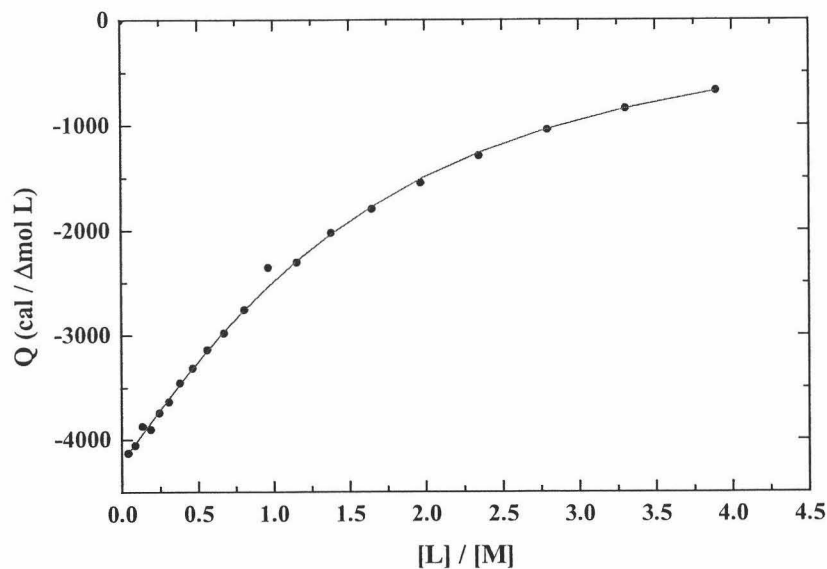


Fig. 5.2.9-a: Curva de titulación del experimento de unión del p41 a la forma natural, WT, del dominio SH3-Spc a pH 3.0 y 25°C. Los puntos representan a los calores individuales netos de interacción entre el dominio y el p41, normalizados por el incremento en el número de moles totales de ligando en la célula de reacción y la línea roja representa el ajuste por mínimos cuadrados a un modelo de un único sitio de unión (ver apdo. 4.3.3. de la sección de Materiales y Métodos).

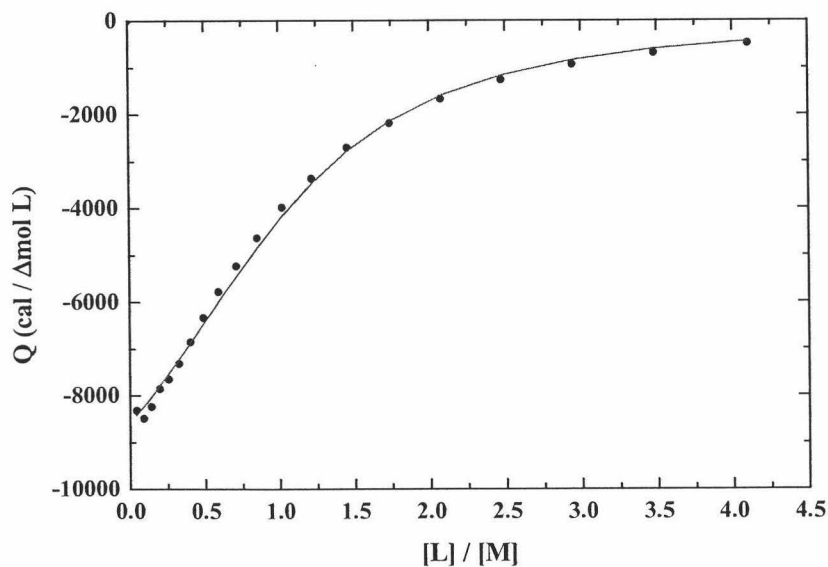


Fig. 5.2.9-b: Curva de titulación del experimento de unión del p41 a la variante R21A del dominio SH3-Spc a pH 3.0 y 25°C. Los puntos representan a los calores individuales netos de interacción entre el dominio y el p41, normalizados por el incremento en el número de moles totales de ligando en la célula de reacción y la línea roja representa el ajuste por mínimos cuadrados a un modelo de un único sitio de unión (ver apdo. 4.3.3. de la sección de Materiales y Métodos).

Del ajuste de los datos experimentales de calores individuales de interacción a la ecuación del modelo de un único sitio de unión, como corresponde a una interacción de este tipo, se extraen los parámetros termodinámicos del mismo, que aparecen indicados en la tabla siguiente, tab. 5.2.5:

Tabla 5.2.5: Valores de los parámetros termodinámicos asociados al proceso de unión entre las variantes R21A y natural, WT, del dominio SH3-Spc y el decapeptido p41, en condiciones de pH 3.0 y pH 7.0 y a 25°C de temperatura, obtenidos a partir de titulaciones seguidas por CIT.

pH 3.0				
Dominio	K_d (μM)	ΔG_d (kJ·mol⁻¹)	ΔH_d (kJ·mol⁻¹)	T·ΔS_d (kJ·mol⁻¹)
WT	175 ± 15	21.4 ± 0.2	44.3 ± 2.0	22.9 ± 2.2
R21A	54 ± 9	24.4 ± 0.4	55.3 ± 3.2	30.9 ± 3.6
pH 7.0				
	K_d (μM)	ΔG_d (kJ·mol⁻¹)	ΔH_d (kJ·mol⁻¹)	T·ΔS_d (kJ·mol⁻¹)
WT	184 ± 13	21.3 ± 0.2	45.6 ± 1.5	24.3 ± 1.7
R21A	57 ± 10	24.2 ± 0.4	57.8 ± 3.5	33.6 ± 3.9

De acuerdo con los resultados que se muestran en la tabla anterior, tab. 5.2.5, el mutante en posición 21, R21A, muestra más afinidad por el péptido que la variante natural, WT, con una constante de disociación del complejo aproximadamente tres veces más baja, lo cual está en buen acuerdo con los resultados obtenidos en las titulaciones previas realizadas con ambas variantes seguidas por espectrofluorimetría. No se aprecian prácticamente diferencias entre los valores de las constantes de disociación obtenidas en los dos valores de pH considerados, 3 y 7, teniendo en cuenta los intervalos de error de las mismas.

Las entalpías de disociación de cada una de las dos variantes son prácticamente independientes del pH, lo que indica que no intervienen procesos de protonación o desprotonación de grupos ionizables asociados al proceso de unión del péptido al dominio. Esto está de acuerdo con la ausencia de calor de protonación del tampón en los experimentos calorimétricos.

Según los valores de los parámetros termodinámicos obtenidos, se puede decir que la unión del p41 al dominio SH3-Spc en las dos variantes estudiadas está favorecida fundamentalmente por un incremento de entalpía fuertemente negativo, muy favorable, compensado parcialmente por un incremento de entropía desfavorable. Es bastante llamativo el valor especialmente alto de la entalpía de unión para ambas variantes, comparado con los valores publicados para la unión de ligandos ricos en prolina a otros dominios SH3 (Ladbury y Chowdhry, 1996), (Wang et al., 2001). Esta magnitud termodinámica es compatible con el establecimiento de una gran cantidad de interacciones en el sitio de unión (puentes de hidrógeno y contactos de van der Waals), que compensa con mucho la contribución de la entalpía de solvatación, positiva, que siempre acompaña a la unión del ligando.

El término entrópico que se opone al anterior se debe fundamentalmente a la pérdida neta de grados de libertad del sistema que acompaña al proceso de unión. A este término contribuye la pérdida de entropía (rotacional, traslacional y conformacional) que es concomitante con la inmovilización del péptido en el sitio de unión con una libertad conformacional restringida (en hélice de poliprolina II). También se ha descrito una contribución importante de pérdida de entropía conformacional del propio dominio SH3 que acompaña a la unión del ligando (Wang et al., 2001). Es llamativo que en una interacción de este tipo, que presenta un carácter hidrofóbico aparente muy acusado, la ganancia de entropía por desolvatación de las superficies hidrofóbicas, característica de este tipo de interacción, no se manifieste dominando el cambio de entropía global del proceso, como generalmente ocurre en la unión de ligandos muy hidrofóbicos (Velazquez-Campoy et al., 2000). De esto se puede deducir que la elevada entalpía de unión debe contener una contribución muy importante procedente de interacciones de naturaleza polar. En el apartado 5.2.1 se han descrito algunas de estas interacciones para el complejo entre SH3-Abl y p41. No obstante el número de estas interacciones polares visibles en la estructura de rayos X del complejo es pequeño para explicar el elevado valor de la entalpía de unión de este ligando por lo que se ha postulado la existencia de interacciones polares mediadas por moléculas de agua en la unión de este tipo de ligandos al dominio SH3-Abl (I. Luque, comunicación personal, 2003). Esto podría estar ocurriendo también en la unión de p41 a SH3-Spc, dado el carácter similar de las magnitudes termodinámicas de la interacción para ambos dominios.

Cuando se comparan las magnitudes termodinámicas de unión entre la variante natural, WT, y el mutante R21A, el carácter entálpico de la unión se acentúa para éste último en unos 11-12 kJ·mol⁻¹, con lo que el número y la fortaleza de las interacciones que se establecen entre el p41 y el dominio es claramente mayor. Este resultado es compatible con una mejor interacción del ligando con el bolsillo de especificidad, debido a la eliminación del impedimento estérico impuesto por la cadena lateral voluminosa de la arginina 21 presente en la variante WT. Éste era precisamente uno de los objetivos que se pretendía conseguir cuando se planteó el diseño de estos mutantes puntuales en posición 21 del dominio SH3-Spc. No obstante, también aparece un término entrópico mayor, opuesto al anterior, debido a que al hacerse la unión más íntima, la pérdida de grados de libertad debida a la unión, tanto del dominio como del péptido, es más elevada que la que tiene lugar en el caso de la forma natural, WT. De nuevo, la naturaleza de estas magnitudes termodinámicas indica que el carácter de las interacciones reforzadas por la mutación presenta un importante carácter polar.

En conclusión, las magnitudes termodinámicas de la unión entre el ligando p41 y el dominio SH3-Spc indican que la interacción entre estas dos moléculas tiene un carácter acentuadamente polar, que parece dominar el carácter hidrofóbico propuesto inicialmente para este tipo de interacción a la vista de las estructuras de los complejos. La mutación R21A localizada en la punta del lazo RT, que forma parte del llamado bolsillo de especificidad de los dominios SH3, da lugar a un aumento de afinidad motivado por la eliminación del impedimento estérico de la cadena lateral de arginina, lo que produce un refuerzo de interacciones, principalmente polares, en la región de especificidad del sitio de unión.

5.2.4. Estudio Termodinámico de la unión del dominio SH3-Spc al p41 por Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB).

Con objeto de completar lo máximo posible el estudio termodinámico del proceso de unión del péptido p41 al dominio SH3-Spc, se realizó un estudio de titulación del mutante R21A, el de mayor afinidad, seguido por *calorimetría diferencial de barrido* (CDB), registrando las trazas de desnaturalización térmica del dominio

mutante en presencia del péptido, para diferentes grados de saturación con el mismo. Posteriormente se analizaron conjuntamente todas esas trazas utilizando un modelo común de análisis de cual se pudo completar la caracterización termodinámica de la unión, con la obtención del *cambio en capacidad calorífica* asociada al proceso de unión, ΔC_p , que se relaciona fundamentalmente con los cambios de solvatación asociados a la unión (Murphy y Freire, 1992), (Murphy et al., 1993), (Gomez y Freire, 1995; Gomez et al., 1995). Esta magnitud termodinámica se puede obtener también, y así se hace habitualmente, mediante estudios de CIT realizados de forma similar a como se han descrito en el apartado anterior, apdo. 5.2.3, a diferentes temperaturas, a partir de la dependencia con la temperatura del ΔH asociado a la unión.

Los experimentos de calorimetría de barrido a diferentes grados de saturación con el ligando se realizaron de manera similar a como se hizo con aquéllos en los que se estudió el desplegamiento térmico de cada una de las variantes del dominio. En estos experimentos las muestras estaban constituidas por una concentración fija de proteína y una serie de concentraciones de péptido necesarias para alcanzar diferentes grados de saturación de aquélla. Previamente a realizar las mezclas, la proteína se había dializado extensivamente frente al tampón 20mM glicina pH 3.0 y el péptido se disolvió en el tampón del cambio de diálisis de la misma, reajustándosele el pH posteriormente hasta el valor correcto, 3.0. En todas las muestras la concentración de proteína se mantuvo constante a un valor de 0.14mM mientras que la concentración de péptido total en cada una de ellas se hizo variar desde 0 a 1.42mM, de manera que se barría un intervalo de saturaciones que oscilaba entre la proteína libre y una saturación máxima situada por encima del 90%. Para estimar *a priori* dichos grados de saturación se consideró el valor de la constante de unión a 25 °C y pH 3.0 obtenida a partir de los experimentos de CIT con el mutante R21A, de manera que se prepararon las mezclas considerando saturaciones aproximadas al 0, 20, 40, 60, 80 y 95%. Tras medir las concentraciones de las disoluciones madre de proteína y péptido, se pudo determinar la *razón molar*, r , como relación entre las concentraciones de péptido y proteína en cada muestra. Las muestras se calentaron entre 3 y 110°C y se registró el termograma correspondiente a una velocidad de barrido de 1 K·min⁻¹.

En la figura siguiente, fig. 5.2.10, se representan las curvas de diferencia de capacidad calorífica molar con respecto a la disolución tampón (que podemos llamar capacidad calorífica aparente, ΔC_p) de las diferentes disoluciones del mutante R21A de dominio SH3-Spc a diferentes grados de saturación con el ligando p41.

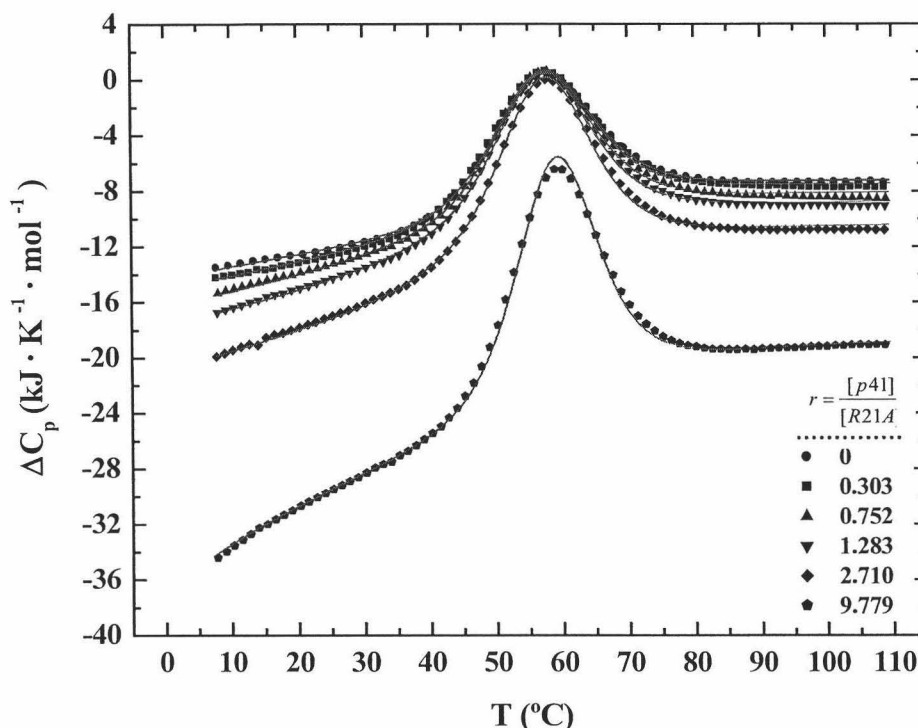
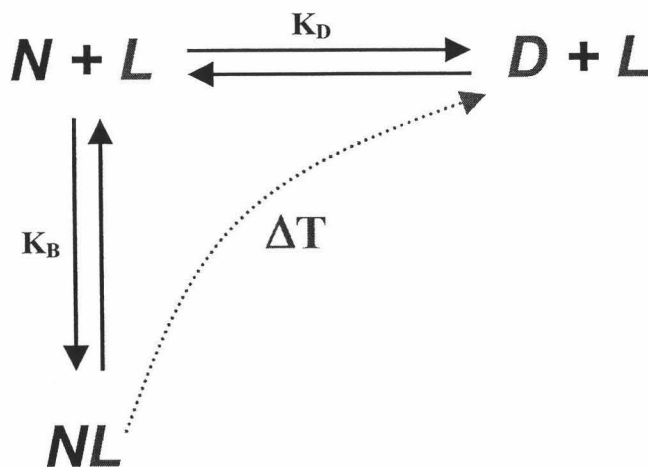


Fig. 5.2.10: Termogramas de desplegamiento de las diferentes muestras del mutante R21A del dominio SH3-Spc en presencia del péptido p41. En la figura se representan los valores experimentales (símbolos) del cambio de capacidad calorífica, C_p , con la temperatura de para cada valor de "razón molar", r , estudiada y los ajustes múltiples (líneas rojas continuas) de los mismos.

Como se aprecia en la figura anterior, fig. 5.2.10, existe un desplazamiento de las curvas de ΔC_p hacia valores más negativos en el eje de ordenadas a medida que el valor de la razón molar, r , se incrementa, esto es, conforme la saturación del dominio se va haciendo mayor. Este hecho se debe a que a medida que la concentración de péptido aumenta se reduce la capacidad calorífica de la disolución debido al incremento en el volumen de agua excluido por el péptido en disolución.

Otra observación importante es que conforme aumenta el grado de saturación, las transiciones de desplegamiento del dominio se hacen más agudas, esto es, aumenta la entalpía ya que a la entalpía de desplegamiento del dominio se suma ahora la entalpía debida al proceso de disociación del complejo formado, que también es un proceso endotérmico.

El análisis conjunto de esta serie de termogramas se realizó utilizando un modelo sencillo, cuyo desarrollo matemático se encuentra detallado en el apéndice V, en el que se suponen dos únicos procesos acoplados que tienen lugar, a saber, la unión del ligando y el desplegamiento. De forma muy sencilla, se puede describir el modelo propuesto como se detalla en el siguiente esquema, fig. 5.4.11:



*Fig. 5.2.11.: Modelo sencillo del proceso acoplado que tiene lugar dentro de la célula calorimétrica, donde **N** representa al estado nativo del dominio R21A, **D** representa al estado desplegado del mismo y **L** representa al ligando peptídico p41. El equilibrio de desplegamiento se rige por la constante K_D y el de unión por la constante K_B . La línea punteada muestra el estado que se favorece cuando la temperatura se eleva.*

De acuerdo con este esquema, ambos procesos están acoplados y se dan al mismo tiempo, pero a medida que la temperatura se eleva, se favorece el estado **D** sobre el estado **N**, con lo que el equilibrio de unión se desplaza a su vez hacia atrás, reduciéndose así la proporción de péptido unido con respecto al que se encuentra libre en disolución.

En la figura anterior, fig. 5.4.11., se aprecia asimismo que los datos experimentales se ajustan muy bien al modelo propuesto. En el ajuste global por

mínimos cuadrados no lineales de los datos experimentales obtenidos con el modelo propuesto anteriormente (fig. 5.2.10) se han fijado en la ecuación de ajuste los valores de la constante de unión, K_B , y de la entalpía de unión, ΔH_B , ambos a 25 °C, utilizando los valores promedio obtenidos de los experimentos de calorimetría isotérmica de titulación (CIT) realizados en las mismas condiciones experimentales. Asimismo, se han fijado los parámetros termodinámicos del proceso de desplegamiento utilizando los valores obtenidos a partir del ajuste del termograma correspondiente a la forma libre del dominio mediante el modelo de dos estados. Una vez fijos todos estos parámetros, del ajuste global se obtuvo el cambio de capacidad calorífica asociada al proceso de unión que tiene lugar, $\Delta C_{p,B}$, como una función de la temperatura, que resulta ser de $-1.34 \pm 0.01 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ a 25°C. Este valor de $\Delta C_{p,B}$ negativo está de acuerdo con la estructura de este tipo de complejos péptido-proteína en los que tiene lugar un enterramiento de restos mayoritariamente hidrofóbicos. No existen datos previos de $\Delta C_{p,B}$ para la unión de péptidos a dominios SH3-Spc en la bibliografía. Sin embargo, estudios similares realizados en nuestro grupo de investigación con el dominio SH3-Abl y el péptido p41 resultan en valores similares de $\Delta C_{p,B}$ (Luque, I. *comunicación personal*, 2003), lo cual da fiabilidad a los resultados presentados en esta Memoria.

Considerando el valor del $\Delta C_{p,B}$ obtenido de este estudio de titulación seguido por CDB y teniendo en cuenta los valores de los demás parámetros termodinámicos obtenidos mediante los estudios de CIT realizados con anterioridad, podemos establecer la dependencia de cada uno de ellos con la temperatura, tal y como se aprecia en las figuras siguientes. Así, en la figura 5.2.12 se representan las dependencias de los parámetros $\Delta C_{p,B}$, ΔH_B , $T\cdot\Delta S_B$ y ΔG_B .

De forma similar se pueden realizar representaciones de las dependencias con la temperatura de la constante de unión, K_B o de las poblaciones de las tres especies presentes en el medio para los diferentes valores de *razón molar*, r , explorados, tal y como se indica en la figura 5.2.13.

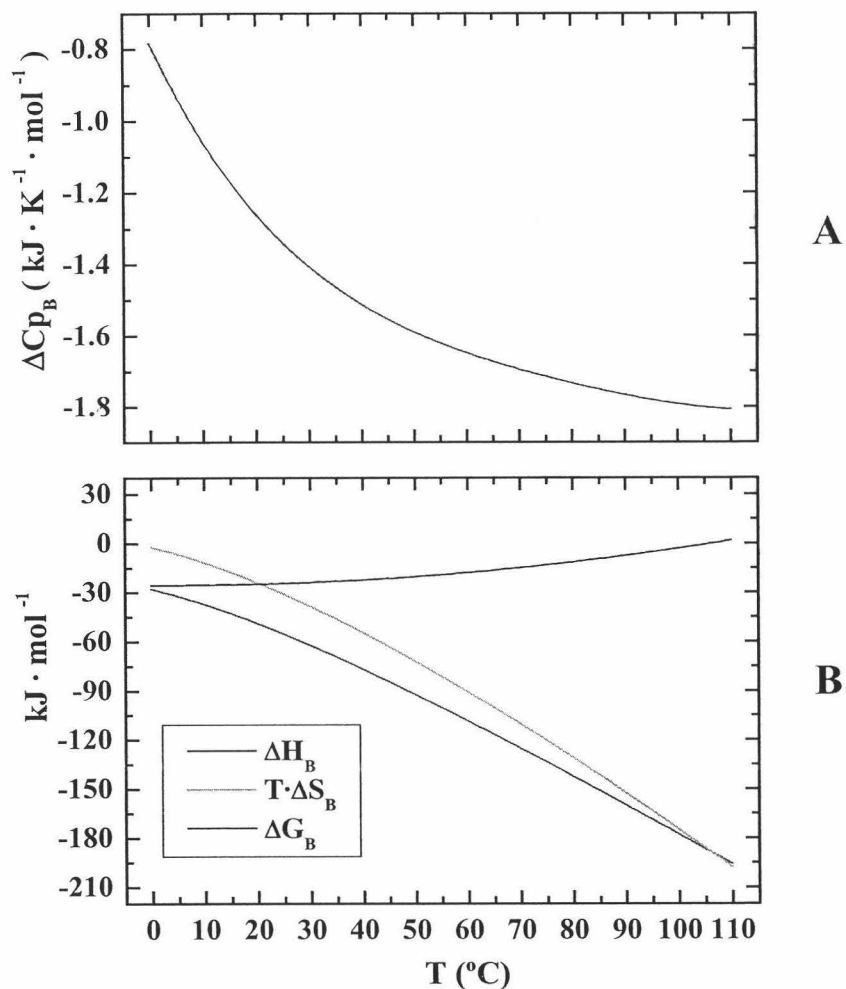


Fig. 5.2.12: Representaciones gráficas de la dependencia con la temperatura del cambio de capacidad calorífica, $\Delta C_{p,B}$, (panel A) la entalpía, ΔH_B , la entropía, ΔS_B y la energía libre de Gibbs, ΔG_B , (panel B) de unión. Estas representaciones se han obtenido por simulación de dichos parámetros en el intervalo de temperaturas de un experimento de CDB como los que se han realizado, teniendo en cuenta los valores experimentales de los mismos, a 25 $^{\circ}\text{C}$.

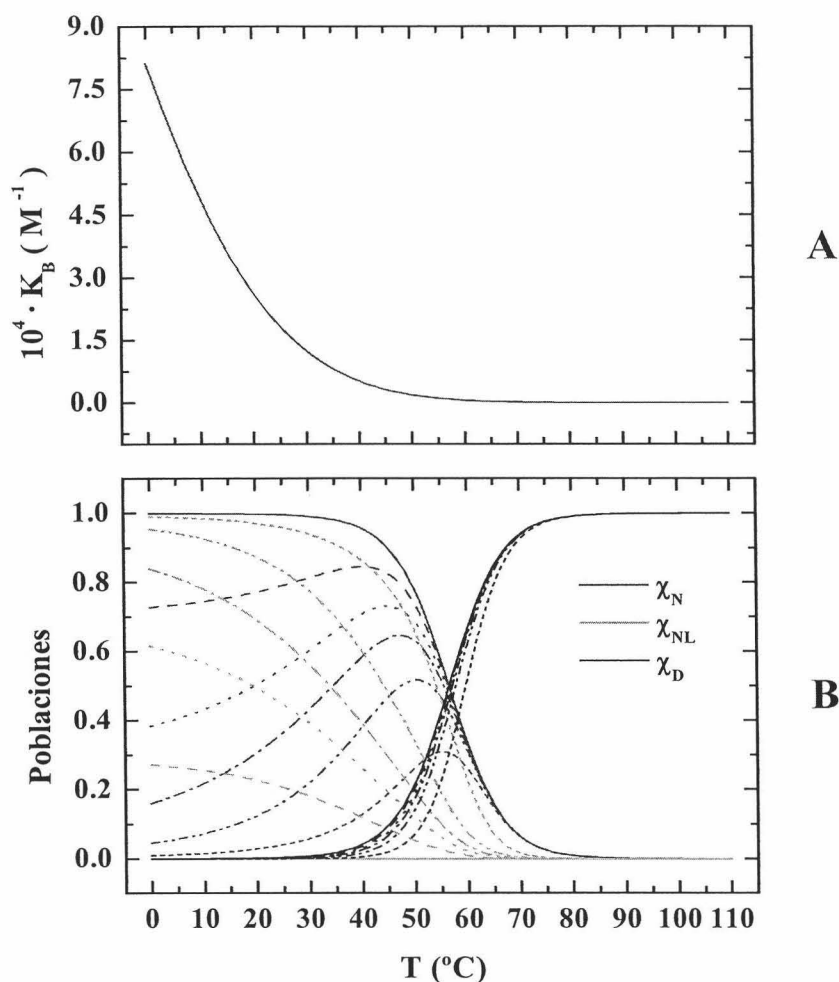


Fig. 5.2.13: Representaciones gráficas de la dependencia de la constante de unión, K_B , (panel A) y de las poblaciones de las tres especies presentes en el medio, N , NL y D (panel B), con la temperatura. Las poblaciones de las tres especies se representan asimismo en función de la razón molar, r , de cada muestra considerada, aumentando ésta a medida que el punteado de la línea correspondiente se hace más fino. Las representaciones se han obtenido por simulación de dichos parámetros en el intervalo de temperaturas de un experimento de CDB como los que se han realizado, teniendo en cuenta el valor obtenido para K_B a $25^{\circ}C$.

Según se aprecia en la figura 5.2.12, a medida que la temperatura se incrementa, tiene lugar un ligero descenso en el valor del $\Delta C_{p,B}$ (panel A), aunque manteniéndose siempre en valores negativos, lo cual está en perfecto acuerdo con el enterramiento mayoritario de superficie hidrofóbica con la unión. Los valores negativos del $\Delta C_{p,B}$ da como resultado principal que el cambio de entalpía asociado a la unión, ΔH_B , descienda progresivamente con la temperatura haciéndose más y más negativo (ver panel B). Por la misma razón, el término entrópico, $T\Delta S_B$, también se hace cada vez más negativo (panel B), existiendo en todo momento una fuerte compensación entalpía-entropía para este proceso de unión. Este término entrópico decrece más rápidamente que el término

entálpico, de manera que finalmente resulta en un ΔG_B que aumenta a medida que lo hace la temperatura. Como consecuencia de ese incremento en el valor de ΔG_B a medida que aumenta la temperatura se aprecia como la constante de unión del péptido al dominio (fig. 5.2.13-A) se hace cada vez más pequeña y por tanto la unión es cada vez más débil, lo cual está de acuerdo con el carácter exotérmico del proceso de unión.

En cuanto a lo que se refiere a las poblaciones de las especies libre (N), complejada (NL) y desplegada (D) (fig. 5.2.13-B), los mayores cambios se sitúan en la zona de baja temperatura, esto es, por debajo de la temperatura de desplegamiento, T_m , ya que a baja temperatura las especies N y NL coexisten en proporciones mucho más elevadas que la de la especie D que sólo comienza a hacerse notable cuando la temperatura se eleva por encima de la T_m . De esta manera, a temperaturas relativamente bajas el equilibrio predominante se establece entre las especies N y NL, es decir el equilibrio unión-disociación, pero a medida que la temperatura se eleva, el equilibrio anterior se desplaza hacia el de desplegamiento-plegamiento entre las especies N y D, liberándose ligando, L, al medio, tal y como se indica en la figura 5.2.13-B.

Los resultados presentados en este Apartado indican que mediante la utilización combinada de las calorimetrías CIT y DSC ha sido posible la caracterización termodinámica completa del proceso de unión de p41 al mutante R21A del dominio SH3, incluyendo las dependencias con la temperatura de sus magnitudes termodinámicas, lo que simplifica de manera muy significativa el procedimiento experimental para alcanzar dicho objetivo.

Las magnitudes termodinámicas obtenidas son características de una interacción dominada por una entalpía fuertemente negativa, compensada parcialmente por un cambio de entropía también muy negativo, como ocurre generalmente en los procesos de plegamiento de las proteínas, y que indica que existe una importante contribución de interacciones de naturaleza polar a dicha interacción. No obstante, el carácter parcialmente hidrofóbico de la unión, claramente apreciable al analizar las estructuras de los complejos SH3-péptido, se manifiesta en un incremento de capacidad calorífica negativo, compatible con un enterramiento considerable de superficie hidrofóbica concomitante con la unión.

5.2.5. Estudio del proceso de unión del mutante R21A del dominio SH3-Spc al decapeptido p41 por resonancia magnética nuclear (I). Efecto de la unión sobre los desplazamientos químicos del dominio.

El objetivo último de estos estudios es determinar cómo la unión del ligando peptídico p41 afecta la estabilidad de las diferentes regiones de la estructura del dominio SH3-Spc, es decir, cómo las interacciones que se establecen en la interfase de unión se transmiten cooperativamente a través de la estructura del dominio. Para ello se han comparado los resultados de los estudios de IHD seguidos por RMN con el dominio en cuestión, en este caso del mutante R21A, previamente identificado como el de mayor afinidad por el p41, tanto en su forma libre como en condiciones de alta saturación con el ligando.

Sin embargo, antes de acometer dicho estudio de IHD era preciso asignar de manera inequívoca, todas y cada una de las señales de cruce $\text{CH}_\alpha\text{-NH}$ de la zona de la “huella dactilar” de los espectros de RMN correspondientes al dominio mutante R21A tanto en su forma libre como en el complejo con p41, ya su intensidad es el observable físico que permite seguir la cinética del proceso de IHD. Por otra parte, debido al elevado número de prolinas del péptido p41 y a que el intercambio químico entre la forma libre y la forma unida es muy rápido, no fue posible asignar correctamente las señales de RMN del mismo.

Se prepararon disoluciones *madre* de proteína y de ligando, en tampón glicina deuterada a pH 3.0 (ver apartado 4.5.9.3. de la sección de Materiales y Métodos), de elevada concentración y, a partir de ellas se prepararon más tarde muestras mixtas de ambos en las que la concentración de proteína se mantuvo constante a 1.73 mM y se fue incrementando la de ligando para alcanzar grados de saturación crecientes de la proteína, hasta alcanzar un valor superior al 90%. Posteriormente se registraron una serie de espectros bidimensionales TOCSY, con un tiempo de mezcla de 76ms, para cada una de las muestras mixtas preparadas, y un par de espectros NOESY, con un tiempo de mezcla de 120ms, en este caso sólo para las muestras “libre” y de “máxima saturación”. Todos los espectros se registraron en mezclas 7% D_2O :93% H_2O y a 25°C. Los experimentos se llevaron a cabo en colaboración con el Dr. Nico A.J. van Nuland

en un espectrómetro Bruker Avance DRX-750 perteneciente al *Bijvoet Center for Biomolecular Research* de la Universidad de Utrecht (Holanda), con la financiación del Programa de “Acceso a Infraestructuras de Investigación” de la Unión Europea.

Para asignar cada una de las señales correspondientes a los diferentes restos del mutante en estudio, R21A, para cada grado de saturación, se empleó una estrategia comparativa análoga a la empleada en su día para asignar cada una de las señales correspondientes a los residuos de las diferentes variantes del dominio estudiadas, con la salvedad de que en este caso, se empleó la asignación de los espectros del mutante R21A libre realizada, como patrón para asignar los correspondientes a las muestras complejas R21A-p41 (ver aptdo. 5.1.3 de esta sección).

En este estudio, se empleó dioxano ($\delta=3.741\text{ppm}$) como referencia interna. Sin embargo, dada la heterogeneidad de las muestras preparadas y la conveniencia de realizar la titulación en condiciones similares a las realizadas con anterioridad, se añadió dicha sustancia sólo a la muestra de proteína libre, se identificó en el espectro de dicha muestra la señal del agua a 4.768 ppm y finalmente se mantuvo dicha señal del agua, en esa posición, como referencia para los sucesivos espectros registrados a cada valor de saturación de la proteína. Los valores de los desplazamientos químicos, δ , correspondientes a las señales de cruce $\text{CH}_\alpha\text{-NH}$ de cada uno de los restos del mutante R21A a cada grado de saturación del mismo se indican de forma detallada en el apéndice III.

Además, según se ha indicado con anterioridad, gracias a la fuerte dependencia del valor del desplazamiento químico, δ , con el entorno químico en el que se encuentra el protón (espín), dicho parámetro es una importante fuente de información estructural y puede emplearse para identificar alteraciones en la estructura de las proteínas (ver Apartado 5.1.3 de esta sección), como pueden ser las provocadas por la unión de la proteína a un cierto ligando.

En la figura siguiente, fig. 5.2.14, se representan, superpuestas, las regiones de los espectros TOCSY correspondientes a la huella dactilar, esto es, a los picos de cruce $\text{CH}_\alpha\text{-NH}$, del complejo R21A-p41 a cada grado de saturación estudiado, así:

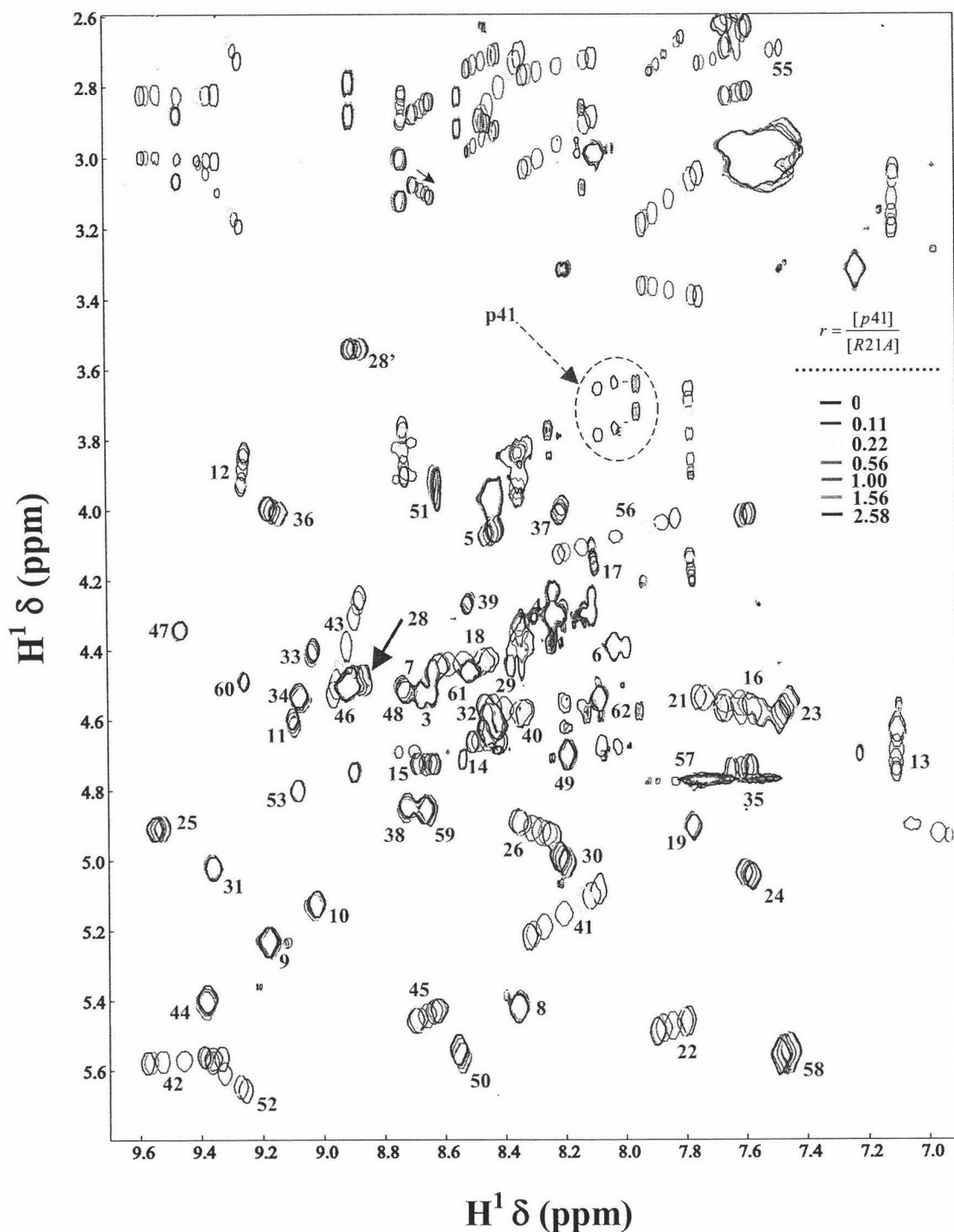


Fig. 5.2.14: Superposición de la región de la "huella dactilar" de los espectros TOCSY registrados para los seis grados de saturación considerados, además del estado libre, en el estudio de titulación realizado. En la leyenda adjunta se indica el valor de la razón molar en cada punto de saturación. Asimismo se indica también a qué resto de la proteína corresponde cada señal de cruce $\text{CH}_\alpha\text{-NH}$ de dichos espectros.

En la figura anterior, fig. 5.2.14, se aprecia cómo existen restos del dominio para los que los picos de cruce $\text{CH}_\alpha\text{-NH}$ que se ven desplazados por efecto de la unión del ligando mientras que otros prácticamente no se ven perturbados, como demuestra el

hecho de que las señales de cruce $C_{\alpha}H-NH$ correspondientes a tales residuos en los sucesivos espectros registrados, se encuentran prácticamente solapadas. Es más, incluso aquéllos que se alteran, como se observa por el desplazamiento sucesivo de sus señales de cruce correspondiente, no lo hacen de igual forma en su totalidad. Todo ello se puede apreciar con más facilidad si representamos gráficamente los *desplazamientos químicos relativos*, $\Delta\delta$, de cada uno de los restos del dominio, considerando como referencia los desplazamientos químicos del dominio libre. Así se indica en la figura siguiente, fig. 5.2.15, tanto para los desplazamientos químicos de los protones amida (NH) como para los de los protones alfa ($C_{\alpha}H$).

Teniendo en cuenta esta figura, se hace patente que no todas las regiones del dominio se afectan de igual manera por efecto de la unión del mismo al ligando p41. Así, los cambios más significativos en el desplazamiento químico del protón asociado al C_{α} se observan en la zona del largo lazo RT, el comienzo de la hebra β -III, el pequeño segmento de hélice 3_{10} y finalmente la F52, tal y como era de esperarse dado que todas estas regiones forman parte de elementos estructurales implicados en la unión al ligando p41. También se aprecian algunos efectos ligeros a mayor distancia del “sitio de unión” en ciertos residuos como puede ser la T37, al comienzo del lazo n-Src. Considerando que el desplazamiento químico del protón asociado al C_{α} es sensible a alteraciones en los ángulos ϕ y ψ del grupo peptídico, se puede concluir que la estructura del dominio se ve alterada por la unión del ligando p41 en muy pequeña medida, salvo en las regiones indicadas anteriormente, que forman parte, todas y cada una de ellas de la superficie del sitio de unión. No obstante, dado el carácter de la interacción SH3-p41 que implica bastantes grupos aromáticos, posibles cambios en las orientaciones de dichos anillos aromáticos producidos por la unión del ligando, podrían estar afectando de manera importante a los desplazamientos químicos por efecto de las corrientes de anillo [Wishart, 2001 #345]. De hecho, los mayores cambios en los desplazamientos químicos se observan para protones $C_{\alpha}H$ que se encuentran próximos en el espacio a grupos aromáticos implicados en la interacción con el ligando. Es, por tanto, plausible que los cambios conformacionales de la cadena principal del dominio inducidos por la unión del ligando sean muy reducidos excepto para la región más flexible del lazo RT.

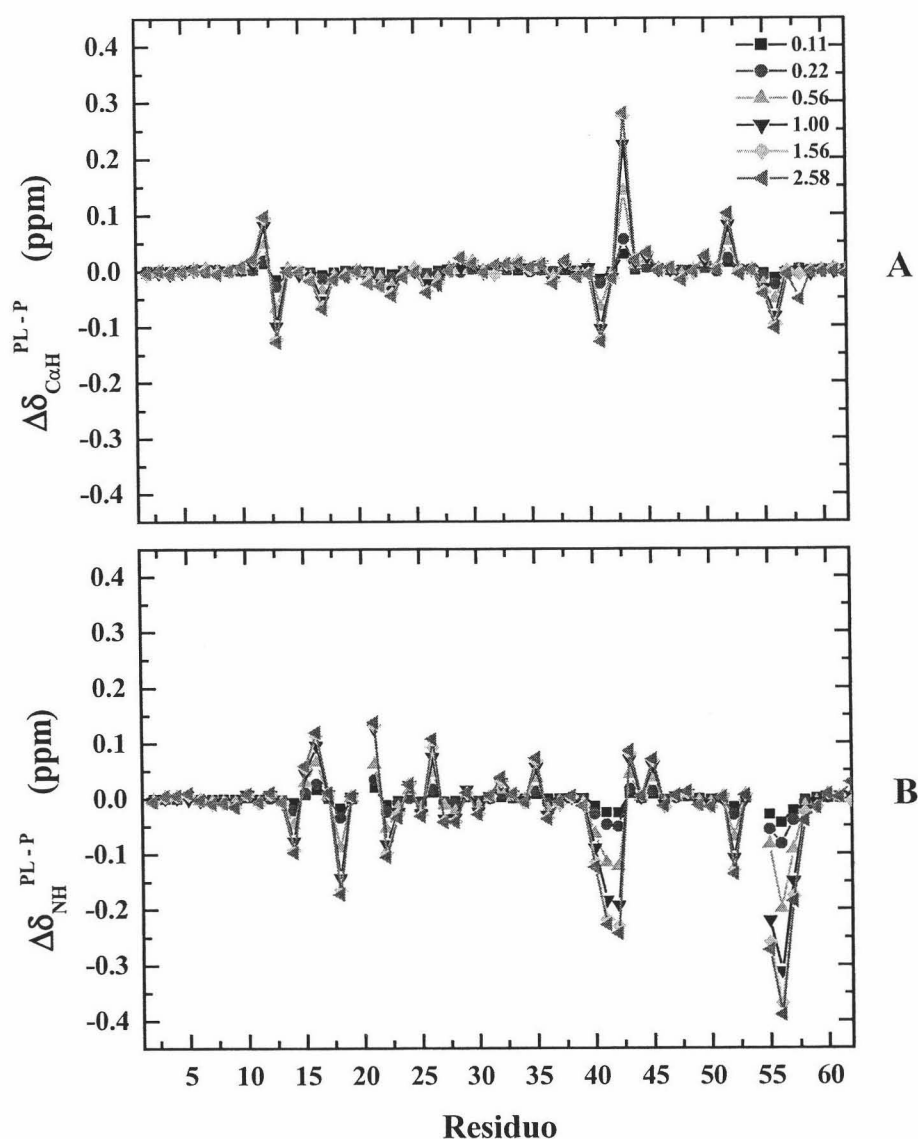


Fig. 5.2.15: Representaciones del cambio en desplazamiento químico, $\Delta\delta$, de los diferentes residuos del mutante R21A en presencia del ligando p41 para cada uno de los residuos del mismo a cada grado de saturación estudiado, denotados a partir de la razón molar, r , que se indica en la leyenda. Todos los estados complejos R21A-p41, se denotan como PL. y, en todos los casos, se ha considerado como estado "referencia" el estado libre, P. El panel superior, A, se refiere al $\Delta\delta$ en la dirección F2 del espectro (C_{α}) mientras que el panel inferior, B, se refiere al $\Delta\delta$ en la dirección F1 (NH) del mismo. Los huecos en la gráfica indican restos que no ha sido posible identificar, debido a efectos de solapamiento, ya sea con otro resto o con el agua.

Por otra parte, se observa claramente que la alteración en el desplazamiento químico, $\Delta\delta$, de los protones NH de los diferentes residuos del dominio es más acusada que en el caso de los protones $C_{\alpha}H$. Sin embargo, el desplazamiento químico del protón asociado al nitrógeno amida es sensible a otros factores además de los mencionados anteriormente, como pueden ser el que esté o no implicado en la formación de enlaces de hidrógeno así como la fortaleza de los mismos. Por esta razón la interpretación de los cambios en los desplazamientos químicos de los protones NH es más complicada. No

obstante, los mayores cambios se observan a grandes rasgos en las mismas regiones que para los protones $C_{\alpha}H$ y de nuevo los efectos de cambios en las orientaciones de los grupos aromáticos producidas por la interacción con el ligando podrían estar dominando los cambios en los desplazamientos químicos más acusados.

Dado lo complicado de la interpretación de las variaciones en los desplazamientos químicos hemos tratado de simplificar dicha información calculando para cada residuo la raíz cuadrada del valor cuadrático medio (RMS) entre los cambios en los desplazamientos químicos de cada tipo de protón, el $C_{\alpha}H$ y el NH . Los valores RMS de los cambios en los desplazamientos químicos se representan en la figura siguiente, fig. 5.2.16, para el estado correspondiente al mayor grado de saturación del dominio, sobre la estructura tridimensional del dominio SH3-Spc natural (WT), ya que la estructura del mutante R21A, está aún en fase de resolución. De esta manera se podrá apreciar aún con más claridad qué regiones del dominio se ven más afectadas por efecto de la unión al ligando p41.

En esta representación modelo, fig. 5.2.16, se puede apreciar cómo precisamente las regiones de la cadena principal del dominio cuyos valores de desplazamiento químico cambian de forma más acusada como consecuencia de la unión del ligando p41 son precisamente aquéllas que se encuentran en el sitio de unión, particularmente cercanas a las cadenas laterales aromáticas que intervienen en la interacción, lo que refuerza la hipótesis que la reordenación de estos anillos aromáticos producida por la unión del ligando podría ser un factor importante en los cambios en el desplazamiento químico observados. Aunque existen ligeras alteraciones en otras regiones del dominio, incluso en regiones alejadas del sitio de unión, éstas suelen ser menores de 0.05 ppm, lo que sugiere que los cambios conformacionales inducidos por la unión del ligando son muy reducidos.

Como excepción hay una región en la que los cambios en desplazamientos químicos son bastante apreciables, el largo lazo RT, incluso en restos que no se encuentran cerca de grupos aromáticos. Esto indica que la conformación de esta zona flexible del dominio se afecta por la interacción del ligando, lo que sugiere que el ligando establece contactos con dicha región y está de acuerdo con el papel importante

del lazo RT en la especificidad de la unión de este tipo de ligandos. Un cambio conformacional considerable en el lazo RT del dominio SH3-Abl con la unión de p41 también se observa al comparar las estructuras tridimensionales del complejo y la forma libre de este dominio (Pisabarro y Serrano, 1996).

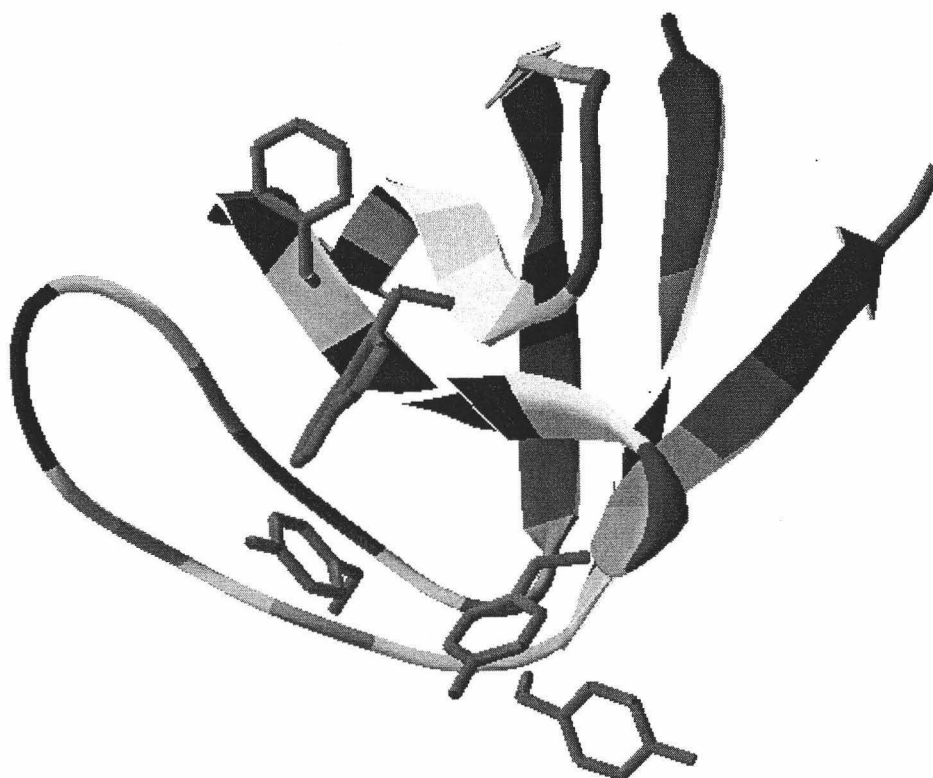


Fig. 5.2.16.: Representación en código de colores de la raíz cuadrada de los valores cuadráticos medios (RMS) de los cambios en el desplazamiento químico de los protones C α H y NH del mutante R21A producidos por la unión del ligando p41. Los valores van en sentido creciente del azul (0 ppm) al rojo (> 0.15 ppm). Se han resaltado en color magenta las cadenas laterales de restos aromáticos implicados en el sitio de unión del ligando.

5.2.6. Estudio del proceso de unión del mutante R21A del dominio SH3-Spc al decapeptido p41 por resonancia magnética nuclear (II). Efectos de la unión sobre el intercambio Hidrógeno-Deuterio del dominio.

Hasta ahora se ha descrito la caracterización termodinámica de la unión del decapeptido de síntesis p41 al mutante R21A del dominio SH3-Spc a partir de los estudios de unión realizados por *Calorimetría Isotérmica de Titulación* (CIT) y de *Calorimetría Diferencial de Barrido* (CDB). De estos resultados se han obtenido todos los parámetros termodinámicos que describen dicho proceso de unión; ahora bien, dado que tanto la CDB como la CIT, son técnicas macroscópicas, no pueden discriminar la manera en que la estabilidad de cada región diferente del dominio se ve afectada por efecto de la unión al ligando al mismo. Uno de los objetivos de este trabajo de investigación era precisamente determinar el efecto de la unión de este ligando peptídico sobre las rutas de cooperatividad del dominio SH3-Spc y para ello, era preciso abordar el estudio de unión desde un punto de vista microscópico.

Gracias a los experimentos de IHD seguidos por RMN de alta resolución, es posible medir el incremento en la protección de cada residuo del dominio frente al intercambio con el disolvente de manera individualizada por efecto de la interacción del mismo con el p41 y, de este modo, determinar posteriormente la contribución del proceso de unión al valor de la energía libre de Gibbs aparente de intercambio (ΔG_{ex}) de cada residuo del dominio.

Así, de forma análoga a como se hizo en el caso de los estudios de IHD con los diferentes mutantes diseñados y producidos del dominio SH3-Spc, se compararon los valores de ΔG_{ap} obtenidos para el complejo R21A-p41, en condiciones de alta saturación, con los valores de ΔG_{ap} obtenidos para el mutante R21A libre. De este modo se han calculado los incrementos en ΔG_{ap} debido al proceso de unión, que denotaremos como $\Delta\Delta G_{ap,B}$.

En el experimento de IHD con el complejo R21A-p41 las señales de cruce CH_{α} -NH del p41 no se pueden seguir adecuadamente por la razones mencionadas en el

Apartado anterior. Por esta razón sólo se han seguido las cinéticas de IHD de los hidrógenos amida de la proteína. Por otro lado, la cinética de formación del complejo, tal y como demuestran experimentos previos realizados mediante espectroscopía de fluorescencia (datos no mostrados) es extremadamente rápida ya que el equilibrio de unión se establece en una escala de tiempos inferior a los 10s, mucho menor que la escala de tiempos en la que tiene lugar el intercambio de la proteína con el disolvente, de manera que se puede asegurar que el tiempo de establecimiento del equilibrio de unión no afecta significativamente los resultados del IHD del complejo R21A-p41, que es precisamente lo que nos interesa.

La primera consecuencia de la interacción entre el dominio y el péptido es el notable incremento en la estabilidad del mismo, tal y como se ha podido observar en los experimentos de titulación seguidos por CDB descritos anteriormente (ver aptdo. 5.2.4.), lo que se traduce en un incremento notable en la escala de tiempos en la que tiene lugar el intercambio de todos los hidrógenos amida del dominio saturado con ligando en relación con el intercambio del dominio libre. Este hecho se puede apreciar con claridad en la figura siguiente, fig. 5.2.17., en la que se representan las cinéticas de intercambio de algunos restos del dominio, escogidos arbitrariamente, tanto para la forma libre del mismo (panel superior, A) como para la forma saturada con p41 (panel inferior, B):

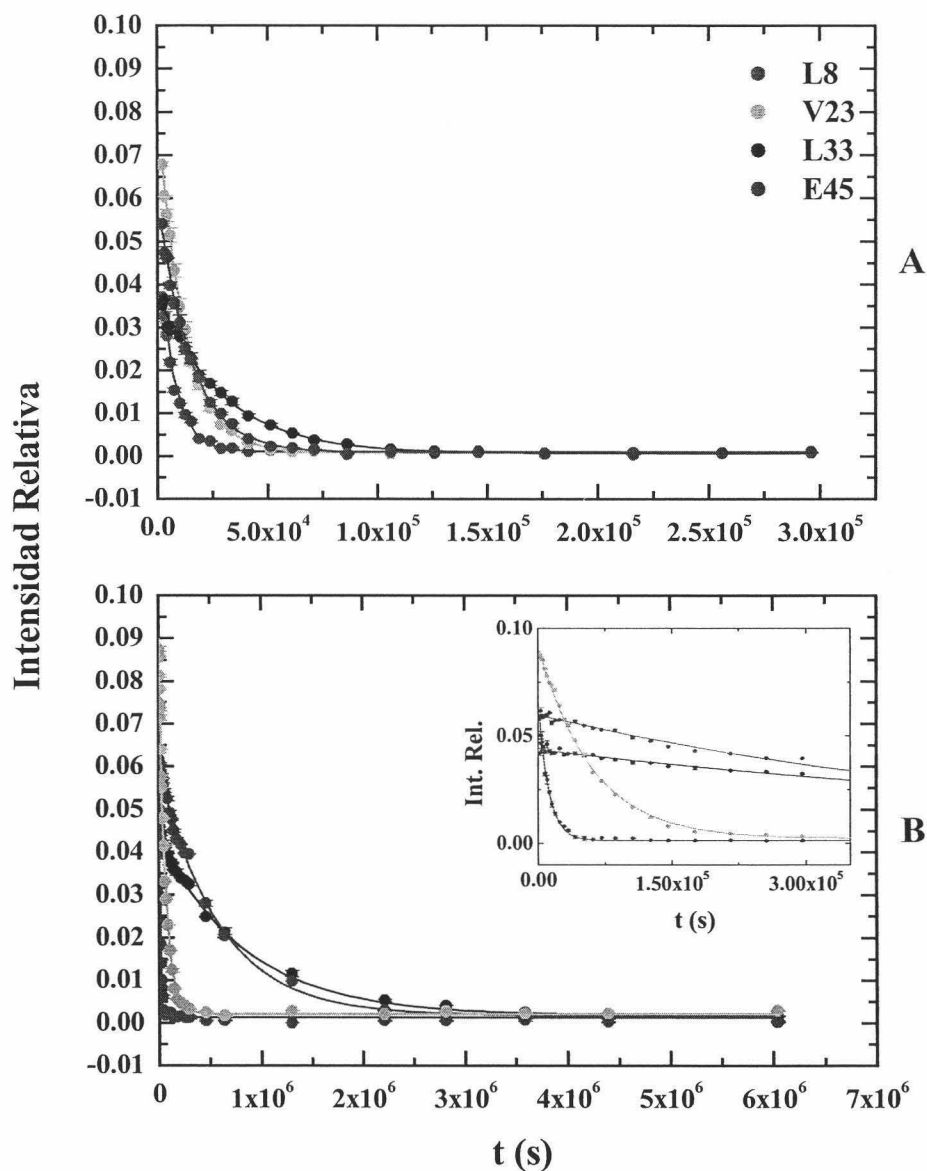


Fig. 5.2.17.: Representaciones gráficas de la disminución en la intensidad de los picos de cruce $CH_{\alpha}-NH$ de algunos residuos localizados en diferentes regiones del dominio frente al tiempo, tanto para la forma libre, A, como para la forma complejada con p41, B, del mutante R21A del dominio SH3-Spc en 20mM glicina deuterada, pH* 3.0, 100% D₂O y 27.10°C de temperatura. Los símbolos representan valores experimentales de intensidad relativa a cada valor de tiempo y las líneas continuas se corresponden con los ajustes de mínimos cuadrados no lineales de los datos experimentales a una función exponencial simple. Tanto en el panel A como en el B, se han empleado los mismos colores para representar a los mismos restos. En el panel B se indica también un gráfico análogo en el que se puede apreciar con más detalle la zona correspondiente a escalas de tiempo similares a las del panel A, del complejo R21A-p41.

En la figura anterior, fig. 5.2.17., se aprecia como el ligando ejerce una “acción protectora” del dominio frente al intercambio. Este efecto se observa en mayor o menor medida en la práctica la totalidad de los restos del dominio. Sin embargo, cabe decir que existen regiones del mismo en las que dicho efecto es particularmente acusado. Así,

para el caso de los residuos L33 y E45, se observa que en ausencia del ligando después de $3 \cdot 10^5$ s, es decir, algo más de tres días (panel A, fig. 5.2.17.), la intensidad relativa de los picos de cruce $C_\alpha H-NH$ de los mismos es prácticamente nula, mientras que en presencia del p41 dicha intensidad sólo se ha reducido a algo menos de la mitad del valor inicial (panel B, fig. 5.2.17.).

En todos los casos la intensidad de las señales de cruce $C_\alpha H-NH$ decrece según una función exponencial decreciente simple. Del ajuste por mínimos cuadrados no lineales de estos datos con este tipo de función (ver fig. 5.2.17. y apdo. 4.6.2. de la sección de Materiales y Métodos) se han obtenido los valores de las constantes de velocidad aparentes de intercambio, k_{obs} , para cada uno de los restos observables del dominio en su forma “complejada”. Los ajustes son muy buenos en todos los casos, de manera que las constantes obtenidas son bastante fiables. A partir de estos valores obtenidos para las constantes aparentes de velocidad de intercambio, k_{obs} , y de los correspondientes valores de las constantes intrínsecas de intercambio, k_{int} , obtenidos a partir de la secuencia de aminoácidos del mutante R21A (Bai et al., 1993), se pueden determinar los *factores de protección*, FP. Los valores de ambas constantes, k_{obs} y k_{int} así como los factores de protección de cada uno de los restos observables del dominio, en presencia del ligando, esto es, complejo, se encuentran tabulados en el apéndice III de esta memoria. Los correspondientes al mutante R21A libre, en ausencia de ligando, se han tabulado en el apéndice I

5.2.6.1. Efectos de la unión del ligando en la estabilidad del dominio. Cambios en el ΔG_{ap} debidos a la unión.

De forma análoga a como se hizo en el caso de los estudios de IHD con las diferentes variantes del dominio “libres”, a partir de los valores de factores de protección, FP, determinados a partir de los valores de constantes aparentes de intercambio observadas, k_{obs} , y de constantes intrínsecas, k_{int} , se puede determinar el valor del cambio de energía de Gibbs aparente de intercambio, ΔG_{ap} , para cada uno de los residuos del dominio que se pueden observar, que no es sino una medida de la

energía de Gibbs puesta en juego en la exposición de cada resto concreto de la proteína al disolvente para sufrir el proceso de intercambio.

Los valores de ΔG_{ap} para los diferentes restos del mutante R21A, en su estado libre ya se conocen, puesto que se obtuvieron a partir de los experimentos de IHD que se realizaron para determinar el efecto de la mutación a alanina en posición 21 sobre la forma natural del dominio, WT (ver aptdo. 5.1.4.1. de esta sección). Los correspondientes valores de ΔG_{ap} para el caso del mutante complejoado con el p41 se han determinado a partir de los factores de protección obtenidos del experimento de IHD que estamos describiendo. En la figura siguiente, fig. 5.2.18., se representan las diferencias en ΔG_{ap} entre el dominio saturado con p41 y el dominio libre, $\Delta\Delta G_{ap}$, obtenidos para cada uno de los residuos observables en los dos estados del dominio frente a la secuencia aminoacídica del mismo.

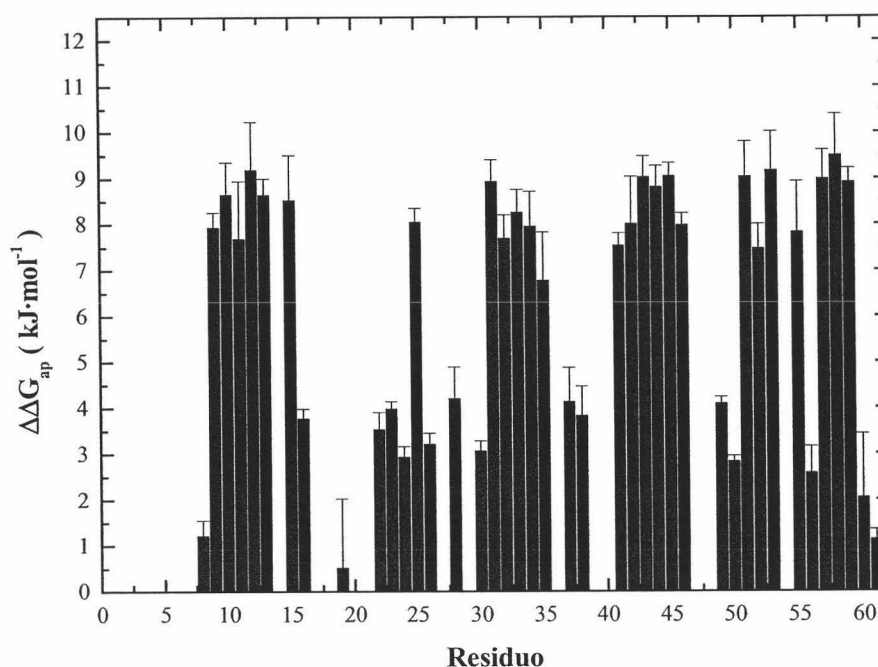


Fig. 5.2.18.: Representación del cambio en ΔG_{ap} de cada uno de los restos aminoacídicos del mutante R21A, $\Delta\Delta G_{ap}$, producido por la unión del mismo al ligando peptídico p41 y referidos a la forma libre de dicho mutante.

Tal y como ocurría en el caso de los experimentos de IHD realizados para determinar el efecto de mutaciones puntuales sobre la estabilidad local del dominio, se vuelve a observar aquí un efecto similar, esto es, gran parte de la estructura del dominio se estabiliza de manera similar por efecto de la unión del ligando, incluso para regiones de la estructura alejadas del sitio de unión, es decir, este dominio presenta una *gran cooperatividad*, lo que es lógico dado su reducido tamaño molecular. Con todo, existen ciertas regiones del dominio en las que el efecto debido a la unión supone un cambio en ΔG_{ap} menor que en otras zonas.

Aquellas regiones del dominio que presentan mayores valores de $\Delta\Delta G_{ap}$ coinciden bastante bien, aunque con alguna excepción con las regiones para las que se ha descrito que intercambian con el disolvente a través de microestados con grandes alteraciones estructurales, y que constituyen fundamentalmente el interior “core” del dominio (Sadqi et al., 2002a; Sadqi et al., 2002b). Por otro lado, aquéllas otras en las que se observan valores de $\Delta\Delta G_{ap}$ menores, se corresponden bien con las que sufren intercambio con el disolvente mediante fluctuaciones locales o parciales de la estructura y constituyen esencialmente elementos flexibles de la estructura, como pueden ser los extremos, lazos, giros, etc.

5.2.6.2. Afinidades de unión al ligando p41 de los diferentes estados conformacionales del dominio SH3-Spc.

Para interpretar los valores de $\Delta\Delta G_{ap}$ producidos por la unión del ligando, es posible establecer un análisis termodinámico estadístico de las energías de Gibbs aparentes de intercambio, ΔG_{ap} . De esta manera, como ya se describió en el Capítulo 5.1 de esta Memoria, partimos de la base de que las proteínas se comportan como colectivos de estados conformacionales en equilibrio (Sadqi et al., 1999), de manera que se puede definir la energía de Gibbs aparente de intercambio para un residuo concreto de la proteína, j , como:

$$\Delta G_{ex,j} = -RT \ln K_{ap,j} = -RT \ln \frac{\sum_{i(j,ex)} e^{-\Delta G_i/RT}}{\sum_{i(j,nex)} e^{-\Delta G_i/RT}} \quad (5.2.1)$$

donde $K_{ap,j}$ es el relación entre dos sumas de probabilidades diferentes: por un lado la de aquellos estados conformacionales que exponen el residuo j al disolvente, que denominamos (j,ex) y por otro la de aquellos estados que no lo exponen, y que denominamos (j,nex) . En esa ecuación, ec. 5.2.1., ΔG_i representa a la energía de Gibbs de cada uno de los estados que constituyen el colectivo de conformaciones de la proteína en relación con un estado de referencia.

Como consecuencia de la interacción del dominio con el ligando, L , la energía de Gibbs de cada “estado conformacional”, i , se ve afectada de acuerdo con la ecuación siguiente (Luque et al., 2002), ec. 5.2.2:

$$\Delta G_i = \Delta G_i^0 - RT \ln \frac{1 + K_{b,i} \cdot [L]}{1 + K_{b,0} \cdot [L]} \quad (5.2.2)$$

donde ΔG_i^0 es la energía de Gibbs del estado i en ausencia de ligando, $K_{b,i}$ es la constante de unión correspondiente al estado i y $K_{b,0}$ es la constante de unión para el estado de referencia.

Se puede tener en cuenta ahora la definición termodinámico-estadística de la constante de apertura-cierre del residuo j , que se determina por IHD. Así, en ausencia del ligando:

$$K_{ap,j}^0 = \frac{\sum_{i(j,ex)} e^{-\frac{\Delta G_i}{RT}}}{\sum_{i(j,nex)} e^{-\frac{\Delta G_i}{RT}}} \quad (5.2.3)$$

Y en presencia de una cierta concentración de ligando, $[L]$:

$$K_{ap,j}^L = \frac{\sum_{i(j,ex)} \left(e^{-\frac{\Delta G_i}{RT}} \cdot \frac{1 + K_{b,i}[L]}{1 + K_{b,0}[L]} \right)}{\sum_{i(j,nex)} \left(e^{-\frac{\Delta G_i}{RT}} \cdot \frac{1 + K_{b,i}[L]}{1 + K_{b,0}[L]} \right)} = \frac{\sum_{i(j,ex)} \left(e^{-\frac{\Delta G_i}{RT}} \cdot (1 + K_{b,i}[L]) \right)}{\sum_{i(j,nex)} \left(e^{-\frac{\Delta G_i}{RT}} \cdot (1 + K_{b,i}[L]) \right)} \quad (5.2.4.)$$

Dividiendo ambas constantes de equilibrio entre sí se llega fácilmente a:

$$\frac{K_{ap,j}^L}{K_{ap,j}^0} = \frac{1 + \frac{\sum_{i(j,ex)} \left(e^{-\frac{\Delta G_i}{RT}} \cdot K_{b,i}[L] \right)}{\sum_{i(j,ex)} e^{-\frac{\Delta G_i}{RT}}}}{1 + \frac{\sum_{i(j,nex)} \left(e^{-\frac{\Delta G_i}{RT}} \cdot K_{b,i}[L] \right)}{\sum_{i(j,nex)} e^{-\frac{\Delta G_i}{RT}}}} = \frac{1 + \langle K_b \rangle_{(j,ex)} [L]}{1 + \langle K_b \rangle_{(j,nex)} [L]} \quad (5.2.5.)$$

donde $\langle K_b \rangle_{(j,ex)}$ y $\langle K_b \rangle_{(j,nex)}$ son las constantes de unión promedio para los conjuntos de estados conformacionales del dominio que exponen y que no exponen al residuo j al disolvente, respectivamente. Finalmente, tomando logaritmos naturales y multiplicando por $-RT$ se llega a:

$$\Delta \Delta G_{ap,j} = -RT \ln \frac{1 + \langle K_b \rangle_{j,ex} \cdot [L]}{1 + \langle K_b \rangle_{j,nex} \cdot [L]} \quad (5.2.6)$$

De esta ecuación se deduce que los incrementos de energía de Gibbs de intercambio, $\Delta \Delta G_{ap}$, accesibles experimentalmente para cada residuo de la proteína, están relacionados con las afinidades medias por el ligando de los conjuntos de estados conformacionales que protegen y que exponen dicho residuo al disolvente, es decir, informan de la capacidad que las conformaciones accesibles a la proteína tienen para interactuar con el ligando. Dicha información tiene además un carácter local, es decir, se obtiene para cada residuo concreto de la proteína.

Es lógico pensar que la afinidad de cada estado conformacional de la proteína por el ligando es fuertemente dependiente de la conservación de las características estructurales del sitio de unión, es decir, a mayor distorsión del sitio de unión, menor

capacidad de la proteína para unirse al ligando y, en consecuencia, menor estabilización de dicho estado conformacional por la interacción.

Con el fin de extraer la información sobre la afinidad promedio de los estados conformacionales que exponen al disolvente cada residuo de la proteína a partir de los valores experimentales de $\Delta\Delta G_{ap}$ producidos por la unión del ligando, podemos considerar que el valor promedio $\langle K_b \rangle_{(j, nex)}$ es aproximadamente igual al valor de la constante de unión macroscópica para el dominio en su estado nativo, $K_{b, N}$, que se mide experimentalmente por CIT o por titulación por fluorescencia. A la constante de unión promedio $\langle K_b \rangle_{(j, nex)}$ contribuyen todos los estados que protegen al residuo j del intercambio. Entre estos estados conformacionales de la proteína, los más poblados con mucho son aquellos que constituyen el macroestado nativo, $\{N\}$, por lo que dicho promedio debe aproximarse mucho a la constante de unión determinada macroscópicamente.

De acuerdo con este razonamiento, a partir de los incrementos en la energía de Gibbs aparente de intercambio, motivados por el proceso de unión del ligando al dominio, $\Delta\Delta G_{ap, j}$, se pueden determinar las constantes de unión promedio $\langle K_b \rangle_{(j, ex)}$, que corresponden a aquellos estados conformacionales que la proteína “explora” en su equilibrio dinámico y que son responsables del intercambio con el disolvente que sufre cada resto de la proteína.

Esta aproximación es muy válida para residuos que intercambian únicamente a través de microestados altamente desplegados, con energías elevadas y poco probables, ya que el conjunto de microestados que los protegen del intercambio va a coincidir prácticamente con los que forman el macroestado nativo. La aproximación tiene menor validez para restos que intercambian a través de microestados de baja energía, con probabilidad más alta, que podrían contribuir al macroestado nativo, por lo que al sustituirlo por $K_{b, N}$, el valor de $\langle K_b \rangle_{(j, nex)}$ se vería ligeramente subestimado por la inclusión en el promedio de las constantes de unión de dichos microestados localmente desplegados, con afinidades reducidas. El efecto es una ligera subestimación de los valores de $\langle K_b \rangle_{(j, ex)}$, tanto mayor cuanto menor sea la energía de los estados por lo que el residuo j intercambia.

Así, en la ecuación anterior, eq. 5.2.6.2.3, hemos sustituido $\langle K_b \rangle_{(j,ex)}$ por el valor aproximado, $K_{b,N}$, que se obtiene de los experimentos de CIT. Además, considerando que el ligando se une al dominio con la constante $K_{b,N}$, a partir de las concentraciones de ligando y proteína totales en el medio es posible obtener el valor de la concentración de ligando libre en la disolución, $[L]$, mediante la ecuación:

$$[L] = \frac{-[1 + K_{b,N}(M_0 - L_0)] + \sqrt{[1 + K_{b,N}(M_0 - L_0)]^2 + 4K_{b,N}L_0}}{2K_{b,N}} \quad (5.2.7.)$$

donde M_0 y L_0 son las concentraciones totales de proteína y de ligando en disolución, respectivamente. Para una concentración de dominio SH3-Spc(R21A) de 4.55 mM, una constante de unión de 18520 M^{-1} y una concentración de ligando total de 7.4 mM, se obtiene una concentración de ligando libre de 3.0 mM.

Finalmente utilizamos los valores de $\Delta\Delta G_{apj}$ que obtenemos de los experimentos de IHD del mutante R21A en presencia y ausencia de p41 para determinar los valores de $\langle K_b \rangle_{(j,ex)}$ para cada residuo del mutante R21A. Estos datos se han representado en la figura siguiente, fig. 5.2.19.:

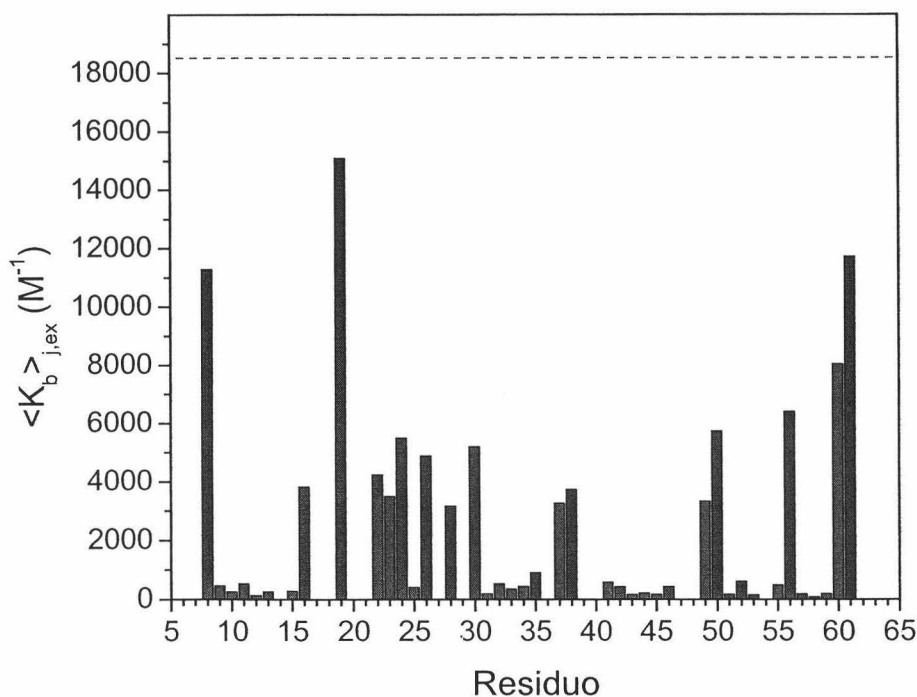


Fig. 5.2.19.: Representación gráfica de las constantes de unión promedio al ligando p41 de cada uno de los subconjuntos de estados que exponen al residuo "j" al disolvente y que por tanto, sufre IHD con el mismo. La línea discontinua representa la constante de unión macroscópica, $K_{b,N}$, determinada por CIT.

Se han representado también los valores de $\langle K_b \rangle_{(j,ex)}$ sobre un esquema de la estructura tridimensional del dominio SH3-Spc, como se muestra en la figura 5.2.20.:

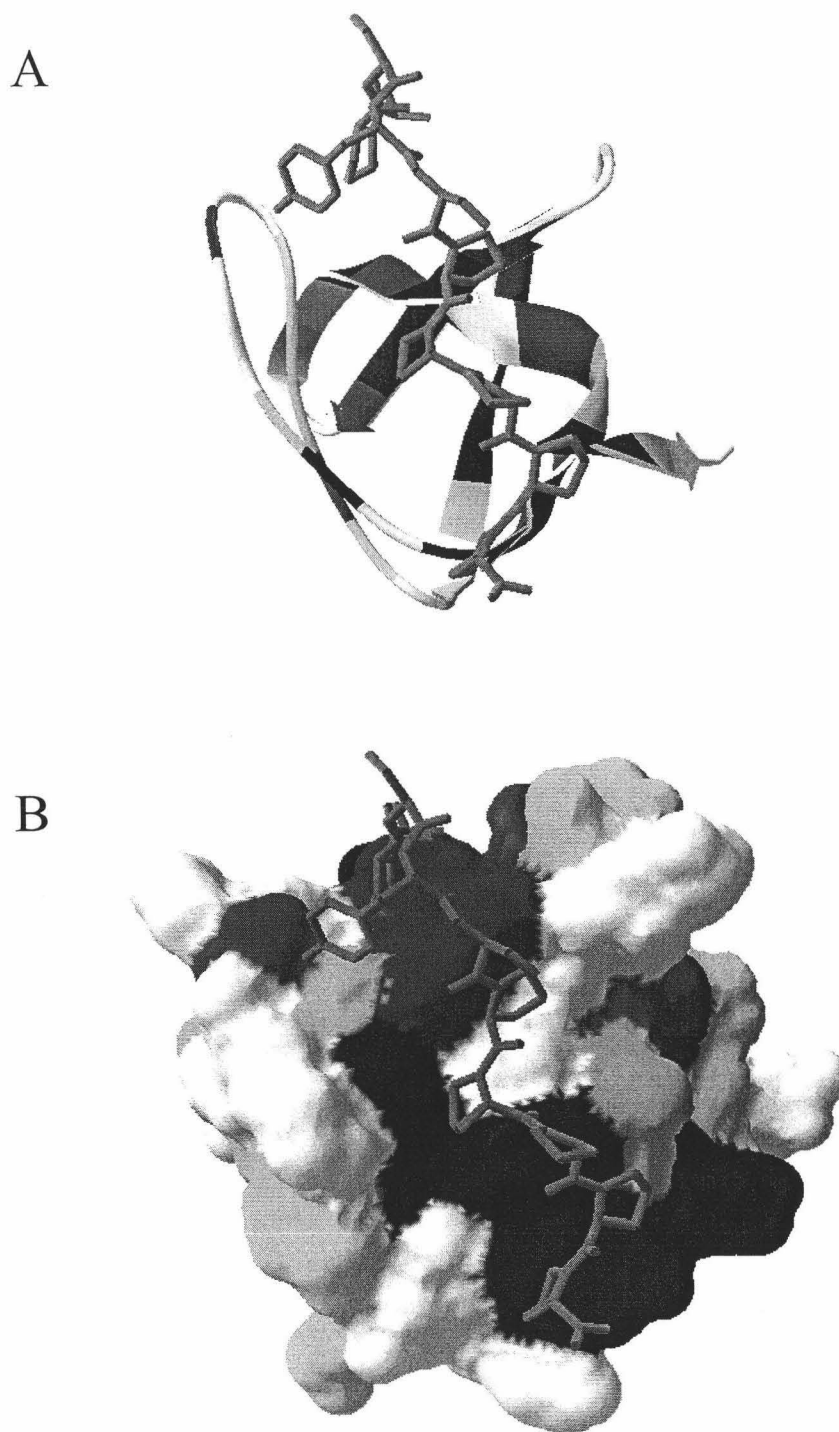


Figura 5.2.20.: Representaciones esquemáticas de la estructura tridimensional del dominio SH3-Spc mostrando en código de colores (del azul al rojo) los valores de $\langle K_b \rangle_{(j,ex)}$ para cada residuo del dominio. Para los residuos sin colorear no se han podido determinar los valores de $\langle K_b \rangle_{(j,ex)}$. En panel A los colores se han representado sobre la representación en cintas de la estructura secundaria de la cadena principal del dominio. En el panel B los colores se han representado sobre la superficie molecular correspondiente a cada residuo. El ligando p41 se ha representado en color magenta en modelo de varillas sobre el sitio de unión en la conformación hipotética según la superposición de las estructuras del dominio SH3-Spc y el SH3-Abl.

La figura 5.2.20. muestra como existen regiones de la secuencia del dominio cuyos hidrógenos amida intercambian con el disolvente a través de estados conformacionales cuya afinidad promedio por el ligando, $\langle K_b \rangle_{(j,ex)}$, es muy reducida, prácticamente despreciable, lo que implica una gran distorsión del sitio de unión. Estas regiones no sólo implican restos implicados directamente en el sitio de unión del ligando sino que coinciden en gran medida con las zonas centrales de las estructuras secundarias, que en trabajos previos de nuestro grupo de investigación han sido caracterizadas como las regiones del dominio más estables y que intercambian a través de estados conformacionales con amplia distorsión estructural (Sadqi et al., 1999; Sadqi et al., 2002a; Sadqi et al., 2002b). No obstante, de estos restos el W41, que sufre el intercambio mediante una fluctuación local (Sadqi et al., 2002b), muestra un valor de $\langle K_b \rangle_{(j,ex)}$ muy reducido. El hidrógeno amida de W41 se encuentra protegido del intercambio por la formación de un puente de hidrógeno con la cadena lateral de N38 y por su enterramiento del disolvente producido por su propia cadena lateral. Dicha cadena lateral se encuentra directamente implicada en el sitio de unión, lo que sugiere que la geometría de estas interacciones en esta parte del lazo n-Src es crítica para la afinidad de unión.

Existen otras regiones de la cadena que presentan valores intermedios de $\langle K_b \rangle_{(j,ex)}$ que varían entre unos 3000 M^{-1} hasta algo más de 6000 M^{-1} , lo que corresponde a constantes de disociación de entre 150 y $300 \mu\text{M}$, del mismo orden de las medidas por titulación fluorimétrica para la variante WT del dominio y para otros mutantes. Estas regiones de la secuencia se localizan principalmente a lo largo del lazo RT (restos Q16, E22, V23, T24 y K26), en el giro divergente contiguo (restos G28 e I30), en el lazo n-Src (T37 y N38), cerca del giro distal (R49 y Q50) y en el resto A56, situado en la cara expuesta al disolvente de la hélice 3_{10} . Todos estos residuos sufren el IHD a través de estados conformacionales local o parcialmente desestructurados, que mantienen una afinidad moderada por el ligando aunque bastante menor que la del macroestado nativo y, por tanto, presentan un sitio de unión al menos parcialmente estructurado.

Existen otros residuos (L8, K60 y L61) para los que $\langle K_b \rangle_{(j,ex)}$ es particularmente alto, con valores cercanos o mayores de 10000 M^{-1} , correspondientes a constantes de disociación de alrededor de $100 \mu\text{M}$. Estos restos se encuentran en los extremos de las

hebras β_1 y β_5 , complementarias entre sí, cerca de los extremos de la cadena, lo que indica que este extremo de lámina β puede abrirse sin afectar prácticamente la conformación del sitio de unión.

Por último, la serina 19, prácticamente no aumenta su protección frente al intercambio con el unión del ligando, lo que da lugar a un valor de $\langle K_b \rangle_{(j,ex)}$ para este residuo muy cercano al macroscópico. El grupo amida de este resto no se encuentra implicado en puentes de hidrógeno y su protección frente al intercambio (valor de ΔG_{ap}) es de los más bajos en todas las variantes estudiadas. Además, éste es precisamente el resto que presenta una cooperatividad más reducida con las posiciones 47 y 56, alejadas en la estructura del dominio, como se demuestra en los estudios del efecto de mutaciones sobre el IHD del Apartado 5.1. Esto indica que este resto intercambia mediante una fluctuación muy localizada que no afecta significativamente a la unión del ligando.

En el panel B de la figura 5.2.20. se muestra la superficie molecular coloreada con los valores de $\langle K_b \rangle_{(j,ex)}$ de cada residuo. Un aspecto muy interesante que puede apreciarse es que la superficie del sitio de unión presenta dos zonas claramente diferenciadas: Una zona coloreada de azul, que corresponde a la hendidura hidrofóbica donde se localizan los bolsillos de unión para las secuencias de poliprolina. Esta zona del sitio de unión está muy conservada entre los diferentes dominios SH3 y, como se ha descrito con anterioridad reconoce las secuencias consenso de poliprolina. Es evidente que esta interacción hidrofóbica conservada está dominada por residuos del dominio con elevada estabilidad, implicados sólo desplegamientos extensos de energía de Gibbs elevada y, por tanto, de baja probabilidad. Esto es lógico dado que este tipo de interacción suele ser muy sensible a la geometría de la interfase de unión.

Flanqueando esta región rígida del sitio de unión, existen otras zonas del dominio, en particular los lazos RT y n-Src, que se han descrito implicados en la especificidad de este tipo de unión, que pueden sufrir intercambio en ciertos microestados local o parcialmente desplegados manteniendo una cierta “afinidad residual”. Es notable, por ejemplo, la posible presencia de interacciones entre la tirosina 4 del ligando y ciertos residuos de lazo RT, interacciones que hemos postulado como

responsables del incremento de afinidad de SH3-Spc por p41 producido por la mutación R21A. Un desplegamiento local del lazo RT reduce la afinidad por p41 al eliminar estas interacciones pero no la elimina por completo.

Así, el dominio SH3 posee una plantilla rígida y estable para la unión con afinidad residual de *secuencias consenso* ricas en prolina, complementada por zonas adyacentes más flexibles que están implicadas en la especificidad de unión. Existen referencias a dicha afinidad residual en la literatura para las secuencias consenso (XPXXPPPΨXP, siendo Ψ un aminoácido hidrofóbico y X cualquier aminoácido) de todos estos dominios (Viguera et al., 1994).

Este carácter dual del sitio de unión del dominio SH3 se observa muchas proteínas, especialmente en proteínas o enzimas que presentan o están implicadas algún tipo de regulación alostérica (Luque y Freire, 2000). Este hecho no es casual y la razón reside en dos ventajas fundamentales que se adquieren con este tipo de distribución de la estabilidad en los sitios de unión; por un lado, una mejora en la afinidad de unión y, por otro, la posibilidad de facilitar la transmisión de los cambios inducidos por la unión del ligando a zonas alejadas en la estructura, como se discute en el apartado siguiente.

5.2.7. Conclusiones y discusión general del estudio de la unión del decapeptido p41 al dominio SH3-Spc.

A lo largo de este Apartado 5.2. hemos analizado varios aspectos complementarios del proceso de unión del ligando p41 al dominio SH3-Spc. Por un lado hemos analizado las afinidades de unión del ligando a una serie de mutantes del dominio SH3-Spc que presentaban mutaciones en tres puntos claramente diferenciados de su estructura, lo que ha permitido extraer algunas conclusiones importantes sobre los determinantes de la afinidad y la especificidad de unión para este dominio. Por otro lado, se ha elegido el mutante de mayor afinidad, el R21A para realizar una caracterización termodinámica completa del proceso de unión de p41 y además analizar los posibles cambios producidos por dicha interacción sobre la estructura del dominio y

sobre la estabilidad a nivel de residuo, analizando la transmisión cooperativa de interacciones.

- *Estabilidad y afinidad de unión no están correlacionadas.*

Una de las conclusiones más importantes es la falta de correlación entre estabilidad y afinidad de unión entre los diferentes mutantes. Esto se debe a que una mutación determinada puede estar estabilizando o desestabilizando selectivamente ciertos microestados conformacionales del dominio que no tienen por qué ser los más competentes para la unión de ligando. Así por ejemplo, hemos visto cómo las mutaciones estabilizantes R21G o N47G parecen aumentar la probabilidad de conformaciones del dominio con menor energía pero que poseen igual o menor afinidad por el ligando. La primera de estas mutaciones podría ejercer esta acción posiblemente por favorecer una conformación del extremo del lazo RT en giro β de tipo II, de menor energía, lo que redundaría en un aumento de la estabilidad, mientras que este tipo de conformación no parece ser adecuada para la interacción de esa zona con el ligando, con la consiguiente disminución de afinidad. La segunda de estas mutaciones no ejerce la acción en el sitio de unión de forma directa, sino a través de las rutas cooperativas del dominio. Los cambios producidos en el giro distal se transmiten a zonas alejadas de la estructura, entre ellas de nuevo el lazo RT en el que se estabilizan conformaciones que son menos proclives a la unión del ligando. En contraste con estas dos mutaciones estabilizantes, la desestabilización de la hélice 3_{10} por causa de la mutación A56G produce una fuerte disminución de afinidad, motivada muy probablemente por que dicha región forma parte de la zona conservada del sitio de unión, implicada en interacciones restringidas conformacionalmente (ver Apartado 5.2.1), por lo que el aumento de libertad conformacional en esa zona por causa de la mutación añade una entropía desfavorable adicional a la unión del ligando. En general, la falta de correlación entre estabilidad y afinidad debe tenerse muy en cuenta en el diseño molecular.

- *La termodinámica de unión de del ligando p41 a SH3-Spc es inusual.*

De entre los mutantes producidos se ha elegido el R21A como el de mayor afinidad para proseguir el estudio de su unión a p41 en comparación con la variante WT. Se ha realizado el análisis termodinámico completo de dicha interacción que ha confirmado que el proceso de unión del ligando p41 a SH3-Spc, como en el caso de interacciones similares a otros dominios SH3, presenta una termodinámica inusual (Renzoni et al., 1996), (Lemmon y Ladbury, 1994), (I. Luque, comunicación personal). Como en la mayoría de los procesos de interacción biomolecular (Cooper, 1999), la energía de Gibbs de unión es producto de la compensación entre entalpía y entropía. La entalpía de unión negativa elevada, muy favorable, y la entropía de unión, también bastante negativa, están en desacuerdo con el carácter mayoritariamente hidrofóbico de la interfase de unión. Una interacción mayoritariamente hidrofóbica suele caracterizarse por un aumento neto de entropía motivado fundamentalmente por la liberación de las moléculas de agua de solvatación de las superficies hidrofóbicas que acompaña al enterramiento de las mismas, mientras que el término entálpico suele ser pequeño o incluso desfavorable (Velazquez-Campoy et al., 2000).

La disminución de entropía particularmente elevada asociada a la unión del ligando p41 a SH3-Spc podría corresponder en parte a la pérdida de libertad conformacional del péptido con la unión, aunque debido a la secuencia de p41 éste término no debe ser dominante, ya que presenta una fuerte propensidad a adoptar la conformación el hélice de poliprolina II que adopta en el complejo.

Generalmente la unión de un ligando implica un enterramiento de un porcentaje elevado de su superficie, que en buena medida suele estar correlacionada con la afinidad de unión y que, además, suele requerir cambios conformacionales en el sitio de unión de la proteína. El coste energético de dichos cambios conformacionales sería demasiado elevado si éstos implicaran una zona muy estable de la proteína, o tendrían un coste entrópico inaceptable si por el contrario requirieran la estructuración de una región completamente desordenada. Una solución intermedia razonable consiste en que la región que sufre el cambio conformacional sea relativamente inestable y ocupe un mínimo de energía poco profundo (Luque y Freire, 2000). Este escenario parece darse

en el caso de la unión de p41 al dominio SH3-Spc. La afinidad de unión basal que confiere la interacción de la secuencia de prolinas con la región hidrofóbica estable del sitio de unión se complementa con interacciones adicionales en la zona flexible del lazo RT, que seleccionan y estabilizan ciertas conformaciones del mismo, competentes para la unión. Esto está en buen acuerdo con los cambios en los desplazamientos químicos de la cadena principal del dominio motivados por la unión de p41, como se ha descrito en el Apartado anterior.

Recientemente, un estudio por RMN e IHD del efecto de la unión de un péptido rico en prolina a la variante c-Src del dominio SH3 sobre su dinámica estructural ha revelado que buena parte de la disminución de entropía asociada a la unión es debida a una disminución acusada en las fluctuaciones conformacionales del dominio SH3 como consecuencia de sus interacciones con el ligando (Wang et al., 2001). Una buena parte de esa entropía podría, por tanto, deberse a que la unión del ligando estabiliza selectivamente los microestados conformacionales competentes para la interacción, lo que produciría un estrechamiento en la distribución de poblaciones, disminuyendo la entropía. Es evidente que una contribución considerable a este término entrópico debería proceder de las regiones poco estables implicadas en la unión, como el lazo RT, y de las regiones ligadas cooperativamente a éstas. Otra contribución apreciable podría proceder de la inmovilización y reorientación de las cadenas laterales aromáticas del sitio de unión, como se ha discutido al analizar los efectos de la unión del ligando en los desplazamientos químicos.

- La existencia de cooperatividad ayuda a compensar entálpicamente la disminución de entropía de unión.

La compensación entalpía-entropía domina también cualquier mejora o empeoramiento de la afinidad de unión de p41 a SH3-Spc a través del diseño molecular. Esto lo hemos visto al comparar la termodinámica de unión de p41 a las variantes WT y R21A del dominio SH3-Spc. La mejora de las interacciones (entalpía de unión más negativa) en la zona del lazo RT provocada por la mutación viene acompañada de una disminución de entropía de unión, consecuencia simple de la redistribución de poblaciones producida por la estabilización selectiva de ciertas conformaciones del lazo,

que compensa parcialmente la ganancia entálpica. Es evidente que para que haya un aumento de afinidad el término entálpico debe superar al entrópico. Por otra parte, como se discute más abajo, esta redistribución de poblaciones hace que las interacciones establecidas por el ligando en el lazo RT se transmitan cooperativamente de manera eficiente al resto de las regiones de la estructura del dominio, reforzando interacciones en dichas zonas alejadas, en una forma similar a la que ocurre con los efectos de mutaciones puntuales. Este refuerzo de interacciones debe de estar contribuyendo a la ganancia de entalpía de manera importante, ayudando a superar al término entrópico. La existencia cooperatividad entre una región flexible y el resto de las regiones de la estructura de una proteína es, por tanto, un factor determinante a la hora de que se dicha región flexible participe en un sitio de unión.

Una consecuencia directa de esta conclusión en el campo del diseño de ligandos es que, a la hora de diseñar interacciones con una cierta región flexible del sitio de unión, es importante evaluar la propagación cooperativa de los efectos producidos a otras regiones de la proteína. De ahí la importancia de estudios como los presentados en esta Memoria.

- ***La participación de zonas poco estables en el sitio de unión es requisito para la transmisión de efectos cooperativos.***

La presencia de regiones de baja estabilidad en los sitios de unión es necesaria para facilitar la transmisión de cambios conformacionales inducidos por la unión de ligandos (efectos alostéricos). En los dominios SH3, muchos de los cuales están implicados en una gran variedad de mecanismos de transducción de señales, la propagación de interacciones a través de la estructura del dominio puede tener gran importancia biológica. Si todos los microestados del colectivo del macroestado nativo fueran competentes para la unión del ligando, sólo se produciría un desplazamiento en la energía de Gibbs de todos ellos en el mismo sentido, con lo que las poblaciones relativas de cada microestado seguirían iguales, sin redistribución de dichas poblaciones, y los cambios conformacionales inducidos por la unión del ligando se limitarían a la interfase de unión. Esta situación es similar al efecto de una mutación estabilizante en una región estable del dominio, ilustrada en la figura 5.1.9. Por el

contrario, si el sitio de unión contiene una zona poco estable, habrá microestados que serán competentes para la unión y otros que no lo serán. La unión del ligando estabiliza selectivamente las conformaciones competentes para la unión, disminuyendo así las poblaciones de las conformaciones que no pueden unir ligando, o que lo hacen con menor afinidad, de forma similar a como ocurre para una mutación estabilizante en una región poco estable (fig. 5.1.8.). Ahora bien, para que ocurra una propagación de los efectos de la unión del ligando a regiones distantes, ambas zonas deben estar conectadas por una ruta de interacciones cooperativas, de manera que sus estabilidades estén correlacionadas de alguna manera. La presencia de regiones poco estables en el sitio de unión se ha descrito por tanto como una condición necesaria para que pueda ocurrir la transmisión alostérica de señales desde el sitio de unión a otras regiones distantes en la estructura (Freire, 2000), (Luque y Freire, 2000).

Este comportamiento cooperativo se manifiesta en muchos aspectos en el dominio SH3-Spc. El efecto de las mutaciones N47G y N47A en el giro distal, muy alejado del sitio de unión resulta en una disminución de la afinidad de unión por el ligando, lo que indica una ruta cooperativa entre ambas regiones, algo que se corrobora a la vista de los cambios en las energías de Gibbs aparentes de intercambio producidos por la mutación N47G en todo el lazo RT, y los producidos por las mutaciones en posición 21 sobre restos adyacentes al giro distal. Asimismo, la unión del ligando produce cambios importantes en la energía de Gibbs de intercambio en la región del giro distal (residuos 46 y 49). En particular, los valores de $\langle K_b \rangle_{(j,ex)}$ de R49 y Q50 sugieren que ciertos estados conformacionales, localmente desplegados en la zona del giro distal, que dan lugar al intercambio de estos residuos, producen una disminución parcial de afinidad por el ligando p41, similar a la que producen los deplegamientos locales del lazo RT.

En cualquier caso, el pequeño tamaño molecular del dominio y por consiguiente, su elevada cooperatividad, hacen que la estabilización que se produce como consecuencia de su interacción con el ligando p41, se transmita muy eficientemente a través de las rutas cooperativas del mismo, resultando en una afectación bastante generalizada de la mayoría de la estructura. Sin embargo, y a pesar de todo ello, esta metodología abre las puertas a otros estudios en los que intervengan proteínas de mayor

tamaño en las que las rutas de cooperatividad estén más diferenciadas y podría permitir discriminar de forma más precisa cómo dichas rutas se ven modificadas por efecto de la interacción de dicha proteína con un cierto ligando.

- *Afinidades de unión de estados conformacionales poco poblados de las proteínas a partir de los estudios de IHD.*

Sin duda, el resultado más interesante de este trabajo es el que procede del análisis termodinámico-estadístico de los efectos de la unión de ligando p41 sobre el intercambio hidrógeno-deuterio del dominio SH3-Spc, que ha permitido estimar la afinidad media de los estados conformacionales que dan lugar al intercambio de cada hidrógeno amida de la cadena. Esta forma de racionalizar los efectos de ligando sobre el IHD es absolutamente novedosa y permite una caracterización muy detallada, sondeada a lo largo de la cadena del dominio, de los diferentes microestados que el dominio explora en su equilibrio conformacional en términos del grado de distorsión del sitio de unión que presentan y de su capacidad para interactuar con el ligando.

Así, se caracterizan fundamentalmente dos regiones del dominio en cuanto a su papel en la unión del ligando p41: Una región altamente estable, cuyos residuos sufren IHD en estados en los que la afinidad por el ligando es prácticamente despreciable y, por tanto, presentan un sitio de unión altamente distorsionado. Estos residuos en gran medida coinciden con los que intercambian sus hidrógenos amida a través de estados conformacionales altamente desestructurados. De estos residuos, los implicados en el sitio de unión participan exclusivamente de la interacción conservada con secuencias consenso de poliprolinas actuando como una especie de plantilla para dicho tipo de secuencia. Otra región, con menor estabilidad, se caracteriza por residuos que intercambian en estados que mantienen una afinidad apreciable, aunque reducida por el ligando p41. Algunos de estos residuos flanquean la zona estable, plantilla para secuencias de poliprolina, del sitio de unión y se encuentran implicados en interacciones que confieren especificidad a la unión.

Es llamativo que las interacciones que se suponen responsables de la especificidad se establezcan con regiones flexibles del dominio. A través de estas interacciones pueden inducirse cambios conformacionales con un coste energético

moderado, seleccionándose microestados competentes para dicha interacción frente a otros estados que no lo son, lo que gracias a la cooperatividad de su estructura redonda en una afinidad aumentada sobre una afinidad basal de la zona conservada, “plantilla”, del sitio de unión.

Este comportamiento parece estar relacionado con el papel biológico relevante de los dominios SH3. Muchos de estos dominios se encuentran implicados en mecanismos complejos de regulación en rutas de señalización celular, participando en interacciones transitorias con sustratos múltiples en conjunción con otros dominios o moléculas, que generalmente requieren asociaciones y disociaciones transitorias, finamente controladas (Musacchio et al., 1992), (Musacchio et al., 1994). La necesidad de una modulación precisa de estas interacciones altamente específicas podría llevarse a cabo a través de un mecanismo de adición-sustracción de afinidad sobre una afinidad basal proporcionada por la zona conservada del sitio de unión. Esta modulación de la afinidad podría realizarse desde otras regiones flexibles alejadas del sitio de unión haciendo uso de las rutas de cooperatividad aquí descritas. Además, la baja estabilidad de parte del sitio de unión favorece una cierta promiscuidad controlada en la interacción de estos dominios con sus sustratos, ya que ligeras variaciones en los epítopos de los ligandos para dichas zonas flexibles pueden acomodadas con cambios en la afinidad variados y efectos cooperativos diversos en regiones distantes de la estructura.

6. CONCLUSIONES GENERALES.

6. CONCLUSIONES GENERALES.

En este Capítulo se resumen las conclusiones más importantes a las que se ha llegado en este trabajo.

1. La realización de mutaciones en diferentes puntos de su superficie ha permitido producir cambios en la estabilidad global del dominio SH3-Spc de diversa magnitud y signo, que se han cuantificado por DSC. Los cambios en la estabilidad se han interpretado como efecto de cambios energéticos localizados en la región de la mutación y sus valores experimentales son coherentes, aunque algo menores, con las predicciones teóricas existentes en la bibliografía para dichos efectos locales.
2. A partir del análisis comparativo de las estructuras obtenidas por cristalografía de rayos X para la variante natural del dominio SH3-Spc y algunos de los mutantes (N47A, N47G, A56G y A56S) y en ausencia de estas, a partir del análisis de los desplazamientos químicos de RMN de la cadena principal se deduce que los efectos de las mutaciones puntuales sobre la estructura del dominio SH3-Spc son muy reducidos y se limitan a la región de la mutación, excepto para ciertos efectos ligeros a larga distancia en la región del lazo RT.
3. El estudio de los efectos de las mutaciones sobre el intercambio hidrógeno-deuterio indica que, a pesar de la ausencia de cambios estructurales importantes, los cambios de estabilidad local se transmiten cooperativamente en mayor o menor grado a la práctica totalidad de la estructura del dominio SH3-Spc, incluyendo regiones muy alejadas de la mutación. No obstante, esta cooperatividad no es absoluta y los cambios energéticos se transmiten más eficiente a las regiones más estables del dominio y de forma menos eficaz a las zonas flexibles del mismo.
4. La transmisión cooperativa de estabilidad presenta unas rutas bien definidas a través de las interacciones presentes en la estructura tridimensional del

- dominio que dependen de la posición de la mutación realizada. No existe, además, bidireccionalidad en éstas rutas de transmisión de cooperatividad, de forma que una perturbación energética se transmite de forma mucho más eficiente de una región flexible a una región estable que a la inversa.
5. Los datos de intercambio hidrógeno-deuterio permiten obtener gran detalle en los cambios energéticos locales producidos por las mutaciones, observándose en algunas zonas del dominio fenómenos supercooperativos o anticooperativos con la mutación, que se explican correctamente mediante la hipótesis de que el efecto de las mutaciones consiste en producir una redistribución de poblaciones de los estados conformacionales del dominio. Estos efectos son una manifestación del carácter estadístico de las proteínas.
 6. La realización de mutaciones en dos puntos diferentes del sitio de unión (posiciones 21 y 56) del dominio SH3-Spc, tiene efectos variados sobre su afinidad de unión por el ligando p41 (APSYSPPPPP) dependiendo del carácter de la mutación. Las mutaciones realizadas en posición 47, alejada del sitio de unión, provocan invariablemente una reducción de afinidad por el ligando p41, indicando la conexión cooperativa entre el giro distal y el sitio de unión.
 7. No existe una correlación entre la estabilidad termodinámica y la afinidad de unión a p41 para los diferentes mutantes del dominio SH3-Spc, lo que indica que una mutación determinada puede estar estabilizando o desestabilizando selectivamente ciertos microestados conformacionales del dominio que no tienen por qué ser los más competentes para la unión de ligando.
 8. El proceso de unión del ligando p41 a SH3-Spc presenta unas magnitudes termodinámicas inesperadas para una interacción aparentemente de carácter hidrofóbico. La afinidad de unión es consecuencia de una compensación acusada entre una entalpía de unión favorable muy elevada y una entropía de unión desfavorable de magnitud también considerable, lo que indica un papel importante de las interacciones de naturaleza polar. No obstante, el

incremento de capacidad calorífica de unión es negativo consecuencia del enterramiento acusado de superficie hidrofóbica con la unión.

9. Uno de los mutantes, el R21A posee una afinidad claramente incrementada por el ligando en comparación con la variante natural, que se explica por la eliminación con la mutación de impedimentos estéricos para la interacción del ligando con la región de especificidad del sitio de unión. La mutación incrementa la magnitud de la entalpía de unión favorable a costa de una mayor disminución de entropía con la unión, magnitudes compatibles con el aumento de interacciones de naturaleza predominantemente polar.
10. El efecto de la unión del ligando al mutante R21A del dominio SH3-Spc sobre los desplazamientos químicos de RMN indica que los cambios en la estructura del dominio son poco acusados, limitándose a la región del sitio de unión o zonas adyacentes al mismo, al lazo RT y, en menor medida, al lazo n-Src.
11. Se forma similar al efecto de las mutaciones puntuales, las interacciones establecidas en el sitio de unión por la unión del ligando p41 se transmiten cooperativamente a la práctica totalidad de la estructura del dominio, de forma más acusada a las regiones más estables y en menor medida a las zonas de menor estabilidad.
12. Del análisis termodinámico-estadístico del efecto de la unión del ligando sobre las energías de Gibbs de intercambio hidrógeno-deuterio ha sido posible obtener información sobre las afinidades de unión del ligando de los diferentes estados accesibles en el equilibrio conformacional del dominio SH3-Spc. En general, los desplegamientos extensos que afectan a las regiones más estables producen una reducción de la afinidad por el ligando hasta valores despreciables, mientras que los desplegamientos más locales de las zonas menos estables únicamente producen una reducción parcial de la afinidad.
13. La relación existente entre la dinámica conformacional y la cooperatividad de la estructura del dominio SH3-Spc y su afinidad por el ligando ha permitido

7. BIBLIOGRAFÍA.

Bibliografía.

- Aghazadeh, B. y M. K. Rosen (1999). "Ligand recognition by SH3 and WW domains: the role of N-alkylation in PPII helices." *Chem Biol* **6**(9): R241-6.
- Agrawal, V. y K. V. Kishan (2002). "Promiscuous binding nature of SH3 domains to their target proteins." *Protein Pept Lett* **9**(3): 185-93.
- Alexandropoulos, K., G. Cheng, et al. (1995). "Proline-rich sequences that bind to Src homology 3 domains with individual specificities." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(8): 3110-4.
- Anderson, D. R. W., G.R. (1969). "Fluorescence Polarization of the complexes of 1-anilino-8-naphthalene-sulfonate with bovine serum albumin. Evidence for preferential orientation of the ligand." *Biochemistry* **8**: 371-377.
- Argos, P. (1988). "An Investigation of Protein Subunit and Domain Interfaces." *Protein Engineering* **2**(2): 101-113.
- Arold, S. T., T. S. Ulmer, et al. (2001). "The role of the Src homology 3-Src homology 2 interface in the regulation of Src kinases." *J Biol Chem* **276**(20): 17199-205.
- Aue, W. P., E. Bartholdi, et al. (1976). "2-Dimensional Spectroscopy - Application to Nuclear Magnetic- Resonance." *Journal of Chemical Physics* **64**(5): 2229-2246.
- 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*. New York (USA), Wiley & Sons.
- Azuaga, A. I., F. Conejero-Lara, et al. (1995). "The thermodynamics of association and unfolding of the 205-316 C-terminal fragment of thermolysin." *Biochim Biophys Acta* **1252**(1): 95-102.
- Azuaga, A. I., M. L. Galisteo, et al. (1992). "Heat and cold denaturation of beta-lactoglobulin B." *FEBS Lett* **309**(3): 258-60.
- Azuaga, A. I., N. D. Woodruff, et al. (1999). "Expression and characterization of the intact N-terminal domain of streptokinase." *Protein Sci* **8**(2): 443-6.
- Bach, D. y D. Chapman (1980). *Biological Microcalorimetry*. A. Press. London (UK): 265.
- Bai, Y., J. S. Milne, et al. (1993). "Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange." *Proteins* **17**(1): 75-86.
- Bai, Y., T. R. Sosnick, et al. (1995). "Protein folding intermediates: native-state hydrogen exchange." *Science* **269**(5221): 192-7.
- Barila, D. y G. Superti-Furga (1998). "An intramolecular SH3-domain interaction regulates c-Abl activity." *Nat Genet* **18**(3): 280-2.
- Bax, A. y D. G. Davis (1985). "Mlev-17-Based Two-Dimensional Homonuclear Magnetization Transfer Spectroscopy." *Journal of Magnetic Resonance* **65**(2): 355-360.
- Berger, A., A. Loewenstein, et al. (1959). "Nuclear Magnetic Resonance Study of the Protolysis and Ionization of N-Methylacetamide." *Journal of the American Chemical Society* **81**(1): 62-67.
- Bhakuni, V., D. Xie, et al. (1991). "Thermodynamic identification of stable folding intermediates in the B-subunit of cholera toxin." *Biochemistry* **30**(20): 5055-60.
- Birnboim, H. C. y J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-23.
- Blanco, F. J., A. R. Ortiz, et al. (1997). "1H and 15N NMR assignment and solution structure of the SH3 domain of spectrin: comparison of unrefined and refined structure sets with the crystal structure." *J Biomol NMR* **9**(4): 347-57.
- Bloch, F., W. W. Hansen, et al. (1946). *Phys. Rev.* **69**: 127.

- Bodenhausen, G., R. L. Vold, et al. (1980). "Multiple Quantum Spin-Echo Spectroscopy." *Journal of Magnetic Resonance* **37**(1): 93-106.
- Brabek, J., D. Mojzita, et al. (2002). "The SH3 domain of Src can downregulate its kinase activity in the absence of the SH2 domain-pY527 interaction." *Biochem Biophys Res Commun* **296**(3): 664-70.
- Brandts, J. F. (1964). *J. Am. Chem. Soc.* **86**: 4291-4301.
- Brannetti, B., A. Via, et al. (2000). "SH3-SPOT: an algorithm to predict preferred ligands to different members of the SH3 gene family." *J Mol Biol* **298**(2): 313-28.
- Brasher, B. B., S. Roumiantsev, et al. (2001). "Mutational analysis of the regulatory function of the c-Abl Src homology 3 domain." *Oncogene* **20**(53): 7744-52.
- Braunschweiler, L., G. Bodenhausen, et al. (1983). "Analysis of Networks of Coupled Spins by Multiple Quantum Nmr." *Molecular Physics* **48**(3): 535-560.
- Bruix, M. (1993). *Curso Avanzado de Resonancia Magnética Nuclear*. Escuela de Verano, Jaca, Huesca (SPAIN), Universidad de Zaragoza y Sociedad Española de Óptica.
- Bruix, M. (1997). *Curso Avanzado de Resonancia Magnética Nuclear*. Escuela de Verano, Jaca, Huesca (SPAIN), Universidad de Zaragoza y Sociedad Española de Óptica.
- Brünger, A. T. (1992). "Free-R value: A novel statistical quantity for assessing of crystal structure." *Nature*(355): 472-475.
- Brünger, A. T. (1992). X-PLOR. New Haven, CT; USA, Yale University Press.
- Brunger, A. T., P. D. Adams, et al. (1998). "Crystallography and NMR system (CNS): A new software system for macromolecular structure determination." *Acta Cryst.* **D54**: 905-921.
- Bundi, A. y K. Wuthrich (1979). "H-1-Nmr Parameters of the Common Amino-Acid Residues Measured in Aqueous-Solutions of the Linear Tetrapeptides H-Gly-Gly-X-L- Ala-Oh." *Biopolymers* **18**(2): 285-297.
- Bycroft, M., A. Matouschek, et al. (1990). "Detection and characterization of a folding intermediate in barnase by NMR." *Nature* **346**(6283): 488-90.
- Cambillau, C. y E. Horjales (1987). "TOM, A FRODO a subpackage for protein and ligand fitting with interactive energy minimization." *J Mol Graphics*(5): 174 - 177.
- Cantor, C. R. S., P.R. (1980). *Techniques for the Study of Biological Structure and Function. Biophysical Chemistry*, W.H. Freeman. **2**.
- Cariello, N. S., J. & Skopek, T. (1991). "Fidelity of *Thermococcus litoralis* DNA polymerase (Vent) in PCR determined by denaturing gradient gel electrophoresis." *Nucleic Acids Res* **19**: 4193-8.
- Casares, S., M. Sadqi, et al. (2003). "Structural cooperativity in the SH3 domain studied by site-directed mutagenesis and amide hydrogen exchange." *FEBS Lett* **539**(1-3): 125-130.
- Cesareni, G., S. Panni, et al. (2002). "Can we infer peptide recognition specificity mediated by SH3 domains?" *FEBS Lett* **513**(1): 38-44.
- Chamberlain, A. K., T. M. Handel, et al. (1996). "Detection of rare partially folded molecules in equilibrium with the native conformation of RNaseH." *Nat Struct Biol* **3**(9): 782-7.
- Chen, C. W. y C. A. Thomas, Jr. (1980). "Recovery of DNA segments from agarose gels." *Anal Biochem* **101**(2): 339-41.
- Chen, J. K., W. S. Lane, et al. (1993). "Biased combinatorial libraries: novel ligands for the SH3 domain of phosphatidylinositol 3-kinase." *J. Am. Chem. Soc* **115**(26): 12591-12592.

Bibliografía.

- Chen, R. F. (1967). "Fluorescence Quantum Yield of tryptophan and tyrosine." *Anal. Lett.* **1**(1): 35-42.
- Chowdry y Cole (1989). *Trends in Biotechnology* **7**: 11-18.
- Christensen, J. J., J. W. Gardner, et al. (1973). *Rev. Sci. Instrum.* **44**: 481.
- Christensen, J. J., L. D. Hansen, et al. (1976). *Handbook of Proton Ionization Heats and Related Quantities*. New York, USA, John Wiley and Sons, Inc.
- Chyan, C. L., C. Wormald, et al. (1993). "Structure and Stability of the Molten Globule State of Guinea- Pig Alpha-Lactalbumin - a Hydrogen-Exchange Study." *Biochemistry* **32**(21): 5681-5691.
- Cobas, C. (1999).
- Cobos, E. S., V. V. Filimonov, et al. (2003). "A thermodynamic and kinetic analysis of the folding pathway of an SH3 domain entropically stabilised by a redesigned hydrophobic core." *J Mol Biol* **328**(1): 221-33.
- Combs, A. P., T. M. Kapoor, et al. (1996). "Protein Structure-Based Combinatorial Chemistry: Discovery of non-peptide binding elements to Src SH3 domain." *J. Am. Chem. Soc.* **118**(1): 278-288.
- Condie, C. C. y S. C. Quay (1983). "Conformational studies of aqueous melittin. Characteristics of a fluorescent probe binding site." *J Biol Chem* **258**(13): 8231-4.
- Conejero-Lara, F., V. De Filippis, et al. (1994). "The thermodynamics of the unfolding of an isolated protein subdomain. The 255-316 C-terminal fragment of thermolysin." *FEBS Lett* **344**(2-3): 154-6.
- Conejero-Lara, F. y P. L. Mateo (1996). "Presence of a slow dimerization equilibrium on the thermal unfolding of the 205-316 thermolysin fragment at neutral pH." *Biochemistry* **35**(11): 3477-86.
- Conejero-Lara, F., P. L. Mateo, et al. (1991). "Effect of Zn²⁺ on the thermal denaturation of carboxypeptidase B." *Biochemistry* **30**(8): 2067-72.
- Conejero-Lara, F., J. M. Sanchez-Ruiz, et al. (1991). "Differential scanning calorimetric study of carboxypeptidase B, procarboxypeptidase B and its globular activation domain." *Eur J Biochem* **200**(3): 663-70.
- Cooper, A. (1999). "Thermodynamic analysis of biomolecular interactions." *Curr Opin Chem Biol* **3**(5): 557-63.
- Cooper, A. y C. M. Johnson (1994). "Differential scanning calorimetry." *Methods Mol Biol* **22**: 125-36.
- Cooper, A. y C. M. Johnson (1994). "Isothermal titration microcalorimetry." *Methods Mol Biol* **22**: 137-50.
- Cordier, F., C. Wang, et al. (2000). "Ligand-induced strain in hydrogen bonds of the c-*Src* SH3 domain detected by NMR." *J Mol Biol* **304**(4): 497-505.
- Cortijo, M., J. Llor, et al. (1988). "Thermodynamic constants for tautomerism, hydration, and ionization of vitamin B6 compounds in water/dioxane." *J Biol Chem* **263**(34): 17960-9.
- Creighton, T. E. (1986). "Disulfide bonds as probes of protein folding pathways." *Methods Enzymol* **131**: 83-106.
- Creighton, T. E. (1992). *Protein Folding*. New York (USA), WH Freeman and company.
- Creighton, T. E. (1993). *Proteins: Structures and Molecular Properties*. New York (USA), WH Freeman and Co.
- Creighton, T. E. (1994). The protein folding problem. *Mechanisms of protein folding*. O. I. press, Oxford IRL press: 1-25.

- Dalbadie-McFarland, G., L. W. Cohen, et al. (1982). "Oligonucleotide-directed mutagenesis as a general and powerful method for studies of protein function." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(21): 6409-13.
- Dalgarno, D. C., M. C. Botfield, et al. (1997). "SH3 domains and drug design: ligands, structure, and biological function." Biopolymers **43**(5): 383-400.
- Daniel, E. W., G. (1966). "Cooperative effects in binding by bovine serum albumin, I. The binding of 1-anilino-8-naphthalene-sulfonate." Biochemistry **5**: 1893-1900.
- D'Aquino, J. A., J. Gomez, et al. (1996). "The magnitude of the backbone conformational entropy change in protein folding." Proteins **25**(2): 143-56.
- Delaglio, F., S. Grzesiek, et al. (1995). "NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes." J Biomol NMR **6**(3): 277-93.
- Demchenko, A. P. (1981). Ultraviolet Spectroscopy of Proteins. New York (USA), Springer-Verlag.
- Derome, A. E. (1997). Why bother with pulse NMR. Modern NMR Techniques for Chemistry Research. Kidlington, Oxford (UK), Pergamon Press. **1**: 14-18.
- Eftink, M. R. (1991). "Fluorescence techniques for studying protein structure." Methods Biochem Anal **35**: 127-205.
- Ellis, L. M., V. A. Bloomfield, et al. (1975). "Hydrogen-Tritium Exchange Kinetics of Soybean Trypsin-Inhibitor (Kunitz) - Solvent Accessibility in Folded Conformation." Biochemistry **14**(15): 3413-3419.
- Engen, J. R., W. H. Gmeiner, et al. (1999). "Hydrogen exchange shows peptide binding stabilizes motions in Hck SH2." Biochemistry **38**(28): 8926-35.
- Englander, J. J., J. N. Rumbley, et al. (1998). "Signal transmission between subunits in the hemoglobin T-state." J Mol Biol **284**(5): 1707-16.
- Englander, S. W. (1975). "Measurement of Structural and Free-Energy Changes in Hemoglobin by Hydrogen-Exchange Methods." Annals of the New York Academy of Sciences **244**(APR15): 10-27.
- Englander, S. W. (2000). "Protein folding intermediates and pathways studied by hydrogen exchange." Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. **29**: 213-238.
- Englander, S. W., J. J. Englander, et al. (1992). "Hydrogen exchange measurement of the free energy of structural and allosteric change in hemoglobin." Science **256**(5064): 1684-7.
- Englander, S. W. y N. R. Kallenbach (1983). "Hydrogen-Exchange and Structural Dynamics of Proteins and Nucleic-Acids." Quarterly Reviews of Biophysics **16**(4): 521-655.
- Englander, S. W. y M. M. Krishna (2001). "Hydrogen exchange." Nat Struct Biol **8**(9): 741-2.
- Englander, S. W., T. R. Sosnick, et al. (1996). "Mechanisms and uses of hydrogen exchange." Current Opinion in Structural Biology **6**(1): 18-23.
- Englander, S. W. E., J.J. (1972). Methods Enzymol. **26c**: 406-413.
- Englander, S. W. P., A. (1969). "Hydrogen-Tritium Exchange of Random Chain Polypeptide." Biopolymers **7**(3): 379-&.
- Erlich, H. A., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Specific DNA Amplification." Nature **331**(6155): 461-462.
- Ernst, R. R. y W. A. Anderson (1966). Rev. Sci. Instrumen. **37**: 93-102.
- Erpel, T. y S. A. Courtneidge (1995). "Src family protein tyrosine kinases and cellular signal transduction pathways." Curr Opin Cell Biol **7**(2): 176-82.
- Erpel, T., G. Superti-Furga, et al. (1995). "Mutational analysis of the Src SH3 domain: the same residues of the ligand binding surface are important for intra- and intermolecular interactions." Embo J **14**(5): 963-75.

Bibliografía.

- Evans, P. R. (1993). Data Reduction. Proceedings of CCP4 Study Weekend on Data Collection and Processing.
- Feller, S. M., H. Wecklein, et al. (2002). "SH3 domain-mediated binding of the Drk protein to Dos is an important step in signaling of Drosophila receptor tyrosine kinases." Mech Dev **116**(1-2): 129-39.
- Feng, S., J. K. Chen, et al. (1994). "Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions." Science **266**(5188): 1241-7.
- Feng, S., T. M. Kapoor, et al. (1996). "Molecular basis for the binding of SH3 ligands with non-peptide elements identified by combinatorial synthesis." Chem Biol **3**(8): 661-70.
- Fernández-Escamilla, A. M. (2000). Estudio Termodinámico de Proteínas Globulares de Diseño y su interacción con inhibidores. Química-Física. Granada, Granada: 211.
- Filimonov, V. V., A. I. Azuaga, et al. (1999). "A thermodynamic analysis of a family of small globular proteins: SH3 domains." Biophys Chem **77**(2-3): 195-208.
- Filimonov, V. V., J. Prieto, et al. (1993). "Thermodynamic analysis of the chemotactic protein from Escherichia coli, CheY." Biochemistry **32**(47): 12906-21.
- Filimonov, V. V. y V. V. Rogov (1996). "Reversible association of the equilibrium unfolding intermediate of lambda Cro repressor." J Mol Biol **255**(5): 767-77.
- Freire, E. (1995). "Differential scanning calorimetry." Methods Mol Biol **40**: 191-218.
- Freire, E. (1995). "Thermal denaturation methods in the study of protein folding." Methods Enzymol **259**: 144-68.
- Freire, E. (1998). "Statistical thermodynamic linkage between conformational and binding equilibria." Adv Protein Chem **51**: 255-79.
- Freire, E. (1999). "The propagation of binding interactions to remote sites in proteins: analysis of the binding of the monoclonal antibody D1.3 to lysozyme." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(18): 10118-22.
- Freire, E. (2000). "Can allosteric regulation be predicted from structure?" Proc Natl Acad Sci U S A **97**(22): 11680-2.
- Freire, E., O. L. Mayorga, et al. (1990). "Isothermal Titration Calorimetry." Analytical Chemistry **62**(18): A950-A959.
- Freire, E., W. W. van Osdol, et al. (1990). "Calorimetrically determined dynamics of complex unfolding transitions in proteins." Annu Rev Biophys Biophys Chem **19**: 159-88.
- Freire, E., W. W. Vanosdol, et al. (1990). "Calorimetrically Determined Dynamics of Complex Unfolding Transitions in Proteins." Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry **19**: 159-188.
- Freire, E. e. a. (1990). Analytical Chemistry **62**: 950-958.
- Garbay, C., W. Q. Liu, et al. (2000). "Inhibitors of Ras signal transduction as antitumor agents." Biochem Pharmacol **60**(8): 1165-9.
- García-Fuentes, L., C. Baron, et al. (1998). "Influence of dynamic power compensation in an isothermal titration microcalorimeter." Anal Chem **70**(21): 4615-23.
- Gill, S. C. y P. H. von Hippel (1989). "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data." Anal Biochem **182**(2): 319-26.
- Gill, S. J., K. P. Murphy, et al. (1990). "Partition-Function Formalism for Analyzing Calorimetric Experiments." Journal of Chemical Education **67**(11): 928-931.

- Gillam, S., C. R. Astell, et al. (1980). "Site-specific mutagenesis using oligodeoxyribonucleotides: isolation of a phenotypically silent phi X174 mutant, with a specific nucleotide deletion, at very high efficiency." *Gene* **12**(1-2): 129-37.
- Glasoe, P. K. y F. A. Long (1960). "Use of Glass Electrodes to Measure Acidities in Deuterium Oxide." *Journal of Physical Chemistry* **64**(1): 188-190.
- Gmeiner, W. H. y D. A. Horita (2001). "Implications of SH3 domain structure and dynamics for protein regulation and drug design." *Cell Biochem Biophys* **35**(2): 127-40.
- Gmeiner, W. H., I. Xu, et al. (2001). "Intramolecular binding of a proximal PPII helix to an SH3 domain in the fusion protein SH3Hck : PPIIhGAP." *Cell Biochem Biophys* **35**(2): 115-26.
- Gomez, J. y E. Freire (1995). "Thermodynamic mapping of the inhibitor site of the aspartic protease endothiasepsin." *J Mol Biol* **252**(3): 337-50.
- Gomez, J., V. J. Hilser, et al. (1995). "The heat capacity of proteins." *Proteins* **22**(4): 404-12.
- Gómez-Fernández, J. C., F. M. Goni, et al. (1980). "Protein-lipid interaction. Biophysical studies of (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase reconstituted systems." *Biochim Biophys Acta* **598**(3): 502-16.
- Gorter, C. J. (1936). *Physica* **3**: 995-998.
- Gozu, M., M. Hoshino, et al. (2002). "The interaction of beta(2)-glycoprotein I domain V with chaperonin GroEL: the similarity with the domain V and membrane interaction." *Protein Sci* **11**(12): 2792-803.
- Grantcharova, V. P. y D. Baker (1997). "Folding dynamics of the src SH3 domain." *Biochemistry* **36**(50): 15685-92.
- Gregory, R. B., L. Crabo, et al. (1983). "Water Catalysis of Peptide Hydrogen Isotope Exchange." *Biochemistry* **22**(4): 910-917.
- Griko Iu, V., P. L. Privalov, et al. (1989). "[Cold denaturation of staphylococcal nuclease]." *Biofizika* **34**(6): 940-5.
- Griko Iu, V., P. L. Privalov, et al. (1988). "[Thermodynamic study of the structure of apomyoglobin]." *Biofizika* **33**(1): 18-26.
- Griko Yu, V., S. Venyaminov, et al. (1989). "Heat and cold denaturation of phosphoglycerate kinase (interaction of domains)." *FEBS Lett* **244**(2): 276-8.
- Griko, Y. V. y P. L. Privalov (1992). "Calorimetric study of the heat and cold denaturation of beta-lactoglobulin." *Biochemistry* **31**(37): 8810-5.
- Griko, Y. V., P. L. Privalov, et al. (1988). "Cold denaturation of staphylococcal nuclease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(10): 3343-7.
- Griko, Y. V., P. L. Privalov, et al. (1988). "Thermodynamic study of the apomyoglobin structure." *J Mol Biol* **202**(1): 127-38.
- Griko, Y. V., V. V. Rogov, et al. (1992). "Domains in lambda Cro repressor. A calorimetric study." *Biochemistry* **31**(50): 12701-5.
- Guijarro, J. I., C. J. Morton, et al. (1998). "Folding kinetics of the SH3 domain of PI3 kinase by real-time NMR combined with optical spectroscopy." *J Mol Biol* **276**(3): 657-67.
- Guruprasad, K. y S. Rajkumar (2000). "Beta-and gamma-turns in proteins revisited: a new set of amino acid turn-type dependent positional preferences and potentials." *J Biosci* **25**(2): 143-56.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." *J Mol Biol* **166**(4): 557-80.

Bibliografía.

- Haynie, D. T. y E. Freire (1994). "Estimation of the folding/unfolding energetics of marginally stable proteins using differential scanning calorimetry." Anal Biochem **216**(1): 33-41.
- Haynie, D. T. y E. Freire (1994). "Thermodynamic strategies for stabilizing intermediate states of proteins." Biopolymers **34**(2): 261-72.
- Higuchi, R., B. Krummel, et al. (1988). "A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions." Nucleic Acids Res **16**(15): 7351-67.
- Hilser, V. J., D. Dowdy, et al. (1998). "The structural distribution of cooperative interactions in proteins: Analysis of the native state ensemble." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(17): 9903-9908.
- Hilser, V. J. y E. Freire (1996). "Structure-based calculation of the equilibrium folding pathway of proteins. Correlation with hydrogen exchange protection factors." J Mol Biol **262**(5): 756-72.
- Hilser, V. J. y E. Freire (1997). "Predicting the equilibrium protein folding pathway: Structure-based analysis of staphylococcal nuclease." Proteins-Structure Function and Genetics **27**(2): 171-183.
- Hilser, V. J., J. Gomez, et al. (1996). "The enthalpy change in protein folding and binding: refinement of parameters for structure-based calculations." Proteins **26**(2): 123-33.
- Hilser, V. J., J. Gomez, et al. (1996). "Enthalpy change in protein folding and binding: Refinement of parameters for structure-based calculations." Proteins-Structure Function and Genetics **26**(2): 123-133.
- Hilser, V. J., B. D. Townsend, et al. (1997). "Structure-based statistical thermodynamic analysis of T4 lysozyme mutants: Structural mapping of cooperative interactions." Biophysical Chemistry **64**(1-3): 69-79.
- Hore, P. J. (1989). "Nuclear magnetic resonance. Solvent suppression." Methods Enzymol **176**: 64-77.
- Hutchinson, E. G. y J. M. Thornton (1994). "A revised set of potentials for beta-turn formation in proteins." Protein Sci **3**(12): 2207-16.
- Hvidt, A. N. S. O. (1966). Adv. Prot. Chem. **21**: 287-383.
- Ikemura, T. (1981). "Correlation between the abundance of Escherichia coli transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes." J Mol Biol **146**(1): 1-21.
- Ikemura, T. (1981). "Correlation between the abundance of Escherichia coli transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: a proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the E. coli translational system." J Mol Biol **151**(3): 389-409.
- Jackson, S. E. y A. R. Fersht (1991). "Folding of chymotrypsin inhibitor 2. 1. Evidence for a two-state transition." Biochemistry **30**(43): 10428-35.
- Jeener, J., B. H. Meier, et al. (1979). "Investigation of Exchange Processes by 2-Dimensional Nmr- Spectroscopy." Journal of Chemical Physics **71**(11): 4546-4553.
- Jia, Z., J. W. Quail, et al. (1993). "The 2.0-Å resolution structure of Escherichia coli histidine-containing phosphocarrier protein HPr. A redetermination." J Biol Chem **268**(30): 22490-501.
- Johnson, B. A. B., R.A. (1994). "A computer program for the visualization and analysis of NMR data." J. Biomol. NMR **4**: 603-614.
- Kalodimos, C. G., R. Boelens, et al. (2002). "A residue-specific view of the association and dissociation pathway in protein-DNA recognition." Nat Struct Biol **9**(3): 193-7.

- Kami, K., R. Takeya, et al. (2002). "Diverse recognition of non-PxxP peptide ligands by the SH3 domains from p67(phox), Grb2 and Pex13p." *Embo J* **21**(16): 4268-76.
- Kardinal, C., B. Konkol, et al. (2000). "Cell-penetrating SH3 domain blocker peptides inhibit proliferation of primary blast cells from CML patients." *Faseb J* **14**(11): 1529-38.
- Kardinal, C., G. Posern, et al. (1999). "Rational development of cell-penetrating high affinity SH3 domain binding peptides that selectively disrupt the signal transduction of Crk family adapters. Amgen Peptide Technology Group." *Ann N Y Acad Sci* **886**: 289-92.
- Karplus, M. (1959). "Contact Electron-Spin Coupling of Nuclear Magnetic Moments." *Journal of Chemical Physics* **30**(1): 11-15.
- Karplus, M. (1963). "Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance." *Journal of the American Chemical Society* **85**(18): 2870-&.
- Karplus, M. (1997). "The Levinthal paradox: yesterday and today." *Fold Des* **2**(4): S69-75.
- Kay, B. K., M. P. Williamson, et al. (2000). "The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains." *Faseb J* **14**(2): 231-41.
- Kim, P. S. y R. L. Baldwin (1980). "Structural Intermediates Trapped During the Folding of Ribonuclease-a by Amide Proton-Exchange." *Biochemistry* **19**(26): 6124-6129.
- Kim, P. S. y R. L. Baldwin (1982). "Influence of Charge on the Rate of Amide Proton-Exchange." *Biochemistry* **21**(1): 1-5.
- Kiyokawa, E., N. Mochizuki, et al. (1997). "Role of Crk oncogene product in physiologic signaling." *Crit Rev Oncog* **8**(4): 329-42.
- Klejman, A., S. J. Schreiner, et al. (2002). "The Src family kinase Hck couples BCR/ABL to STAT5 activation in myeloid leukemia cells." *Embo J* **21**(21): 5766-74.
- Koch, C. A., D. Anderson, et al. (1991). "SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins." *Science* **252**(5006): 668-74.
- Kolafa, J., J. W. Perram, et al. (2000). "Essential motions and energetic contributions of individual residues in a peptide bound to an SH3 domain." *Biophys J* **79**(2): 646-55.
- Konev, S. V. (1967). *Fluorescence and Phosphorescence of Proteins and Nucleic Acids*. New York (USA), Plenum Press.
- Kranz, J. K., P. F. Flynn, et al. (2002). "Dissection of the pathway of molecular recognition by calmodulin." *Biochemistry* **41**(8): 2599-608.
- Kranz, J. K., P. F. Flynn, et al. (2002). "Dissection of the pathway of molecular recognition by calmodulin." *Biochemistry* **41**(8): 2599-608.
- Kraulis, P. (1991). "MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures." *Journal of Applied Crystallography* **24**(5): 946-950.
- Kumar, A., R. R. Ernst, et al. (1980). "A Two-Dimensional Nuclear Overhauser Enhancement (2d Noe) Experiment for the Elucidation of Complete Proton-Proton Cross- Relaxation Networks in Biological Macromolecules." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **95**(1): 1-6.
- Kuriyan, J. y D. Cowburn (1997). "Modular peptide recognition domains in eukaryotic signaling." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **26**: 259-88.
- Kurland, C. G. (1987). "Strategies for Efficiency and Accuracy in Gene-Expression." *Trends in Biochemical Sciences* **12**(4): 126-128.

- Ladbury, J. E. y B. Z. Chowdhry (1996). "Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions." Chem Biol **3**(10): 791-801.
- Lakowicz, J. R. (1999). Protein Fluorescence. Principles of Fluorescence Spectroscopy. New York (USA), Plenum Press: 445-486.
- Lawyer, F. C., S. Stoffel, et al. (1989). "Isolation, characterization, and expression in Escherichia coli of the DNA polymerase gene from Thermus aquaticus." J Biol Chem **264**(11): 6427-37.
- Lee, K. Y., J. H. Hyeok Yoon, et al. (2002). "A dipalmitoyl peptide that binds SH3 domain, disturbs intracellular signal transduction, and inhibits tumor growth in vivo." Biochem Biophys Res Commun **296**(2): 434-42.
- Lehto, V. P., V. M. Wasenius, et al. (1988). "Transforming and membrane proteins." Nature **334**(6181): 388.
- Lemmon, M. A. y J. E. Ladbury (1994). "Thermodynamic studies of tyrosyl-phosphopeptide binding to the SH2 domain of p56lck." Biochemistry **33**(17): 5070-6.
- Leslie, A. G. W. (1992). "Joint CCP4 + ESF-EAMCB." Newsletter on Protein Crystallography(26).
- Lewitzky, M., C. Kardinal, et al. (2001). "The C-terminal SH3 domain of the adapter protein Grb2 binds with high affinity to sequences in Gab1 and SLP-76 which lack the SH3-typical P-x-x-P core motif." Oncogene **20**(9): 1052-62.
- Linderstrøm-Lang, K. (1955). Chem. Soc. (London) Spec. Publ.(1-20).
- Liu, H. Y. y A. Rashidbaigi (1990). "Comparison of various competent cell preparation methods for high efficiency DNA transformation." Biotechniques **8**(1): 21, 24-5.
- Longworth, J. W. (1983). Intrinsic Fluorescence of Proteins. Time Resolved Fluorescence Spectroscopy in Biochemistry and Biology. R. B. C. a. R. E. Dale. New York (USA), Plenum Press: 651-778.
- Lundberg, K. S., D. D. Shoemaker, et al. (1991). "High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from Pyrococcus furiosus." Gene **108**(1): 1-6.
- Luque, I. y E. Freire (2000). "Structural stability of binding sites: consequences for binding affinity and allosteric effects." Proteins Suppl **4**: 63-71.
- Luque, I. y E. Freire (2002). "Structural parameterization of the binding enthalpy of small ligands." Proteins **49**(2): 181-90.
- Luque, I., S. A. Leavitt, et al. (2002). "The linkage between protein folding and functional cooperativity: two sides of the same coin?" Annu Rev Biophys Biomol Struct **31**: 235-56.
- Mabrey, S., P. L. Mateo, et al. (1978). "High-sensitivity scanning calorimetric study of mixtures of cholesterol with dimyristoyl- and dipalmitoylphosphatidylcholines." Biochemistry **17**(12): 2464-8.
- Macura, S. y R. R. Ernst (1980). "Elucidation of Cross Relaxation in Liquids by Two-Dimensional Nmr-Spectroscopy." Molecular Physics **41**(1): 95-117.
- Makhatadze, G. I., V. N. Medvedkin, et al. (1990). "Partial molar volumes of polypeptides and their constituent groups in aqueous solution over a broad temperature range." Biopolymers **30**(11-12): 1001-10.
- Makhatadze, G. I. y P. L. Privalov (1990). "Heat capacity of proteins. I. Partial molar heat capacity of individual amino acid residues in aqueous solution: hydration effect." J Mol Biol **213**(2): 375-84.

- Marion, D. y K. Wuthrich (1983). "Application of Phase Sensitive Two-Dimensional Correlated Spectroscopy (Cosy) for Measurements of H-1-H-1 Spin-Spin Coupling-Constants in Proteins." Biochemical and Biophysical Research Communications **113**(3): 967-974.
- Martinez, J. C., M. T. Pisabarro, et al. (1998). "Obligatory steps in protein folding and the conformational diversity of the transition state." Nat Struct Biol **5**(8): 721-9.
- Martinez, J. C. y L. Serrano (1999). "The folding transition state between SH3 domains is conformationally restricted and evolutionarily conserved." Nat Struct Biol **6**(11): 1010-6.
- Martinez, J. C., A. R. Viguera, et al. (1999). "Thermodynamic analysis of alpha-spectrin SH3 and two of its circular permutants with different loop lengths: discerning the reasons for rapid folding in proteins." Biochemistry **38**(2): 549-59.
- Martinez, J. C., A. R. Viguera, et al. (1998). "The DSC data analysis for small, single-domain proteins. Application to the SH3 domain." Reactive & Functional Polymers **36**(3): 221-225.
- Mattila, P., J. Korpela, et al. (1991). "Fidelity of DNA synthesis by the Thermococcus litoralis DNA polymerase--an extremely heat stable enzyme with proofreading activity." Nucleic Acids Res **19**(18): 4967-73.
- Mayer, B. J. (2001). "SH3 domains: complexity in moderation." J Cell Sci **114**(Pt 7): 1253-63.
- Mayne, L. y S. W. Englander (2000). "Two-state vs. multistate protein unfolding studied by optical melting and hydrogen exchange." Protein Sci **9**(10): 1873-7.
- Mayne, L., Y. Paterson, et al. (1992). "Effect of Antibody-Binding on Protein Motions Studied by Hydrogen-Exchange Labeling and 2-Dimensional Nmr." Biochemistry **31**(44): 10678-10685.
- Mayo, S. L. y R. L. Baldwin (1993). "Guanidinium Chloride Induction of Partial Unfolding in Amide Proton-Exchange in Rnase-A." Science **262**(5135): 873-876.
- McDonald, C. C. P., W.D. (1967). J. Am. Chem. Soc. **89**: 6332-6341.
- McKinnon, I. R., L. Fall, et al. (1984). "A twin titration microcalorimeter for the study of biochemical reactions." Anal Biochem **139**(1): 134-9.
- McPherson, D. T. (1988). "Codon preference reflects mistranslational constraints: a proposal." Nucleic Acids Res **16**(9): 4111-20.
- McPherson, P. S. (1999). "Regulatory role of SH3 domain-mediated protein-protein interactions in synaptic vesicle endocytosis." Cell Signal **11**(4): 229-38.
- Medved, L. V., E. I. Tiktopulo, et al. (1980). "[Microcalorimetric studies of temperature transitions in fibrinogen and its proteolytic fragments]." Mol Biol (Mosk) **14**(4): 835-42.
- Milne, J. S., Y. Xu, et al. (1999). "Experimental study of the protein folding landscape: unfolding reactions in cytochrome c." J. Mol. Biol. **290**(3): 811-822.
- Miyazaki, K., T. Senga, et al. (1999). "Critical amino acid substitutions in the Src SH3 domain that convert c-Src to be oncogenic." Biochem Biophys Res Commun **263**(3): 759-64.
- Molday, R. S., Englande.Sw, et al. (1972). "Primary Structure Effects on Peptide Group Hydrogen-Exchange." Biochemistry **11**(2): 150-&.
- Montgomery, D., R. Jordan, et al. (1993). "Thermodynamic and structural analysis of the folding/unfolding transitions of the Escherichia coli molecular chaperone DnaK." J Mol Biol **232**(2): 680-92.
- Morin, P. E., D. Diggs, et al. (1990). "Thermal stability of membrane-reconstituted yeast cytochrome c oxidase." Biochemistry **29**(3): 781-8.

- Müllen, K. y P. S. Pregosin (1976). Chapter 1. Fourier Transform NMR Techniques: A practical approach. A. Press.
- Mullis, K. B. y F. A. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol **155**: 335-50.
- Murphy, K. P. y E. Freire (1992). "Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behavior in proteins." Adv Protein Chem **43**: 313-61.
- Murphy, K. P., D. Xie, et al. (1993). "Structural energetics of peptide recognition: angiotensin II/antibody binding." Proteins **15**(2): 113-20.
- Musacchio, A., T. Gibson, et al. (1992). "SH3--an abundant protein domain in search of a function." FEBS Lett **307**(1): 55-61.
- Musacchio, A., M. Noble, et al. (1992). "Crystal structure of a Src-homology 3 (SH3) domain." Nature **359**(6398): 851-5.
- Musacchio, A., M. Saraste, et al. (1994). "High-resolution crystal structures of tyrosine kinase SH3 domains complexed with proline-rich peptides." Nat Struct Biol **1**(8): 546-51.
- Musacchio, A., M. Wilmanns, et al. (1994). "Structure and function of the SH3 domain." Prog Biophys Mol Biol **61**(3): 283-97.
- Navaza, J. (1994). "AMoRe: an automated package for molecular replacement." Acta Crystallographica Section A **50**(2): 157-163.
- Neira, J. L., L. S. Itzhaki, et al. (1997). "Hydrogen exchange in chymotrypsin inhibitor 2 probed by mutagenesis." J Mol Biol **270**(1): 99-110.
- Neira, J. L., P. Sevilla, et al. (1999). "Hydrogen exchange in ribonuclease A and ribonuclease S: evidence for residual structure in the unfolded state under native conditions." J Mol Biol **285**(2): 627-43.
- Neuhaus, D. W., M. (1989). The Nuclear Overhauser Effect in structural and conformational analysis. New York (USA), VCH Publishers.
- Nguyen, J. T., M. Porter, et al. (2000). "Improving SH3 domain ligand selectivity using a non-natural scaffold." Chem Biol **7**(7): 463-73.
- Nozaki, Y. y C. Tanford (1970). "Solubility of Amino Acids, Diglycine, and Triglycine in Aqueous Guanidine Hydrochloride Solutions." Journal of Biological Chemistry **245**(7): 1648-&.
- Oneyama, C., H. Nakano, et al. (2002). "UCS15A, a novel small molecule, SH3 domain-mediated protein-protein interaction blocking drug." Oncogene **21**(13): 2037-50.
- Otwinosky, Z. (1993). Proceedings of the CCP4 study weekend: Data collection and processing. Daresbury, U.K., Daresbury laboratory.
- Pace, C. N. (1986). "Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves." Methods Enzymol **131**: 266-80.
- Pan, H., J. C. Lee, et al. (2000). "Binding sites in Escherichia coli dihydrofolate reductase communicate by modulating the conformational ensemble." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(22): 12020-5.
- Panni, S., L. Dente, et al. (2002). "In vitro evolution of recognition specificity mediated by SH3 domains reveals target recognition rules." J Biol Chem **277**(24): 21666-74.
- Paterson, Y., S. W. Englander, et al. (1990). "An Antibody-Binding Site on Cytochrome-C Defined by Hydrogen- Exchange and 2-Dimensional Nmr." Science **249**(4970): 755-759.
- Pawson, T. (1995). "Protein modules and signalling networks." Nature **373**(6515): 573-80.

- Pawson, T. y G. D. Gish (1992). "Sh2 and Sh3 Domains - from Structure to Function." *Cell* **71**(3): 359-362.
- Pawson, T., M. Raina, et al. (2002). "Interaction domains: from simple binding events to complex cellular behavior." *FEBS Lett* **513**(1): 2-10.
- Pawson, T. y J. Schlessinger (1993). "Sh2 and Sh3 Domains." *Current Biology* **3**(7): 434-442.
- Pawson, T. y J. D. Scott (1997). "Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins." *Science* **278**(5346): 2075-80.
- Penzer, G. R. (1980).
- Peranen, J., M. Rikkonen, et al. (1996). "T7 vectors with modified T7lac promoter for expression of proteins in Escherichia coli." *Anal Biochem* **236**(2): 371-3.
- Permyakov, E. A. (1993). *Luminiscent Spectroscopy of Proteins*. Boca Raton (Florida, USA), CRC Press.
- Piotto, M., V. Saudek, et al. (1992). "Gradient-Tailored Excitation for Single-Quantum Nmr- Spectroscopy of Aqueous-Solutions." *Journal of Biomolecular Nmr* **2**(6): 661-665.
- Pisabarro, M. T., A. R. Ortiz, et al. (1994). "Molecular modeling of the interaction of polyproline-based peptides with the Abl-SH3 domain: rational modification of the interaction." *Protein Eng* **7**(12): 1455-62.
- Pisabarro, M. T. y L. Serrano (1996). "Rational design of specific high-affinity peptide ligands for the Abl-SH3 domain." *Biochemistry* **35**(33): 10634-40.
- Plaxco, K. W., J. I. Guijarro, et al. (1998). "The folding kinetics and thermodynamics of the Fyn-SH3 domain." *Biochemistry* **37**(8): 2529-37.
- Pople, J. A. S., W.G. & Bernstein, H.J. (1959). *High Resolution NMR*. New York (USA), McGraw Hill.
- Potter, H. (1988). "Electroporation in Biology - Methods, Applications, and Instrumentation." *Analytical Biochemistry* **174**(2): 361-373.
- Privalov, G., V. Kavina, et al. (1995). "Precise scanning calorimeter for studying thermal properties of biological macromolecules in dilute solution." *Anal Biochem* **232**(1): 79-85.
- Privalov, P. L. (1980). *Pure Appl. Chem.* **52**: 479-497.
- Privalov, P. L. (1989). "Thermodynamic problems of protein structure." *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **18**: 47-69.
- Privalov, P. L. y V. V. Filimonov (1978). "Thermodynamic analysis of transfer RNA unfolding." *J Mol Biol* **122**(4): 447-64.
- Privalov, P. L. y N. N. Khechinashvili (1974). "[Calorimetric study of the heat denaturation of cytochrome C]." *Biofizika* **19**(1): 14-8.
- Privalov, P. L. y N. N. Khechinashvili (1974). "A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: a calorimetric study." *J Mol Biol* **86**(3): 665-84.
- Privalov, P. L. y G. I. Makhatadze (1990). "Heat capacity of proteins. II. Partial molar heat capacity of the unfolded polypeptide chain of proteins: protein unfolding effects." *J Mol Biol* **213**(2): 385-91.
- Privalov, P. L. y S. A. Potekhin (1986). "Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins." *Methods Enzymol* **131**: 4-51.
- Privalov, P. L., E. I. Tiktopulo, et al. (1989). "Heat capacity and conformation of proteins in the denatured state." *J Mol Biol* **205**(4): 737-50.
- Privalov, P. L. M., J.R. (1965). *Prib. Tek. Eksp. (USSR)* **6**: 174.
- Radford, S. E., M. Buck, et al. (1992). "Hydrogen exchange in native and denatured states of hen egg-white lysozyme." *Proteins* **14**(2): 237-48.

Bibliografía.

- Ramsay, G. y E. Freire (1990). "Linked thermal and solute perturbation analysis of cooperative domain interactions in proteins. Structural stability of diphtheria toxin." *Biochemistry* **29**(37): 8677-83.
- Ramsey, N. F. y E. M. Purcell (1952). "Interactions between Nuclear Spins in Molecules." *Physical Review* **85**(1): 143-144.
- Ren, R., B. J. Mayer, et al. (1993). "Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site." *Science* **259**(5098): 1157-61.
- Renzoni, D. A., D. J. Pugh, et al. (1996). "Structural and thermodynamic characterization of the interaction of the SH3 domain from Fyn with the proline-rich binding site on the p85 subunit of PI3-kinase." *Biochemistry* **35**(49): 15646-53.
- Roberts, G. C. (1999). "NMR spectroscopy in structure-based drug design." *Curr Opin Biotechnol* **10**(1): 42-7.
- Roder, H. (1989). "Structural Characterization of Protein Folding Intermediates by Proton Magnetic-Resonance and Hydrogen-Exchange." *Methods in Enzymology* **176**: 446-473.
- Roder, H., G. A. Elove, et al. (1988). "Structural Characterization of Folding Intermediates in Cytochrome-C by H-Exchange Labeling and Proton Nmr." *Nature* **335**(6192): 700-704.
- Sadqi, M. (2000). Estudio Termodinámico de los estados parcialmente plegados del dominio SH3 de alfa espectralina. *Química-Física*. Granada, Granada: 347.
- Sadqi, M., S. Casares, et al. (1999). "The native state conformational ensemble of the SH3 domain from alpha-spectrin." *Biochemistry* **38**(28): 8899-906.
- Sadqi, M., S. Casares, et al. (2002). "The temperature dependence of the hydrogen exchange in the SH3 domain of alpha-spectrin." *FEBS Lett* **527**(1-3): 86-90.
- Sadqi, M., S. Casares, et al. (2002). "pH dependence of the hydrogen exchange in the SH3 domain of alpha-spectrin." *FEBS Lett* **514**(2-3): 295-9.
- Sanchez-Ruiz, J. M. (1995). "Differential scanning calorimetry of proteins." *Subcell Biochem* **24**: 133-76.
- Sanchez-Ruiz, J. M., J. L. Lopez-Lacomba, et al. (1988). "Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin." *Biochemistry* **27**(5): 1648-52.
- Sanchez-Ruiz, J. M., J. L. Lopez-Lacomba, et al. (1988). "Analysis of the thermal unfolding of porcine procarboxypeptidase A and its functional pieces by differential scanning calorimetry." *Eur J Biochem* **176**(1): 225-30.
- Sanchez-Ruiz, J. M. y M. Martinez-Carrion (1988). "A Fourier-transform infrared spectroscopic study of the phosphoserine residues in hen egg phosphovitin and ovalbumin." *Biochemistry* **27**(9): 3338-42.
- Sanz, J. M. y A. R. Fersht (1994). "Measurement of barnase refolding rate constants under denaturing conditions." *FEBS Lett* **344**(2-3): 216-20.
- Sanz, J. M., C. M. Johnson, et al. (1994). "The A-state of barnase." *Biochemistry* **33**(37): 11189-99.
- Scharf, S. J., G. T. Horn, et al. (1986). "Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences." *Science* **233**(4768): 1076-8.
- Schmid, F. X. y R. L. Baldwin (1979). "Detection of an Early Intermediate in the Folding of Ribonuclease-a by Protection of Amide Protons against Exchange." *Journal of Molecular Biology* **135**(1): 199-215.
- Schreier, A. A. y R. L. Baldwin (1976). "Concentration-Dependent Hydrogen-Exchange Kinetics of H-3- Labeled S-Peptide in Ribonuclease-S." *Journal of Molecular Biology* **105**(3): 409-426.

- Schumacher, T. N., L. M. Mayr, et al. (1996). "Identification of D-peptide ligands through mirror-image phage display." *Science* **271**(5257): 1854-7.
- Shaw, D. (1984). Chapter 3. *Fourier Transform NMR Spectroscopy*. Elsevier, Elsevier.
- Sheehan, D. (2000). Fluorescence Spectroscopy. *Physical Biochemistry: Principles and Applications*, Wiley: 74-88.
- Sibanda, B. L., T. L. Blundell, et al. (1989). "Conformation of beta-hairpins in protein structures. A systematic classification with applications to modelling by homology, electron density fitting and protein engineering." *J Mol Biol* **206**(4): 759-77.
- Sklenar, V., M. Piotto, et al. (1993). "Gradient-Tailored Water Suppression for H-1-N-15 Hsqc Experiments Optimized to Retain Full Sensitivity." *Journal of Magnetic Resonance Series A* **102**(2): 241-245.
- Skorski, T., M. Nieborowska-Skorska, et al. (1998). "The SH3 domain contributes to BCR/ABL-dependent leukemogenesis in vivo: role in adhesion, invasion, and homing." *Blood* **91**(2): 406-18.
- Stauffer, T. P., C. H. Martenson, et al. (1997). "Inhibition of Lyn function in mast cell activation by SH3 domain binding peptides." *Biochemistry* **36**(31): 9388-94.
- Stein, R. (1998). "SH2 and SH3 domains. Unraveling signaling networks with peptide antagonists." *Methods Mol Biol* **88**: 187-95.
- Stites, W. E., A. K. Meeker, et al. (1994). "Evidence for strained interactions between side-chains and the polypeptide backbone." *J Mol Biol* **235**(1): 27-32.
- Sturtevant, J. M. (1974). "Some applications of calorimetry in biochemistry and biology." *Annu Rev Biophys Bioeng* **3**(0): 35-51.
- Sudol, M. (1998). "From Src Homology domains to other signaling modules: proposal of the 'protein recognition code'." *Oncogene* **17**(11 Reviews): 1469-74.
- Tamura, A., K. Kimura, et al. (1991). "Cold denaturation and heat denaturation of Streptomyces subtilisin inhibitor. 1. CD and DSC studies." *Biochemistry* **30**(47): 11307-13.
- Thein, S. L. y R. B. Wallace (1986). *Human Genetic Diseases, a practical approach*. Virginia (USA), IRL Press.
- Thompson, K. S., C. R. Vinson, et al. (1993). "Thermodynamic characterization of the structural stability of the coiled-coil region of the bZIP transcription factor GCN4." *Biochemistry* **32**(21): 5491-6.
- Tobias, D. J. y C. L. Brooks, 3rd (1991). "Thermodynamics and mechanism of alpha helix initiation in alanine and valine peptides." *Biochemistry* **30**(24): 6059-70.
- Tong, A. H., B. Drees, et al. (2002). "A combined experimental and computational strategy to define protein interaction networks for peptide recognition modules." *Science* **295**(5553): 321-4.
- Tsalkova, T. N. y P. L. Privalov (1980). "Stability of troponin C." *Biochim Biophys Acta* **624**(1): 196-204.
- Tuchsen, E. y C. Woodward (1985). "Hydrogen Kinetics of Peptide Amide Protons at the Bovine Pancreatic Trypsin-Inhibitor Protein Solvent Interface." *Journal of Molecular Biology* **185**(2): 405-419.
- Tuchsen, E. y C. Woodward (1985). "Mechanism of Surface Peptide Proton-Exchange in Bovine Pancreatic Trypsin-Inhibitor - Salt Effects and O-Protonation." *Journal of Molecular Biology* **185**(2): 421-430.
- Udgaonkar, J. B. y R. L. Baldwin (1988). "Nmr Evidence for an Early Framework Intermediate on the Folding Pathway of Ribonuclease-A." *Nature* **335**(6192): 694-699.

Bibliografía.

- Uversky, V. N. (1993). "Use of fast protein size-exclusion liquid chromatography to study the unfolding of proteins which denature through the molten globule." *Biochemistry* **32**(48): 13288-98.
- Van Nuland, N. A., W. Meijberg, et al. (1998). "Slow cooperative folding of a small globular protein HPr." *Biochemistry* **37**(2): 622-37.
- Vega, M. C., J. C. Martinez, et al. (2000). "Thermodynamic and structural characterization of Asn and Ala residues in the disallowed II' region of the Ramachandran plot." *Protein Sci* **9**(12): 2322-8.
- Velazquez-Campoy, A. y E. Freire (2001). "Incorporating target heterogeneity in drug design." *J Cell Biochem Suppl Suppl* **37**: 82-8.
- Velazquez-Campoy, A., Y. Kiso, et al. (2001). "The binding energetics of first- and second-generation HIV-1 protease inhibitors: implications for drug design." *Arch Biochem Biophys* **390**(2): 169-75.
- Velazquez-Campoy, A., I. Luque, et al. (2001). "The application of thermodynamic methods in drug design." *Thermochimica Acta* **380**(2): 217-227.
- Velazquez-Campoy, A., I. Luque, et al. (2000). "Thermodynamic dissection of the binding energetics of KNI-272, a potent HIV-1 protease inhibitor." *Protein Sci* **9**(9): 1801-9.
- Velazquez-Campoy, A., M. J. Todd, et al. (2000). "HIV-1 protease inhibitors: enthalpic versus entropic optimization of the binding affinity." *Biochemistry* **39**(9): 2201-7.
- Velázquez-Campoy, A. e. a. (2000). *Review of Scientific Instruments* **71**: 1824-1831.
- Velázquez-Campoy, A. e. a. (2000). *Review of Scientific Instruments* **71**: 1832-1840.
- Vidal, M., V. Gigoux, et al. (2001). "SH2 and SH3 domains as targets for anti-proliferative agents." *Crit Rev Oncol Hematol* **40**(2): 175-86.
- Viguera, A. R., J. L. Arrondo, et al. (1994). "Characterization of the interaction of natural proline-rich peptides with five different SH3 domains." *Biochemistry* **33**(36): 10925-33.
- Viguera, A. R., J. C. Martinez, et al. (1994). "Thermodynamic and kinetic analysis of the SH3 domain of spectrin shows a two-state folding transition." *Biochemistry* **33**(8): 2142-50.
- Vogelstein, B. y D. Gillespie (1979). "Preparative and analytical purification of DNA from agarose." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(2): 615-9.
- Wadsö, I. (1970). *Q. Rev. Biophys.* **3**: 383.
- Wang, C., N. H. Pawley, et al. (2001). "The role of backbone motions in ligand binding to the c-Src SH3 domain." *J Mol Biol* **313**(4): 873-87.
- Wang, W., W. A. Lim, et al. (2001). "An analysis of the interactions between the Sem-5 SH3 domain and its ligands using molecular dynamics, free energy calculations, and sequence analysis." *J Am Chem Soc* **123**(17): 3986-94.
- Weinryb, I. S., R.F. (1971). *The Luminescence of aromatic amino acids. Excited States of Proteins and Nucleic Acids.* R. F. S. a. I. Weinryb. New York (USA), Plenum Press: 277-318.
- Wells, J. A., M. Vasser, et al. (1985). "Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites." *Gene* **34**(2-3): 315-23.
- Williams, D. C., Jr., D. C. Benjamin, et al. (1996). "Global changes in amide hydrogen exchange rates for a protein antigen in complex with three different antibodies." *J Mol Biol* **257**(4): 866-76.

- Wilmot, C. M. y J. M. Thornton (1988). "Analysis and prediction of the different types of beta-turn in proteins." *J Mol Biol* **203**(1): 221-32.
- Wiseman, T., S. Williston, et al. (1989). "Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter." *Anal Biochem* **179**(1): 131-7.
- Wishart, D. S. y D. A. Case (2001). "Use of chemical shifts in macromolecular structure determination." *Methods Enzymol* **338**: 3-34.
- Wishart, D. S. y A. M. Nip (1998). "Protein chemical shift analysis: a practical guide." *Biochem Cell Biol* **76**(2-3): 153-63.
- Wishart, D. S., B. D. Sykes, et al. (1991). "Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure." *J Mol Biol* **222**(2): 311-33.
- Wishart, D. S., B. D. Sykes, et al. (1992). "The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy." *Biochemistry* **31**(6): 1647-51.
- Witter, D. J., S. J. Famiglietti, et al. (1998). "Design and synthesis of SH3 domain binding ligands: modifications of the consensus sequence XPpXP." *Bioorg Med Chem Lett* **8**(22): 3137-42.
- Woodward, C., I. Simon, et al. (1982). "Hydrogen-Exchange and the Dynamic Structure of Proteins." *Molecular and Cellular Biochemistry* **48**(3): 135-160.
- Woodward, C. K. (1994). "Hydrogen-Exchange Rates and Protein-Folding." *Current Opinion in Structural Biology* **4**(1): 112-116.
- Woodward, C. K. y B. D. Hilton (1979). "Hydrogen-Exchange Kinetics and Internal Motions in Proteins and Nucleic-Acids." *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* **8**: 99-127.
- Woodward, C. K. y Rosenber.A (1971). "Studies of Hydrogen Exchange in Proteins .6. Urea Effects on Ribonuclease Exchange Kinetics Leading to a General Model for Hydrogen Exchange from Folded Proteins." *Journal of Biological Chemistry* **246**(13): 4114-&.
- Wüthrich, K. (1986). *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. New York.
- Wyman, J. G., S.J. (1990). *Binding and Linkage, Functional Chemistry of Biological Macromolecules.*, University books.
- Xie, D., V. Bhakuni, et al. (1991). "Calorimetric determination of the energetics of the molten globule intermediate in protein folding: apo-alpha-lactalbumin." *Biochemistry* **30**(44): 10673-8.
- Xie, D. y E. Freire (1994). "Structure based prediction of protein folding intermediates." *J Mol Biol* **242**(1): 62-80.
- Xu, W., S. C. Harrison, et al. (1997). "Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src." *Nature* **385**(6617): 595-602.
- Yang, A. S., B. Hitz, et al. (1996). "Free energy determinants of secondary structure formation: III. beta-turns and their role in protein folding." *J Mol Biol* **259**(4): 873-82.
- Yang, A. S. y B. Honig (1995). "Free energy determinants of secondary structure formation: I. alpha-Helices." *J Mol Biol* **252**(3): 351-65.
- Yang, A. S. y B. Honig (1995). "Free energy determinants of secondary structure formation: II. Antiparallel beta-sheets." *J Mol Biol* **252**(3): 366-76.
- Yi, Q. y D. Baker (1996). "Direct evidence for a two-state protein unfolding transition from hydrogen-deuterium exchange, mass spectrometry, and NMR." *Protein Sci* **5**(6): 1060-6.
- Yuzawa, S., M. Yokochi, et al. (2001). "Solution structure of Grb2 reveals extensive flexibility necessary for target recognition." *J Mol Biol* **306**(3): 527-37.

Bibliografía.

- Zhang, O. y J. D. Forman-Kay (1995). "Structural characterization of folded and unfolded states of an SH3 domain in equilibrium in aqueous buffer." Biochemistry **34**(20): 6784-94.
- Zhang, Y. Z. (1995). Protein and peptide structure and interactions studied by hydrogen exchange and NMR. Structural Biology and Molecular Biophysics. Philadelphia, Pennsylvania.
- Zhou, Y., C. K. Hall, et al. (1999). "The calorimetric criterion for a two-state process revisited." Protein Sci **8**(5): 1064-74.
- Zimmerman, U. y J. Vienken (1983). "Electric field induced cell to cell fusion." J. Membr. Biol. **65**: 165-82.
- Zoller, M. J. y M. Smith (1983). "Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors." Methods Enzymol **100**: 468-500.
- Zukin, R. S. (1979). "Evidence for a conformational change in the Escherichia coli maltose receptor by excited-state fluorescence lifetime data." Biochemistry **18**(11): 2139-45.

8. APÉNDICES.

Apéndice I.Tabla I.1.

Desplazamientos químicos de los hidrógenos N-H y C α -H en los espectros de RMN de la forma natural, WT, del dominio SH3-Spc en tampón 20mM glicina deuterada (d₅-gly), en H₂O : D₂O / 9 : 1 (v/v), a pH 3.0 y 27.1°C.

Aminoácido	$\delta_{\text{N-H}}$	$\delta_{\text{C}\alpha\text{-H}}$
D2	8.892	4.805
E3	8.616	4.520
T4	8.232	4.355
G5	8.431	4.019
K6	8.035	4.452
E7	8.657	4.586
L8	8.352	5.452
V9	9.183	5.280
L10	9.061	5.181
A11	9.102	4.669
L12	9.246	3.995
Y13	7.148	4.675
D14	8.416	4.640
Y15	8.729	4.732
Q16	7.680	4.616
E17	8.092	4.182
K18	8.596	4.469
S19	7.770	4.943
P20	–	4.597
R21	7.770	4.624
E22	7.869	5.540
V23	7.471	4.605
T24	7.606	5.087
M25	9.536	4.954
K26	8.330	4.936
K27	8.815	3.360
G28	8.894	3.589 / 4.529
D29	8.469	4.638
I30	8.202	5.049
L31	9.378	5.062
T32	8.450	4.681

Aminoácido	$\delta_{\text{N-H}}$	$\delta_{\text{C}\alpha\text{-H}}$
L33	9.052	4.453
L34	9.083	4.592
N35	7.683	4.791
S36	9.128	4.055
T37	8.215	4.053
N38	8.724	4.925
K39	8.512	4.310
D40	8.355	4.630
W41	8.201	5.152
W42	9.392	5.605
K43	8.946	4.508
V44	9.428	5.454
E45	8.734	5.486
V46	8.928	4.558
N47	9.441	4.395
D48	8.738	4.560
R49	8.230	4.741
Q50	8.536	5.584
G51	8.654	4.011
F52	9.272	5.728
V53	9.135	4.887
P54	–	3.661
A55	7.492	2.738
A56	7.822	4.070
Y57	7.750	4.822
V58	7.488	5.582
K59	8.689	4.903
K60	9.256	4.537
L61	8.542	4.516
D62	8.083	4.591

Tabla I.2.

Desplazamientos químicos de los hidrógenos N-H y C α -H en los espectros de RMN de la variante N47A del dominio SH3-Spc en tampón 20mM glicina deuterada (d₅-gly), en H₂O : D₂O / 9 : 1 (v/v), a pH 3.0 y 27.1°C.

Aminoácido	$\delta_{\text{N-H}}$	$\delta_{\text{C}\alpha\text{-H}}$
D2	8.946	*
E3	8.656	4.507
T4	8.248	4.345
G5	8.460	4.010
K6	8.072	4.419
E7	8.703	4.569
L8	8.379	5.457
V9	9.208	5.275
L10	9.064	5.162
A11	9.113	4.667
L12	9.276	3.970
Y13	7.125	4.657
D14	8.510	4.716
Y15	8.682	4.759
Q16	7.722	4.617
E17	8.152	4.123
K18	8.517	4.458
S19	7.780	4.935
P20	–	4.575
R21	7.800	4.617
E22	7.878	5.548
V23	7.490	4.606
T24	7.717	5.071
M25	9.558	4.941
K26	8.147	4.907
K27	8.764	3.352
G28	8.903	3.583 / 4.520
D29	8.434	4.645
I30	8.281	5.037
L31	8.404	5.060
T32	8.436	4.647

Aminoácido	$\delta_{\text{N-H}}$	$\delta_{\text{C}\alpha\text{-H}}$
L33	9.050	4.442
L34	9.092	4.577
N35	7.564	4.773
S36	9.168	4.031
T37	8.235	4.033
N38	8.769	4.912
K39	8.556	4.299
D40	8.387	4.627
W41	8.224	5.147
W42	9.412	5.599
K43	8.963	4.485
V44	9.429	5.417
E45	8.699	5.406
V46	8.908	4.492
A47	9.257	4.018
D48	8.490	4.723
R49	8.432	4.758
Q50	8.558	5.542
G51	8.654	4.001
F52	9.311	5.697
V53	9.130	4.865
P54	–	3.647
A55	7.490	2.278
A56	7.845	4.061
Y57	7.765	4.763
V58	7.495	5.574
K59	8.674	4.901
K60	9.296	4.521
L61	8.538	4.506
D62	8.160	4.606

Tabla I.3.

Desplazamientos químicos de los hidrógenos N-H y C α -H en los espectros de RMN de la variante N47G del dominio SH3-Spc en tampón 20mM glicina deuterada (d₅-gly), en H₂O : D₂O / 9 : 1 (v/v), a pH 3.0 y 27.1°C.

Aminoácido	$\delta_{\text{N-H}}$	$\delta_{\text{C}\alpha\text{-H}}$
D2	–	–
E3	8.657	4.509
T4	8.247	4.349
G5	8.452	4.012
K6	8.073	4.424
E7	8.696	4.568
L8	8.359	5.461
V9	9.199	5.277
L10	9.062	5.156
A11	9.114	4.668
L12	9.275	3.970
Y13	7.130	4.670
D14	8.513	4.711
Y15	8.678	4.750
Q16	7.712	4.621
E17	8.155	4.134
K18	8.525	4.468
S19	7.774	4.936
P20	–	4.551
R21	7.810	4.631
E22	7.881	5.551
V23	7.517	4.626
T24	7.676	5.084
M25	9.548	4.957
K26	8.110	4.927
K27	8.789	3.347
G28	8.913	3.609 / 4.523
D29	8.411	4.634
I30	8.298	5.027
L31	9.393	5.072
T32	8.381	4.628

Aminoácido	$\delta_{\text{N-H}}$	$\delta_{\text{C}\alpha\text{-H}}$
L33	9.050	4.442
L34	9.078	4.578
N35	7.653	4.772
S36	9.172	4.038
T37	8.240	4.037
N38	8.802	4.909
K39	8.557	4.304
D40	8.388	4.650
W41	8.227	5.147
W42	9.413	5.600
K43	8.964	4.482
V44	9.423	5.402
E45	8.696	5.331
V46	8.889	4.524
G47	9.202	4.066
D48	8.893	4.884
R49	8.259	4.747
Q50	8.550	5.526
G51	8.659	4.005
F52	9.301	5.678
V53	9.143	4.865
P54	–	3.624
A55	7.509	2.735
A56	7.852	4.067
Y57	7.824	4.815
V58	7.498	5.576
K59	8.670	4.903
K60	9.308	4.526
L61	8.552	4.515
D62	8.131	4.591

Tabla I.4.

Desplazamientos químicos de los hidrógenos N-H y C α -H en los espectros de RMN de la variante A56G del dominio SH3-Spc en tampón 20mM glicina deuterada (d₅-gly), en H₂O : D₂O / 9 : 1 (v/v), a pH 3.0 y 27.1°C.

Aminoácido	$\delta_{\text{N-H}}$	$\delta_{\text{C}\alpha\text{-H}}$
D2	–	–
E3	8.665	4.515
T4	8.265	4.346
G5	8.474	4.016
K6	8.074	4.447
E7	8.681	4.576
L8	8.388	5.430
V9	9.207	5.264
L10	9.050	5.186
A11	9.121	4.660
L12	9.214	3.953
Y13	7.100	4.713
D14	8.510	4.725
Y15	8.719	4.783
Q16	7.702	4.619
E17	8.140	4.150
K18	8.575	4.463
S19	7.777	4.934
P20	–	4.583
R21	7.788	4.622
E22	7.875	5.526
V23	7.482	4.609
T24	7.679	5.079
M25	9.570	4.946
K26	8.280	4.938
K27	8.840	3.355
G28	8.894	3.594 / 4.521
D29	8.464	4.636
I30	8.257	5.055
L31	9.385	5.072
T32	8.542	4.708

Aminoácido	$\delta_{\text{N-H}}$	$\delta_{\text{C}\alpha\text{-H}}$
L33	9.092	4.471
L34	9.094	4.589
N35	7.688	4.781
S36	9.177	4.033
T37	8.238	4.054
N38	8.746	4.918
K39	8.554	4.304
D40	8.419	4.629
W41	8.188	5.162
W42	9.452	5.599
K43	8.977	4.504
V44	9.441	5.437
E45	8.740	5.480
V46	8.951	4.555
N47	9.497	4.390
D48	8.772	4.562
R49	8.233	4.746
Q50	8.598	5.574
G51	8.666	3.995
F52	9.273	5.733
V53	9.130	4.848
P54	–	3.632
A55	7.379	2.638
G56	7.795	3.935
Y57	7.842	4.808
V58	7.399	5.580
K59	8.707	4.902
K60	9.263	4.509
L61	8.524	4.503
D62	8.141	4.593

Tabla I.5.

Desplazamientos químicos de los hidrógenos N-H y C α -H en los espectros de RMN de la variante A56S del dominio SH3-Spc en tampón 20mM glicina deuterada (d₅-gly), en H₂O : D₂O / 9 : 1 (v/v), a pH 3.0 y 27.1°C.

Aminoácido	δ_{N-H}	$\delta_{C\alpha-H}$
D2	–	–
E3	8.665	4.517
T4	8.259	4.353
G5	8.472	4.019
K6	8.079	4.439
E7	8.713	4.570
L8	8.379	5.466
V9	9.206	5.275
L10	9.062	5.174
A11	9.098	4.670
L12	9.297	3.938
Y13	7.112	4.744
D14	8.559	4.722
Y15	8.719	4.834
Q16	7.719	4.623
E17	8.152	4.134
K18	8.521	4.467
S19	7.783	4.940
P20	–	4.579
R21	7.807	4.623
E22	7.875	5.535
V23	7.469	4.617
T24	7.693	5.067
M25	9.560	4.939
K26	8.170	4.934
K27	8.790	3.361
G28	8.912	3.590 / 4.521
D29	8.447	4.624
I30	8.271	5.042
L31	9.402	5.067
T32	8.476	4.670

Aminoácido	δ_{N-H}	$\delta_{C\alpha-H}$
L33	9.063	4.459
L34	9.098	4.578
N35	7.666	4.778
S36	9.174	4.033
T37	8.251	4.045
N38	8.778	4.924
K39	8.566	4.315
D40	8.418	4.662
W41	8.205	5.174
W42	9.426	5.603
K43	8.964	4.473
V44	9.427	5.438
E45	8.697	5.484
V46	8.963	4.562
N47	9.495	4.393
D48	8.771	4.572
R49	8.238	4.750
Q50	8.600	5.589
G51	8.662	4.003
F52	9.307	5.707
V53	9.116	4.824
P54	–	3.690
A55	7.518	2.764
S56	7.811	4.132
Y57	7.925	4.783
V58	7.456	5.590
K59	8.677	4.903
K60	9.299	4.526
L61	8.550	4.515
D62	8.149	4.600

Tabla I.6.

Desplazamientos químicos de los hidrógenos N-H y C α -H en los espectros de RMN de la variante R21A, del dominio SH3-Spc en tampón 20mM glicina deuterada (d₅-gly), en H₂O : D₂O / 9 : 1 (v/v), a pH 3.0 y 27.1°C.

Aminoácido	$\delta_{\text{N-H}}$	$\delta_{\text{C}\alpha\text{-H}}$
D2	8.899	4.789
E3	8.630	4.521
T4	8.226	4.351
G5	8.436	4.021
K6	8.035	4.444
E7	8.661	4.579
L8	8.334	5.459
V9	9.162	5.283
L10	9.028	5.176
A11	9.074	4.674
L12	9.253	3.986
Y13	7.099	4.674
D14	–	–
Y15	8.699	4.818
Q16	7.706	4.624
E17	8.121	4.129
K18	8.369	4.483
S19	7.780	5.022
P20	–	4.576
A21	7.742	4.576
E22	7.787	5.510
V23	7.441	4.603
T24	7.638	5.072
M25	9.516	4.958
K26	8.252	4.939
K27	8.787	3.354
G28	8.866	4.536
D29	8.436	4.618
I30	8.204	5.049
L31	9.356	5.068
T32	8.442	4.668

Aminoácido	$\delta_{\text{N-H}}$	$\delta_{\text{C}\alpha\text{-H}}$
L33	9.029	4.466
L34	9.067	4.593
N35	7.640	4.813
S36	9.129	4.069
T37	8.213	4.041
N38	8.751	4.915
K39	8.513	4.312
D40	8.353	4.634
W41	8.120	5.139
W42	9.342	5.620
K43	8.962	4.571
V44	9.384	5.461
E45	8.693	5.502
V46	8.916	4.556
N47	9.457	4.401
D48	8.732	4.563
R49	8.187	4.752
Q50	8.544	5.612
G51	8.625	3.971
F52	9.264	5.706
V53	9.093	4.847
P54	–	–
A55	7.475	2.740
A56	7.810	4.061
Y57	7.742	4.814
V58	7.456	5.583
K59	8.646	4.908
K60	9.264	4.531
L61	8.518	4.512
D62	8.086	4.596

Tabla I.7.

Desplazamientos químicos de los hidrógenos N-H y C α -H en los espectros de RMN de la variante R21G, del dominio SH3-Spc en tampón 20mM glicina deuterada (d₅-gly), en H₂O : D₂O / 9 : 1 (v/v), a pH 3.0 y 27.1°C.

Aminoácido	$\delta_{\text{N-H}}$	$\delta_{\text{C}\alpha\text{-H}}$
D2	8.901	4.793
E3	8.630	4.517
T4	8.229	4.350
G5	8.440	4.020
K6	8.039	4.440
E7	8.673	4.573
L8	8.347	5.456
V9	9.166	5.276
L10	9.038	5.173
A11	9.084	4.670
L12	9.257	3.987
Y13	7.099	4.669
D14	8.470	4.776
Y15	8.619	4.868
Q16	7.762	4.612
E17	8.145	4.116
K18	8.345	4.475
S19	7.806	4.991
P20	–	4.431
G21	–	–
E22	7.644	5.507
V23	7.644	4.599
T24	7.620	5.063
M25	9.521	4.944
K26	8.259	4.927
K27	8.764	3.353
G28	8.866 / 8.821	3.610 / 4.489
D29	8.434	4.631
I30	8.212	5.049
L31	9.367	5.056
T32	8.469	4.683

Aminoácido	$\delta_{\text{N-H}}$	$\delta_{\text{C}\alpha\text{-H}}$
L33	9.042	4.459
L34	9.068	4.584
N35	7.764	4.775
S36	9.130	4.074
T37	8.218	4.034
N38	8.758	4.902
K39	8.518	4.312
D40	8.373	4.633
W41	8.095	5.140
W42	9.350	5.616
K43	8.942	4.543
V44	9.391	5.461
E45	8.720	5.500
V46	8.913	4.557
N47	9.463	4.393
D48	8.739	4.556
R49	8.198	4.751
Q50	8.548	5.607
G51	8.621	3.969
F52	9.207	5.695
V53	9.104	4.823
P54	–	3.674
A55	7.476	2.737
A56	7.831	4.072
Y57	7.764	4.784
V58	7.467	5.591
K59	8.657	4.904
K60	9.265	4.530
L61	8.521	4.511
D62	8.096	4.594

Apéndice II.

Valores de las constantes intrínsecas, k_{int} , y observadas experimentalmente, k_{obs} , de intercambio así como el factor de protección, FP, de los hidrógenos amida de cada uno de los restos aminoacídicos de las diferentes variantes del dominio SH3-Spc estudiadas por IHD. En todos los casos, las condiciones experimentales son: tampón 20mM glicina deuterada (d_5 -gly) en 99.8% D_2O , pH* 3.01 y 27.10°C de temperatura. La concentración de proteína en cada experimento está cercana a 4.5mM.

Los valores de pH* en cada experimento son las medidas directas del pHmetro, sin corregir por el efecto isotópico (ver apartado 4.6.1.2 de la sección Materiales y Métodos).

En las tablas siguientes, tanto k_{int} como k_{obs} vienen expresadas en s^{-1} . En la tabla aparecen residuos para los que no se indican valores de k_{obs} como resultado de fenómenos de solapamiento de sus señales correspondientes, ya sea con la señal de otro residuo del dominio o con la señal residual del agua o bien porque su intercambio con el disolvente tiene lugar demasiado rápidamente, lo que no ha permitido seguir su cinética de IHD. Asimismo, se indica la posición de cada una de las mutaciones realizadas, con un recuadro doble alrededor del resto mutado en cada caso.

Se ha procurado que tanto las constantes de intercambio observadas, k_{obs} , como los factores de protección determinados a partir de ellas, FP, tuviesen el mismo número de cifras decimales, de manera que se ha tomado como criterio que el número de cifras decimales de ambos coincida con la primera cifra del error de la k_{obs} en cada caso. Este criterio no se ha seguido en el caso de las constantes intrínsecas, k_{int} , dado que se han determinado a partir de datos tabulados, referidos a compuestos peptídicos modelo ({Bai, 1993 #165}). En este caso se han considerado dos decimales como suficientes, salvo en el caso del resto D2.

Tabla II.1.

Datos de IHD para la variante natural, WT, del dominio SH3-Spc. El pH* medido fue de 3.01 y la concentración de proteína fue de 4.07 mM.

Residuo	$10^4 \cdot k_{int}$	$10^4 \cdot k_{obs}$	<i>FP</i>
D2	3482	–	–
E3	89.40	–	–
T4	38.30	–	–
G5	59.30	–	–
K6	28.80	–	–
E7	40.70	–	–
L8	12.50	1.50	8.31
V9	3.07	0.18	16.55
L10	4.41	0.24	18.65
A11	15.70	0.36	43.91
L12	6.48	0.2	30.7
Y13	7.92	0.261	30.306
D14	73.30	3.36	21.84
Y15	32.70	0.74	44.11
Q16	26.20	3.1	8.3
E17	48.80	–	–
K18	41.30	–	–
S19	62.00	7	9
P20	0	–	–
R21	14.50	–	–
E22	51.00	3.4	14.8
V23	9.38	0.82	11.48
T24	12.60	2.5	5.1
M25	31.00	1.55	19.97
K26	23.90	1.7	14.2
K27	24.40	1.0	25.1
G28	50.00	1.9	26.2
D29	98.00	–	–
I30	11.30	0.97	11.58
L31	3.39	0.216	15.681
T32	11.00	0.47	22.94

Residuo	$10^4 \cdot k_{int}$	$10^4 \cdot k_{obs}$	<i>FP</i>
L33	8.658	0.37	23.67
L34	4.15	0.24	16.98
N35	38.60	0.9	41.3
S36	98.20	–	–
T37	33.90	5.7	6.0
N38	97.30	4.0	24.0
K39	38.70	–	–
D40	86.10	–	–
W41	24.20	1.01	24.07
W42	6.66	0.110	60.530
K43	14.50	0.31	46.59
V44	5.64	0.203	27.784
E45	22.60	0.69	32.73
V46	9.38	0.31	30.20
N47	44.90	–	–
D48	136.40	–	–
R49	70.20	1.73	40.43
Q50	38.50	1.87	20.53
G51	59.90	1.3	44.8
F52	19.20	1.05	13.32
V53	4.85	0.198	24.552
P54	0	–	–
A55	14.40	0.44	32.74
A56	24.50	1.7	14.4
Y57	12.50	0.35	35.95
V58	4.80	0.156	30.732
K59	13.70	0.46	29.78
K60	24.40	3.4	7.2
L61	7.51	1.46	5.16
D62	9.01	–	–

Tabla II.2.

Datos de IHD para el mutante N47G, del dominio. El pH* medido fue de 3.05 y la concentración de proteína fue de 4.57 mM.

Residuo	$10^4 \cdot k_{int}$	$10^4 \cdot k_{obs}$	<i>FP</i>
D2	3514	–	–
E3	89.80	–	–
T4	39.50	–	–
G5	61.70	–	–
K6	29.80	–	–
E7	41.90	–	–
L8	12.80	1.11	11.53
V9	3.12	0.087	35.723
L10	4.51	0.11	40.20
A11	15.90	0.150	105.826
L12	6.58	0.11	60.17
Y13	8.07	0.123	65.605
D14	73.90	3.0	24.7
Y15	33.00	0.39	83.79
Q16	27.20	2.11	12.88
E17	50.20	2.5	19.9
K18	42.60	–	–
S19	64.50	6	11
P20	0	–	–
R21	15.00	–	–
E22	52.50	2.0	26.0
V23	9.64	0.44	21.69
T24	13.10	1.57	8.33
M25	32.20	0.60	53.74
K26	24.80	1.01	24.65
K27	25.40	0.6	41.8
G28	51.90	–	–
D29	98.80	–	–
I30	11.40	0.71	16.02
L31	3.49	0.109	32.016
T32	11.30	0.2	44.6

Residuo	$10^4 \cdot k_{int}$	$10^4 \cdot k_{obs}$	<i>FP</i>
L33	8.98	0.157	57.138
L34	4.20	0.085	49.568
N35	40.10	0.57	69.78
S36	102.00	–	–
T37	35.30	3.7	9.5
N38	101.30	2.7	36.9
K39	40.10	–	–
D40	86.90	2.6	33.1
W41	24.50	0.65	37.82
W42	6.845	0.065	104.450
K43	15.00	0.137	109.709
V44	5.82	0.086	67.403
E45	23.20	0.32	73.69
V46	9.64	0.129	74.932
G47	29.10	–	–
D48	98.80	–	–
R49	71.20	1.16	61.32
Q50	39.90	1.26	31.69
G51	62.20	0.69	90.54
F52	19.70	0.50	39.78
V53	5.01	0.12	41.73
P54	0	–	–
A55	14.60	0.25	59.42
A56	24.90	1.29	19.37
Y57	12.70	0.168	75.681
V58	4.95	0.080	61.669
K59	14.20	0.208	68.409
K60	25.40	2.5	10.0
L61	7.74	1.05	7.36
D62	8.73	–	–

Tabla II.3.

Datos de IHD para el mutante A56G, del dominio. El pH* medido fue de 3.10 y la concentración de proteína fue de 5.30 mM.

Residuo	$10^4 \cdot k_{int}$	$10^4 \cdot k_{obs}$	<i>FP</i>
D2	3556	–	–
E3	90.20	–	–
T4	41.20	–	–
G5	64.90	–	–
K6	31.10	–	–
E7	43.40	–	–
L8	13.20	2.21	6.00
V9	3.19	0.351	9.110
L10	4.66	0.44	10.52
A11	16.30	0.71	23.04
L12	6.75	0.40	17.02
Y13	8.31	0.477	17.428
D14	74.8	6	12
Y15	33.60	2.2	15.0
Q16	28.60	4.5	6.4
E17	52.10	–	–
K18	44.40	–	–
S19	67.90	9	7
P20	0	–	–
R21	15.70	–	–
E22	54.50	6.2	8.8
V23	9.99	1.66	6.01
T24	13.70	4.1	3.3
M25	34.00	3.7	9.2
K26	26.10	3.2	8.2
K27	26.70	–	–
G28	54.50	4.8	11.4
D29	99.80	–	–
I30	11.60	1.97	5.87
L31	3.63	0.42	8.61
T32	11.90	1.00	11.91
L33	9.41	0.70	13.39
L34	4.29	0.46	9.22
N35	42.20	2.2	18.9
S36	107.50	–	–
T37	37.20	11	4
N38	106.80	2	44
K39	42.20	–	–
D40	87.90	–	–
W41	24.80	1.51	16.47
W42	7.12	0.25	28.70
K43	15.80	0.66	23.96
V44	6.08	0.34	18.04
E45	24.10	1.31	18.42
V46	9.99	0.77	13.01
N47	49.20	–	–
D48	139.20	–	–
R49	72.60	4.6	15.7
Q50	42.00	3.6	11.8
G51	65.40	4.2	15.7
F52	20.40	2.1	9.6
V53	5.24	0.53	9.93
P54	0	–	–
A55	15.00	1.2	12.0
G56	42.80	–	–
Y57	19.80	1.2	16.0
V58	5.16	0.50	10.43
K59	14.90	1.22	12.19
K60	26.70	7	4
L61	8.07	2.4	3.3
D62	8.42	–	–

Tabla II.4.

Datos de IHD para el mutante A56S, del dominio. El pH* medido fue de 3.05 y la concentración de proteína fue de 5.50 mM.

Residuo	$10^4 \cdot k_{int}$	$10^4 \cdot k_{obs}$	<i>FP</i>
D2	3525	–	–
E3	90.10	–	–
T4	39.70	–	–
G5	61.90	–	–
K6	29.90	–	–
E7	42.00	–	–
L8	12.80	1.40	9.13
V9	3.13	0.20	15.80
L10	4.52	0.19	24.14
A11	16.00	0.34	46.67
L12	6.60	0.19	34.52
Y13	8.09	0.24	33.52
D14	74.20	4.4	17.0
Y15	33.10	0.74	44.91
Q16	27.20	3.0	9.2
E17	50.40	–	–
K18	42.80	–	–
S19	64.70	7	9
P20	0	–	–
R21	15.00	–	–
E22	52.70	3.7	14.2
V23	9.67	0.82	11.80
T24	13.10	2.4	5.5
M25	32.30	1.47	21.98
K26	24.90	1.61	15.43
K27	25.50	–	–
G28	52.10	1.7	30.2
D29	99.10	–	–
I30	11.40	1.03	11.14
L31	3.50	0.202	17.339
T32	11.40	0.47	24.00
L33	9.01	0.33	27.42
L34	4.22	0.180	23.470
N35	40.20	1.0	40.6
S36	132.40	–	–
T37	35.40	5.0	7.1
N38	101.60	4.0	24.4
K39	40.30	–	–
D40	87.10	–	–
W41	24.50	0.93	26.40
W42	6.87	0.14	50.29
K43	15.10	0.32	47.45
V44	5.84	0.163	35.774
E45	23.30	0.59	39.69
V46	9.67	0.36	26.67
N47	46.80	–	–
D48	13.80	–	–
R49	71.50	1.86	38.50
Q50	40.10	1.86	21.51
G51	62.40	1.4	44.1
F52	19.80	1.10	17.96
V53	5.02	0.22	23.19
P54	0	–	–
A55	14.70	0.49	29.90
S56	50.00	3.4	14.8
Y57	22.80	0.7	30.6
V58	4.96	0.210	23.585
K59	14.20	0.47	30.14
K60	25.50	4.5	5.7
L61	7.76	1.54	5.03
D62	8.75	–	–

Tabla II.5.

Datos de IHD para el mutante R21A, del dominio. El pH* medido fue de 3.00 y la concentración de proteína fue de 4.20 mM.

Residuo	$10^4 \cdot k_{int}$	$10^4 \cdot k_{obs}$	<i>FP</i>
D2	3474	–	–
E3	89.30	–	–
T4	38.00	–	–
G5	58.80	–	–
K6	28.60	–	–
E7	40.40	–	–
L8	12.40	1.4	8.7
V9	3.06	0.188	16.252
L10	4.39	0.20	22.28
A11	15.70	0.37	42.37
L12	6.46	0.22	28.96
Y13	7.88	0.237	33.276
D14	73.10	–	–
Y15	32.60	0.52	62.00
Q16	25.90	3.4	7.7
E17	48.50	4	12
K18	41.00	–	–
S19	61.40	6	10
P20	0	–	–
A21	14.40	–	–
E22	31.40	4.7	6.6
V23	9.32	0.84	11.08
T24	12.50	2.4	5.2
M25	30.70	1.44	21.25
K26	23.70	1.5	15.4
K27	24.20	–	–
G28	49.60	1.6	30.2
D29	97.80	1.3	74.5
I30	11.20	0.98	11.45
L31	3.37	0.21	16.07
T32	10.90	0.48	22.38
L33	8.61	0.34	25.02
L34	4.14	0.25	16.34
N35	38.30	1.5	25.2
S36	97.20	–	–
T37	33.60	8	4
N38	96.40	4.3	22.4
K39	38.30	–	–
D40	85.90	0.5	164.2
W41	24.20	0.97	24.87
W42	6.62	0.115	57.707
K43	14.40	0.31	46.59
V44	5.60	0.180	31.139
E45	22.50	0.68	33.05
V46	9.32	0.34	27.23
N47	44.50	–	–
D48	136.10	–	–
R49	70.00	1.81	38.73
Q50	38.10	1.89	20.13
G51	59.40	1.4	41.4
F52	19.10	1.10	17.34
V53	4.82	0.24	20.41
P54	0	–	–
A55	14.40	0.5	27.6
A56	24.40	1.8	13.6
Y57	12.40	0.30	40.72
V58	4.76	0.159	29.862
K59	13.60	0.47	29.10
K60	24.20	4	6
L61	7.47	1.38	5.41
D62	9.08	–	–

Tabla II.6.

Datos de IHD para el mutante R21G, del dominio. El pH* medido fue de 3.06 y la concentración de proteína fue de 4.44 mM.

Residuo	$10^4 \cdot k_{int}$	$10^4 \cdot k_{obs}$	<i>FP</i>
D2	3522	–	–
E3	89.90	–	–
T4	39.90	–	–
G5	62.30	–	–
K6	30.00	–	–
E7	42.20	–	–
L8	12.90	1.24	10.34
V9	3.13	0.072	43.246
L10	4.54	0.100	45.502
A11	16.00	0.30	53.74
L12	6.61	0.086	76.698
Y13	8.11	0.102	79.363
D14	74.10	–	–
Y15	33.10	0.9	36.1
Q16	27.40	4.2	6.4
E17	50.60	–	–
K18	43.00	–	–
S19	65.10	2.4	27.6
P20	0	–	–
G21	23.90	–	–
E22	48.40	6	8
V23	9.71	0.73	13.23
T24	13.20	1.95	6.77
M25	32.60	0.59	55.24
K26	25.10	0.78	32.02
K27	25.60	–	–
G28	52.40	0.3	161.7
D29	99.00	0.9	113.2
I30	11.40	0.60	18.94
L31	3.52	0.909	38.696
T32	11.40	0.23	49.16

Residuo	$10^4 \cdot k_{int}$	$10^4 \cdot k_{obs}$	<i>FP</i>
L33	9.06	0.14	62.91
L34	4.22	0.14	30.90
N35	40.50	–	–
S36	103.10	–	–
T37	35.60	4.8	7.4
N38	102.30	3.7	27.8
K39	40.50	–	–
D40	87.10	–	–
W41	24.50	0.64	38.22
W42	6.90	0.059	116.472
K43	15.20	0.12	122.80
V44	5.87	0.076	77.3371
E45	23.40	0.268	87.116
V46	9.71	0.148	65.747
N47	47.20	–	–
D48	137.90	–	–
R49	71.50	0.81	88.36
Q50	40.30	1.44	27.92
G51	62.80	0.6	113.5
F52	19.80	0.68	29.10
V53	5.05	0.10	48.20
P54	0	–	–
A55	14.70	0.20	72.78
A56	25.00	1.3	19.4
Y57	12.80	0.12	102.09
V58	4.99	0.064	78.164
K59	14.30	0.173	82.795
K60	25.60	2.5	10.2
L61	7.80	1.08	7.18
D62	8.66	–	–

Apéndice III.

Tabla III.1.

Desplazamientos químicos de los hidrógenos N-H y C α -H en los espectros de RMN del mutante R21A del dominio SH3-Spc, libre, *razón molar* 0, en tampón 20mM glicina deuterada (d₅-gly), en H₂O : D₂O / 9 : 1 (v/v), a pH 3.0 y 25°C.

Aminoácido	δ_{N-H}	$\delta_{C\alpha-H}$
D2	8.890	4.745
E3	8.635	4.465
T4	8.239	4.298
G5	8.447	3.968
K6	8.030	4.393
E7	8.666	4.533
L8	8.351	5.415
V9	9.168	5.234
L10	9.028	5.129
A11	9.089	4.617
L12	9.255	3.931
Y13	7.099	4.622
D14	8.407	4.661
Y15	8.689	4.723
Q16	7.677	4.565
E17	8.103	4.099
K18	8.444	4.427
S19	7.777	4.897
P20	–	4.535
A21	7.755	4.534
E22	7.793	5.455
V23	7.450	4.547
T24	7.605	5.032
M25	9.519	4.908
K26	8.358	4.889
K27	8.835	3.296
G28	8.859	3.544
D29	8.456	4.580
I30	8.192	5.008
L31	9.363	5.017
T32	8.453	4.629

Aminoácido	δ_{N-H}	$\delta_{C\alpha-H}$
L33	9.033	4.412
L34	9.068	4.542
N35	7.648	4.738
S36	9.133	4.008
T37	8.200	3.988
N38	8.725	4.857
K39	8.506	4.259
D40	8.330	4.576
W41	8.089	5.085
W42	9.334	5.563
K43	8.959	4.528
V44	9.383	5.412
E45	8.695	5.455
V46	8.909	4.506
N47	9.464	4.344
D48	8.736	4.503
R49	8.181	4.697
Q50	8.542	5.561
G51	8.629	4.527
F52	9.255	5.658
V53	9.078	4.796
P54	–	3.612
A55	7.467	2.691
A56	7.824	4.022
Y57	7.742	4.770
V58	7.451	5.546
K59	8.650	4.852
K60	9.255	4.487
L61	8.514	4.461
D62	8.077	4.536

Tabla III.2.

Desplazamientos químicos de los hidrógenos N-H y C α -H en los espectros de RMN del mutante R21A del dominio SH3-Spc, complejado con el ligando p41, *razón molar* 0.11, en tampón 20mM glicina deuterada (d₅-gly), en H₂O : D₂O / 9 : 1 (v/v), a pH 3.0 y 25°C.

Aminoácido	$\delta_{\text{N-H}}$	$\delta_{\text{C}\alpha\text{-H}}$
D2	8.891	4.745
E3	8.635	4.465
T4	8.239	4.298
G5	8.441	3.968
K6	8.031	4.390
E7	8.667	4.532
L8	8.351	5.414
V9	9.169	5.233
L10	9.026	5.128
A11	9.090	4.615
L12	9.253	3.918
Y13	7.101	4.638
D14	8.414	4.662
Y15	8.682	4.723
Q16	7.661	4.567
E17	8.102	4.106
K18	8.461	4.429
S19	7.777	4.896
P20	–	4.535
A21	7.735	4.535
E22	7.804	5.457
V23	7.454	4.553
T24	7.602	5.032
M25	9.524	4.908
K26	8.347	4.893
K27	8.840	3.296
G28	8.863	3.544
D29	8.454	4.579
I30	8.196	5.006
L31	9.362	5.017
T32	8.451	4.629

Aminoácido	$\delta_{\text{N-H}}$	$\delta_{\text{C}\alpha\text{-H}}$
L33	9.032	4.411
L34	9.069	4.542
N35	7.641	4.737
S36	9.134	4.007
T37	8.201	3.990
N38	8.725	4.857
K39	8.506	4.260
D40	8.344	4.575
W41	8.114	5.101
W42	9.360	5.566
K43	8.950	4.499
V44	9.383	5.411
E45	8.688	5.451
V46	8.911	4.504
N47	9.462	4.345
D48	8.733	4.504
R49	8.182	4.697
Q50	8.544	5.558
G51	8.630	4.527
F52	9.271	5.645
V53	9.078	4.796
P54	–	3.612
A55	7.497	2.696
A56	7.868	4.036
Y57	7.764	4.773
V58	7.454	5.544
K59	8.650	4.853
K60	9.255	4.487
L61	8.513	4.460
D62	8.076	4.536

Tabla III.3.

Desplazamientos químicos de los hidrógenos N-H y C α -H en los espectros de RMN del mutante R21A del dominio SH3-Spc, complejoado con el ligando p41, *razón molar* 0.22, en tampón 20mM glicina deuterada (d₅-gly), en H₂O : D₂O / 9 : 1 (v/v), a pH 3.0 y 25°C.

Aminoácido	$\delta_{\text{N-H}}$	$\delta_{\text{C}\alpha\text{-H}}$
D2	8.891	4.744
E3	8.634	4.465
T4	8.238	4.301
G5	8.442	3.969
K6	8.031	4.390
E7	8.668	4.534
L8	8.354	5.412
V9	9.171	5.233
L10	9.024	5.126
A11	9.092	4.615
L12	9.254	3.912
Y13	7.103	4.650
D14	8.427	4.662
Y15	8.678	4.726
Q16	7.650	4.569
E17	8.101	4.113
K18	8.478	4.436
S19	7.777	4.899
P20	–	4.535
A21	7.720	4.539
E22	7.816	5.464
V23	7.457	4.559
T24	7.604	5.033
M25	9.528	4.910
K26	8.341	4.895
K27	8.841	3.301
G28	8.868	3.543
D29	8.453	4.583
I30	8.198	5.005
L31	9.363	5.017
T32	8.445	4.626

Aminoácido	$\delta_{\text{N-H}}$	$\delta_{\text{C}\alpha\text{-H}}$
L33	9.032	4.409
L34	9.070	4.538
N35	7.635	4.740
S36	9.141	4.007
T37	8.202	3.990
N38	8.723	4.852
K39	8.507	4.261
D40	8.358	4.576
W41	8.136	5.108
W42	9.385	5.567
K43	8.942	4.472
V44	9.383	5.407
E45	8.681	5.450
V46	8.912	4.506
N47	9.463	4.345
D48	8.733	4.504
R49	8.184	4.697
Q50	8.546	5.556
G51	8.630	4.529
F52	9.285	5.636
V53	9.078	4.796
P54	–	3.612
A55	7.523	2.702
A56	7.906	4.048
Y57	7.782	4.74
V58	7.458	5.544
K59	8.653	4.855
K60	9.255	4.487
L61	8.513	4.459
D62	8.076	4.536

Tabla III.4.

Desplazamientos químicos de los hidrógenos N-H y C α -H en los espectros de RMN del mutante R21A del dominio SH3-Spc, complejoado con el ligando p41, *razón molar* 0.56, en tampón 20mM glicina deuterada (d₅-gly), en H₂O : D₂O / 9 : 1 (v/v), a pH 3.0 y 25°C.

Aminoácido	$\delta_{\text{N-H}}$	$\delta_{\text{C}\alpha\text{-H}}$
D2	8.893	4.749
E3	8.633	4.464
T4	8.235	4.300
G5	8.442	3.969
K6	8.032	4.390
E7	8.670	4.528
L8	8.356	5.415
V9	9.174	5.233
L10	8.022	5.125
A11	8.094	4.605
L12	9.250	3.883
Y13	7.103	4.689
D14	8.454	4.657
Y15	8.659	4.725
Q16	7.611	4.576
E17	8.098	4.134
K18	8.532	4.435
S19	7.775	4.905
P20	–	4.535
A21	7.693	4.542
E22	7.847	5.469
V23	7.466	4.574
T24	7.590	5.036
M25	9.536	4.905
K26	8.311	4.906
K27	8.847	3.309
G28	8.882	3.540
D29	8.447	4.578
I30	8.205	4.991
L31	9.360	5.016
T32	8.436	4.630

Aminoácido	$\delta_{\text{N-H}}$	$\delta_{\text{C}\alpha\text{-H}}$
L33	9.030	4.403
L34	9.071	4.532
N35	7.612	4.733
S36	9.153	4.003
T37	8.205	4.000
N38	8.723	4.848
K39	8.513	4.264
D40	8.394	4.569
W41	8.205	5.151
W42	9.456	5.568
K43	8.916	4.386
V44	9.381	5.402
E45	8.658	5.436
V46	8.916	4.503
N47	9.461	4.343
D48	8.729	4.512
R49	8.186	4.698
Q50	8.550	5.547
G51	8.627	4.525
F52	9.325	5.607
V53	9.076	4.796
P54	–	3.612
A55	7.550	2.717
A56	8.024	4.075
Y57	7.834	4.772
V58	7.466	5.549
K59	8.657	4.858
K60	9.251	4.487
L61	8.513	4.469
D62	8.079	4.537

Tabla III.5.

Desplazamientos químicos de los hidrógenos N-H y C_α-H en los espectros de RMN del mutante R21A del dominio SH3-Spc, complejoado con el ligando p41, *razón molar* 1.00, en tampón 20mM glicina deuterada (d₅-gly), en H₂O : D₂O / 9 : 1 (v/v), a pH 3.0 y 25°C.

Aminoácido	δ _{N-H}	δ _{C_α-H}
D2	8.893	4.749
E3	8.633	4.467
T4	8.236	4.302
G5	8.447	3.969
K6	8.032	4.390
E7	8.673	4.528
L8	8.356	5.415
V9	9.180	5.231
L10	9.019	5.124
A11	9.094	4.605
L12	9.247	3.849
Y13	7.104	4.721
D14	8.483	4.660
Y15	8.643	4.729
Q16	7.580	4.573
E17	8.094	4.151
K18	8.586	4.438
S19	7.772	4.904
P20	–	4.535
A21	7.628	4.551
E22	7.875	5.477
V23	7.473	4.580
T24	7.580	5.038
M25	9.545	4.908
K26	8.283	4.911
K27	8.871	3.319
G28	8.893	3.540
D29	8.439	4.573
I30	8.215	4.996
L31	9.359	5.020
T32	8.424	4.624

Aminoácido	δ _{N-H}	δ _{C_α-H}
L33	9.026	4.403
L34	9.071	4.532
N35	7.591	4.732
S36	9.163	3.997
T37	8.209	4.007
N38	8.723	4.848
K39	8.516	4.267
D40	8.419	4.570
W41	8.272	5.189
W42	9.526	5.575
K43	8.888	4.303
V44	9.381	5.395
E45	8.636	5.431
V46	8.920	4.505
N47	9.460	4.343
D48	8.727	4.516
R49	8.191	4.696
Q50	8.553	5.543
G51	8.628	4.525
F52	9.362	5.576
V53	9.078	4.796
P54	–	3.612
A55	7.686	2.723
A56	8.135	4.104
Y57	7.890	4.773
V58	7.473	5.547
K59	8.658	4.858
K60	9.251	4.487
L61	8.510	4.463
D62	8.078	5.438

Tabla III.6.

Desplazamientos químicos de los hidrógenos N-H y C α -H en los espectros de RMN del mutante R21A del dominio SH3-Spc, complejado con el ligando p41, *razón molar* 1.56, en tampón 20mM glicina deuterada (d₅-gly), en H₂O : D₂O / 9 : 1 (v/v), a pH 3.0 y 25°C.

Aminoácido	$\delta_{\text{N-H}}$	$\delta_{\text{C}\alpha\text{-H}}$
D2	8.895	4.750
E3	8.631	4.465
T4	8.233	4.301
G5	8.440	3.969
K6	8.031	4.390
E7	8.674	4.529
L8	8.358	5.418
V9	9.182	5.231
L10	9.019	5.121
A11	9.096	4.596
L12	9.246	3.836
Y13	7.105	4.744
D14	9.498	4.661
Y15	8.633	4.722
Q16	7.564	4.579
E17	8.092	4.163
K18	8.608	4.441
S19	7.772	4.904
P20	–	4.535
A21	7.623	4.552
E22	7.891	5.482
V23	7.477	4.588
T24	7.578	5.039
M25	9.548	4.902
K26	8.265	4.926
K27	8.875	3.316
G28	8.899	3.545
D29	8.446	4.556
I30	8.219	4.992
L31	9.358	5.020
T32	8.422	4.636

Aminoácido	$\delta_{\text{N-H}}$	$\delta_{\text{C}\alpha\text{-H}}$
L33	9.024	4.400
L34	9.076	4.524
N35	7.581	4.735
S36	9.168	3.994
T37	8.210	4.007
N38	8.722	4.840
K39	8.517	4.270
D40	8.444	4.581
W41	8.307	5.208
W42	9.564	5.577
K43	8.879	4.252
V44	9.378	5.391
E45	8.627	5.423
V46	8.924	4.503
N47	9.459	4.338
D48	8.726	4.519
R49	8.193	4.701
Q50	8.557	5.536
G51	8.625	4.521
F52	9.383	5.565
V53	9.071	4.796
P54	–	3.612
A55	7.726	2.730
A56	8.192	4.119
Y57	7.918	4.771
V58	7.476	5.553
K59	8.667	4.853
K60	9.247	4.487
L61	8.511	4.457
D62	8.083	4.541

Tabla III.7.

Desplazamientos químicos de los hidrógenos N-H y C α -H en los espectros de RMN del mutante R21A del dominio SH3-Spc, complejado con el ligando p41, *razón molar* 2.58, en tampón 20mM glicina deuterada (d₅-gly), en H₂O : D₂O / 9 : 1 (v/v), a pH 3.0 y 25°C.

Aminoácido	$\delta_{\text{N-H}}$	$\delta_{\text{C}\alpha\text{-H}}$
D2	8.895	4.747
E3	8.630	4.464
T4	8.233	4.302
G5	8.437	3.969
K6	8.032	4.390
E7	8.675	4.533
L8	8.358	5.421
V9	9.183	5.233
L10	9.019	5.122
A11	9.095	4.597
L12	9.244	3.834
Y13	7.105	4.750
D14	8.504	4.662
Y15	8.630	4.725
Q16	7.557	4.583
E17	8.092	4.167
K18	8.616	4.442
S19	7.772	4.907
P20	–	4.535
A21	7.617	4.557
E22	7.898	5.482
V23	7.484	4.592
T24	7.579	5.043
M25	9.550	4.910
K26	8.250	4.928
K27	8.877	3.321
G28	8.901	3.544
D29	8.445	4.557
I30	8.220	4.996
L31	9.357	5.020
T32	8.415	4.619

Aminoácido	$\delta_{\text{N-H}}$	$\delta_{\text{C}\alpha\text{-H}}$
L33	9.025	4.400
L34	9.074	4.529
N35	7.575	4.732
S36	9.170	3.997
T37	8.206	4.012
N38	8.721	4.839
K39	8.519	4.270
D40	8.454	4.583
W41	8.316	5.212
W42	9.577	5.577
K43	8.873	4.247
V44	9.379	5.394
E45	8.624	5.423
V46	8.922	4.506
N47	9.458	4.340
D48	8.724	4.521
R49	8.193	4.699
Q50	8.557	5.536
G51	8.627	4.527
F52	9.391	5.557
V53	9.072	4.803
P54	–	3.612
A55	7.740	2.734
A56	8.213	4.126
Y57	7.927	4.777
V58	7.491	5.598
K59	8.667	4.855
K60	9.248	4.490
L61	8.512	4.463
D62	8.048	4.543

Apéndice IV.

Valores de las constantes intrínsecas, k_{int} , y observadas experimentalmente, k_{obs} , de intercambio así como el factor de protección, FP, de los hidrógenos amida de cada uno de los restos aminoacídicos del mutante R21A del dominio SH3-Spc estudiado por IHD. Las condiciones experimentales son: tampón 20mM glicina deuterada (d_5 -gly) en 99.8% D_2O , pH^* 3.01 y 27.10°C de temperatura. La concentración de proteína en el experimento estuvo en torno a 4.5mM. La concentración total de ligando p41 durante el experimento fue de 7.36mM; esto nos da una *razón molar* de 1.62 y supone una saturación superior al 85% aproximadamente.

Los valores de pH^* en cada experimento son las medidas directas del pHmetro, sin corregir por el efecto isotópico (ver apartado 4.6.1.2 de la sección Materiales y Métodos). En las tablas siguientes, tanto k_{int} como k_{obs} vienen expresadas en s^{-1} . En la tabla aparecen residuos para los que no se indican valores de k_{obs} como resultado de fenómenos de solapamiento de sus señales correspondientes, ya sea con la señal de otro residuo del dominio o con la señal residual del agua o bien porque su intercambio con el disolvente tiene lugar demasiado rápidamente, lo que no ha permitido seguir su cinética de IHD.

Se ha procurado que tanto las constantes de intercambio observadas, k_{obs} , como los factores de protección determinados a partir de ellas, FP, tuviesen el mismo número de cifras decimales, de manera que se ha tomado como criterio que el número de cifras decimales de ambos coincida con la primera cifra del error de la k_{obs} en cada caso. Este criterio no se ha seguido en el caso de las constantes intrínsecas, k_{int} , dado que se han determinado a partir de datos tabulados, referidos a compuestos peptídicos modelo ({Bai, 1993 #165}). En este caso se han considerado dos decimales como suficientes, salvo en el caso del resto D2.

Tabla IV.1.

Datos de IHD para el mutante R21A del dominio SH3-Spc, complejo con el ligando peptídico p41, en condiciones de alta saturación. El experimento de intercambio se realizó en medio tampón 20mM glicina deuterada, 100% D₂O, pH* 3.0 y 27.10°C de temperatura.

Residuo	$10^4 \cdot k_{int}$	$10^4 \cdot k_{obs}$	<i>FP</i>
D2	3490	–	–
E3	89.50	–	–
T4	38.60	–	–
G5	59.90	–	–
K6	29.10	–	–
E7	41.00	–	–
L8	12.50	0.87	14.34
V9	3.08	0.0074	417.5517
L10	4.43	0.006	768.783
A11	15.80	0.016	984.382
L12	6.50	0.005	1242.202
Y13	7.95	0.0070	1143.593
D14	73.40	0.8	85.9
Y15	32.80	0.016	2032.954
Q16	26.40	0.74	35.89
E17	49.20	–	–
K18	41.60	–	–
S19	62.60	4.9	12.8
P20	0	–	–
A21	14.50	–	–
E22	31.80	1.13	28.20
V23	9.44	0.167	56.428
T24	12.70	0.74	17.22
M25	31.30	0.054	573.269
K26	24.10	0.42	57.00
K27	24.70	–	–
G28	50.50	0.30	168.37
D29	98.20	–	–
I30	11.30	0.28	40.03
L31	3.41	0.0055	620.9439
T32	11.00	0.021	520.905
L33	8.75	0.012	734.227
L34	4.16	0.010	423.246
N35	39.00	0.10	404.35
S36	99.10	–	–
T37	34.20	1.6	22.1
N38	98.30	0.92	107.17
K39	39.00	–	–
D40	86.30	–	–
W41	24.30	0.045	542.329
W42	6.70	0.004	1527.399
K43	14.60	0.008	1873.059
V44	5.69	0.0049	1149.1402
E45	22.80	0.017	1338.611
V46	9.44	0.0132	713.3025
N47	45.30	–	–
D48	136.70	–	–
R49	70.50	0.342	206.064
Q50	38.80	0.61	64.16
G51	60.50	0.036	1670.478
F52	19.30	0.052	369.014
V53	4.89	0.006	867.039
P54	0	–	–
A55	14.50	0.021	678.978
A56	24.60	0.63	38.99
Y57	12.50	0.008	1612.006
V58	4.83	0.003	1453.701
K59	13.80	0.012	1115.182
K60	24.70	1.9	13.0
L61	7.57	0.88	8.55
D62	8.93	–	–

Apéndice V.

En este apéndice se detalla el modelo de análisis propuesto para el doble equilibrio unión-disociación / plegamiento-desplegamiento que se establece cuando se realiza el experimento de titulación del mutante R21A SH3-Spc con el decapeptido p41 y se sigue el mismo por *Calorimetría Diferencial de Barrido*. Este modelo se basa en otros propuestos previamente por diversos autores y que se pueden encontrar en la literatura (Freire, 2000),(Luque et al., 2002) y que establecen una interconexión entre la estabilidad de las proteínas y la unión de las mismas a sus ligandos.

El modelo propuesto el caso que nos ocupa, esto es, en la unión R21A-p41, podría resumirse en la figura siguiente, fig. V.i.:

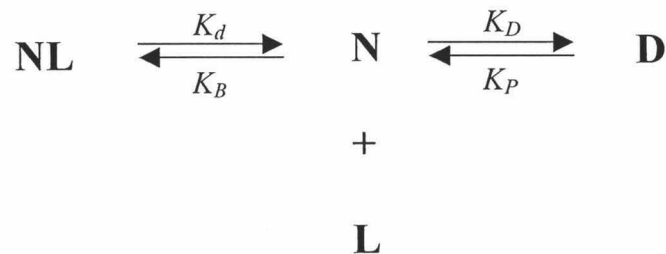


Fig. V.i.: Modelo de acoplamiento propuesto entre los dos procesos concomitantes que tienen lugar cuando se sigue la titulación del mutante R21A y el p41 por CDB. En el diagrama, N representa a la proteína nativa y D al estado desplegado de la misma, L es el ligando y NL el complejo formado por la proteína nativa y el ligando.

donde K_d representa a la constante de equilibrio del proceso de disociación del complejo proteína nativa-ligando (NL) y K_D representa a la constante de equilibrio del proceso de desplegamiento o desnaturalización de la misma. Junto a ellas, se disponen también las constantes de equilibrio que gobiernan los procesos inversos, esto es, asociación o unión, K_B , y plegamiento o renaturalización, K_P . Dichas constantes de equilibrio, se pueden definir de acuerdo con las ecuaciones siguiente, eqs. V.i. y V.ii., respectivamente:

$$K_B = \frac{[NL]}{[N][L]} \quad (\text{V.i.}) \qquad K_D = \frac{[D]}{[N]} \quad (\text{V.ii.})$$

Según la formulación termodinámico-estadística, se puede definir la *función de partición* que describe el proceso global como aparece en la ecuación siguiente, eq. V.iii.

$$Q = \frac{[N] + [D] + [NL]}{[N]} = 1 + K_D + K_B [L] \quad (\text{V.iii.})$$

y, a partir de ella se pueden establecer las *fracciones molares* de cada una de las especies presentes en el equilibrio, indicadas en las ecuaciones V.iv., V.v. y V.vi. Así:

$$x_N = \frac{1}{Q} \quad (\text{V.iv.}) \qquad x_D = \frac{K_D}{Q} \quad (\text{V.v.}) \qquad x_{NL} = \frac{K_B [L]}{Q} \quad (\text{V.vi.})$$

A partir de estas magnitudes, se puede definir la concentración total de ligando en la muestra, L_0 , según la ecuación siguiente, eq. V.vii.:

$$L_0 = [L] + [NL] = [L] \left(1 + \frac{K_B C_0}{Q} \right) \quad (\text{V.vii.})$$

donde C_0 es la concentración total de proteína presente en la muestra.

Si en la ecuación anterior, eq. V.vii., sustituimos la función de partición Q por su expresión y despejamos la concentración de ligando libre, $[L]$, en la muestra, tenemos la ecuación siguiente, eq. V.viii:

$$[L] = \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A} \quad (\text{V.viii})$$

donde: $A = K_B$ $B = K_B (C_0 - L_0) + K_D + 1$ y $C = -L_0 (1 + K_D)$.

Si ahora derivamos con respecto a la temperatura, T , cada uno de los términos anteriores: A , B y C , nos quedan las expresiones siguientes, eqs. V.ix., V.x., V.xi, respectivamente:

$$\frac{dA}{dT} = \frac{dK_B}{dT} = K_B \frac{\Delta H_B}{RT^2} \quad (\text{V.ix.})$$

$$\frac{dB}{dT} = \frac{dK_B}{dT}(C_0 - L_0) + \frac{dK_D}{dT} = K_B \frac{\Delta H_B}{RT^2}(C_0 - L_0) + K_D \frac{\Delta H_D}{RT^2} \quad (\text{V.x.})$$

$$\frac{dC}{dT} = -L_0 \frac{dK_D}{dT} = -L_0 K_D \frac{\Delta H_D}{RT^2} \quad (\text{V.xi.})$$

derivadas éstas que precisaremos más adelante. Por otro lado, también se precisa de la derivada de la concentración de ligando libre, $[L]$, con respecto a la temperatura, T, que vendrá dada por la expresión siguiente, eq. V.xii.:

$$\frac{d[L]}{dT} = \frac{\left[-\frac{dB}{dT} + (B^2 - 4AC)^{-\frac{1}{2}} \left(B \frac{dB}{dT} - 2C \frac{dA}{dT} - 2A \frac{dC}{dT} \right) \right]}{2A} - \frac{2 \frac{dA}{dT} \left[-B + (B^2 - 4AC)^{\frac{1}{2}} \right]}{4A^2} \quad (\text{V.xii.})$$

Podemos definir ahora la entalpía asociada al proceso global como una combinación lineal de las entalpías correspondientes a cada una de las especies presentes en la muestra y sus concentraciones, así, aparece en la ecuación siguiente, eq. V.xiii.:

$$\langle H \rangle = H_N [N] + H_{NL} [NL] + H_D [D] + H_L [L] \quad (\text{V.xiii.})$$

Consideraremos como estado de referencia al estado nativo libre de la proteína, N, y al ligando libre, L. En este caso, se define la entalpía correspondiente al mismo, como sigue, eq. V.xiv.:

$$\langle H \rangle_{ref} = H_N C_0 + H_L L_0 \quad (\text{V.xiv.})$$

Y así, definimos finalmente la entalpía de exceso entre el estado de referencia y el estado D + L final, según la ecuación siguiente, eq. X.xv.:

$$\begin{aligned} \langle \Delta H \rangle &= H_N ([N] - C_0) + H_D [D] + H_{NL} [NL] + H_L ([L] - L_0) \\ &= (H_D - H_N) [D] + (H_{NL} - H_N - H_L) [NL] = \Delta H_D [D] + \Delta H_B [NL] \end{aligned} \quad (\text{V.xv.})$$

que, dividiendo ahora por la concentración total de proteína en la muestra, C_0 , queda como sigue, eq. V.xvi.:

$$\langle \Delta H \rangle = \Delta H_D x_D + \Delta H_B x_{NL} \quad (\text{V. xvi.})$$

que vendrá expresada en $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ de proteína.

Definimos ahora la capacidad calorífica de exceso como la derivada de la entalpía de exceso con la temperatura, T , de manera que queda la ecuación siguiente, eq. V.xvii.:

$$\Delta C_p = \frac{d\langle H \rangle}{dT} = \Delta C_{pD} x_D + \Delta H_D \frac{dx_D}{dT} + \Delta C_{pB} x_{NL} + \Delta H_B \frac{dx_{NL}}{dT} \quad (\text{V.xvii.})$$

de la ecuación anterior, es preciso determinar las derivadas de las fracciones molares de cada una de las especies, D y NL , con respecto a la temperatura, T . Para determinarlas, emplearemos la definición de las fracciones molares de dichas especies en las ecuaciones V.v. y V.vi. respectivamente, con lo que queda finalmente las ecuaciones siguiente, eqs. V.xviii. y V.xix.:

$$\frac{dx_D}{dT} = \frac{1}{Q} \frac{dK_D}{dT} - \frac{dQ}{dT} \frac{K_D}{Q^2} = \frac{K_D}{Q} \frac{\Delta H_D}{RT^2} - \frac{dQ}{dT} \frac{K_D}{Q^2} \quad (\text{V.xviii.})$$

$$\begin{aligned} \frac{dx_{NL}}{dT} &= \frac{1}{Q} \left(\frac{dK_B}{dT} [L] + K_B \frac{d[L]}{dT} \right) - \frac{K_B [L]}{Q^2} \frac{dQ}{dT} = \\ &= \frac{1}{Q} \left(K_B \frac{\Delta H_B}{RT^2} [L] + K_B \frac{d[L]}{dT} \right) - \frac{K_B [L]}{Q^2} \frac{dQ}{dT} \end{aligned} \quad (\text{V.xix.})$$

En las ecuaciones anteriores, eqs. V.xviii. y V.xix., aparece la derivada de la función de partición con respecto a la temperatura, que a su vez podemos definir a partir de su definición en la ecuación V.iii., con lo que queda finalmente la ecuación V.xx.:

$$\frac{dQ}{dT} = K_D \frac{\Delta H_D}{RT^2} + K_B [L] \frac{\Delta H_B}{RT^2} + K_B \frac{d[L]}{dT} \quad (\text{V.xx.})$$

En este punto, podremos definir ya las funciones de capacidad calorífica para cada una de las especies presentes en la muestra y que emplearemos para describir las trazas calorimétricas resultantes del experimento de titulación. Así, se definen las funciones de capacidad calorífica para las especies N, NL, D y L, por las ecuaciones eqs. V.xxi., V.xxii., V.xxiii. y V.xxiv., respectivamente:

$$C_p(N) = n_0 + n_1 \cdot T \quad (\text{V.xxi.})$$

$$C_p(NL) = nl_0 + nl_1 \cdot T \quad (\text{V.xxii.})$$

$$C_p(D) = d_0 + d_1 \cdot T + d_2 \cdot T^2 \quad (\text{V.xxiii.})$$

$$C_p(L) = l_0 + l_1 \cdot T + l_2 \cdot T^2 + l_3 \cdot T^3 + l_4 \cdot T^4 \quad (\text{V.xxiv.})$$

de tal manera que la función, $C_p(N)$ es lineal y se mide experimentalmente, la función $C_p(NL)$ también es lineal pero se determina de forma teórica, la función $C_p(D)$ es cuadrática y ajustable y, finalmente, la función $C_p(L)$ resulta ser cúbica y también se mide experimentalmente.

De acuerdo con las definiciones anteriores, podemos ahora definir el cambio de capacidad calorífica del sistema debido al proceso de desplegamiento, ΔC_{pD} , o al de unión al ligando, ΔC_{pB} , como se detalla en las ecuaciones siguientes, eqs. V.xxv. y V.xxvi., respectivamente:

$$\Delta C_{pD} = (d_0 - n_0) + (d_1 - n_1) \cdot T + d_2 \cdot T^2 \quad (\text{V.xxv.})$$

$$\Delta C_{pB} = (nl_0 - n_0 - l_0) + (nl_1 - n_1 - l_1) \cdot T - l_2 \cdot T^2 - l_3 \cdot T^3 - l_4 \cdot T^4 \quad (\text{V.xxvi.})$$

Teniendo en cuenta las relaciones termodinámicas generales siguientes:

$$\frac{\partial \Delta H_D}{\partial T} = \Delta C_p \quad , \quad \frac{\partial \Delta S_D}{\partial T} = \frac{\Delta C_p}{T} \quad \text{y} \quad \Delta G_D = \Delta H_D - T \cdot \Delta S_D$$

es integrando con respecto a la temperatura, T, las ecuaciones del ΔC_{pD} , eq. V.xxv. y del ΔC_{pB} , eq. V.xxvi, podremos determinar el incremento de entalpía del sistema debido al proceso de desplegamiento, ΔH_D , y de unión al ligando, ΔH_B , tal y como aparece detallado en las ecuaciones siguientes, eqs. V.xxvii. y V.xxviii:

$$\Delta H_D = \Delta H_D(T_D) + (d0 - n0) \cdot (T - T_D) + \frac{(d1 - n1)}{2} \cdot (T^2 - T_D^2) + \frac{d2}{3} (T^3 - T_D^3) \quad (\text{V.xxvii})$$

$$\Delta H_B = \Delta H_B(T_0) + (nl0 - n0 - l0) \cdot (T - T_0) + (nl1 - n1 - l1) \cdot \frac{(T^2 - T_0^2)}{2} - \frac{l2}{3} (T^3 - T_0^3) - \frac{l3}{4} (T^4 - T_0^4) - \frac{l4}{5} (T^5 - T_0^5) \quad (\text{V.xxviii})$$

De forma similar, podemos determinar el cambio de entropía de desnaturalización, ΔS_D , que se detalla en la ecuación siguiente, eq. V.xxix:

$$\Delta S_D = \frac{\Delta H_D(T_D)}{T_D} + (d0 - n0) \ln \frac{T}{T_D} + (d1 - n1) \cdot (T - T_D) + \frac{d2}{2} (T^2 - T_D^2) \quad (\text{V.xxix.})$$

Y finalmente podremos definir el cambio de energía libre de Gibbs de desplegamiento, ΔG_D , y la constante del equilibrio de desnaturalización, K_D , eqs. V.xxx. y V.xxxi.:

$$\Delta G_D = \Delta H_D - T \cdot \Delta S_D \quad (\text{V.xxx.}) \quad K_D = e^{-\frac{\Delta G_D}{RT}} \quad (\text{V.xxxi.})$$

En cuanto a la constante que rige el equilibrio de interacción entre la proteína y el ligando, el tratamiento es algo más complejo. La dependencia de la constante de

equilibrio de unión con el cambio de energía libre de dicho equilibrio, es análogo a la ecuación V.xxxi., de manera que si sustituimos el valor de ΔG_B por su dependencia con los valores de ΔH_B y ΔS_B (conocida la relación termodinámica entre ambas) y cada una de ellas por sus funciones correspondientes e integramos con la temperatura, tendremos finalmente la ecuación siguiente, eq. V.xxxii. Se parte de la premisa de que a una temperatura $T = T_0$, tendremos que $K_B = K_B(T_0)$ ya que como cualquier constante de equilibrio, K_B depende de la temperatura:

$$\ln K_B = \ln K_B(T_0) - \frac{\Delta H_B(T_0) - (nl_0 - n_0 - l_0) \cdot T_0 - \frac{(nl_1 - n_1 - l_1) \cdot T_0^2}{2} + \frac{l_2 \cdot T_0^3}{3} + \frac{l_3 \cdot T_0^4}{4} + \frac{l_4 \cdot T_0^5}{5}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) + \frac{(nl_0 - n_0 - l_0)}{R} \ln \frac{T}{T_0} + \frac{(nl_1 - n_1 - l_1)}{2R} (T - T_0) - \frac{l_2}{6R} (T^2 - T_0^2) - \frac{l_3}{12R} (T^3 - T_0^3) - \frac{l_4}{20R} (T^4 - T_0^4) \quad (\text{V.xxxii})$$

Y finalmente, las funciones de capacidad calorífica, que es lo que realmente medimos en el experimento de calorimetría, tanto la capacidad calorífica molar parcial, C_p como la diferencial aparente, $\Delta C_{p,ap}$, vendrán determinadas por las ecuaciones siguientes, eqs. V.xxxiii y V.xxxiv respectivamente:

$$C_p = C_p(N) + C_p(L) \frac{L_0}{C_0} + \Delta C_p \quad (\text{V.xxxiii.})$$

$$\Delta C_{p,ap} = C_p - \frac{v_M}{v_{H_2O}} C_p(H_2O) - \frac{v_L}{v_{H_2O}} C_p(H_2O) \frac{L_0}{C_0} = C_p(N) - \frac{v_M}{v_{H_2O}} C_p(H_2O) + \left(C_p(L) - \frac{v_L}{v_{H_2O}} C_p(H_2O) \right) \frac{L_0}{C_0} + \Delta C_p \quad (\text{V.xxxiv.})$$

en las que se indica el volumen de agua excluido por la macromolécula, v_M , y el ligando, v_L , que, a efectos prácticos, se han considerado iguales entre sí (a 0.73ml/g). La ecuación V.xxxiii., al sustituir los valores de C_p de la proteína nativa libre, N, y del ligando libre, L y el cambio en capacidad calorífica por sus valores correspondientes,

eqs. V.xxi., V.xxii., V.xxiii y V.xxiv., describe perfectamente las curvas experimentales del experimento calorimétrico.

Apéndice VI.

En este apéndice se describe el modelo empleado para describir el equilibrio de asociación-disociación que tiene lugar entre el mutante R21A SH3-Spc y el decapeptido p41, cuando el experimento de titulación se sigue por *espectrofluorimetría*. Se trata de un modelo clásico para una interacción de estequiometría 1:1, como es el caso que nos ocupa.

El equilibrio que se establece entre la proteína y el ligando se describe en la figura siguiente, fig. VI.i.:

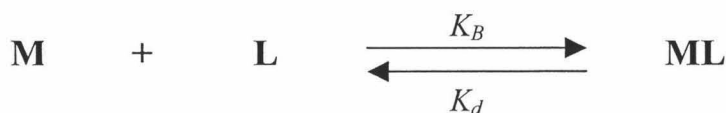


Fig. VI.i.: Modelo sencillo del proceso de interacción monomolecular que se establece entre el mutante R21A y el ligando peptídico p41 y que se emplea para desarrollar las ecuaciones que permiten analizar los datos espectrofluorimétricos que resultan del experimento de titulación.

Según ese modelo, podemos definir una serie de parámetros que serán necesarios para el desarrollo de las ecuaciones que nos permitirán abordar el análisis de los datos experimentales del experimento de titulación seguido por espectrofluorimetría. Así, definimos la constante que rige el equilibrio de disociación del complejo R21A-p41 (ML), K_d , en lugar de la de unión, K_B , ya que es más común en este tipo de experimentos hablar de disociación que de unión. Dicha constante K_d se define en la ecuación VI.i. Se definen también las concentraciones totales de ligando, L_t , de proteína, M_t y la fracción de saturación, θ , en las ecuaciones siguientes, VI.ii., VI.iii y VI.iv., respectivamente:

$$K_d = \frac{M \cdot L}{ML} \quad (\text{VI.i.}) \quad L_t = L + ML \quad (\text{VI.ii.}) \quad M_t = M + ML \quad (\text{VI.iii.})$$

$$\theta = \frac{ML}{M + ML} \quad (\text{VI.iv.})$$

donde M y L son las concentraciones de proteína y ligando libres en la muestra, respectivamente y ML es la concentración de complejo proteína-ligando. Operando y reordenando las ecuaciones anteriores, eqs. VI.i., VI.ii., VI.iii. y VI.iv., podremos llegar a una expresión para θ , que es el parámetro que interesa, en función de la K_d y las concentraciones totales de las especies libres, eq. VI.ix. Así:

$$ML = \theta \cdot M_t \quad (\text{VI. v.})$$

$$K_d = \frac{(M_t - ML) \cdot (L_t - ML)}{ML} = \frac{(M_t - \theta \cdot M_t) \cdot (L_t - \theta \cdot M_t)}{\theta \cdot M_t} \quad (\text{VI.vi.})$$

operando y simplificando queda la expresión siguiente, que resulta ser una ecuación de segundo grado en θ , eq. VI.vii., de la que se puede despejar la fracción de saturación, θ , eq. VI.viii., como se ha indicado en el párrafo anterior:

$$K_d \cdot \theta = (1 - \theta) \cdot (L_t - \theta \cdot M_t) = L_t - \theta \cdot M_t - \theta \cdot L_t + \theta^2 \cdot M_t \quad (\text{VI.vii.})$$

reordenando queda:

$$\theta^2 \cdot M_t - (M_t + L_t + K_d) \cdot \theta + L_t = 0 \quad (\text{VI.viii.})$$

y así queda finalmente la ecuación siguiente, VI.ix.:

$$\theta = \frac{(K_d + M_t + L_t) \pm \sqrt{(K_d + M_t + L_t)^2 - 4 \cdot M_t \cdot L_t}}{2 \cdot M_t} \quad (\text{VI.ix.})$$

De esta manera, si consideramos que las únicas especies que son fluorimétricamente activas son la proteína y con ella, lógicamente, el complejo proteína-ligando, se puede definir la ecuación que establece la relación entre la intensidad relativa de fluorescencia medida, F , y la fracción de saturación de la proteína, θ , en cada punto de la titulación.

Así se expresa en la ecuación siguiente, eq. VI.x., como combinación lineal de la fluorescencia de cada una de las especies consideradas "activas" y la concentración

de las mismas en la muestra, M , para la proteína libre y ML , para el complejo proteína-ligando:

$$F_i = F_0 \cdot M + F_{ML} \cdot ML \quad (\text{VI.x.})$$

como no es posible conocer *a priori* las concentraciones de las especies M y ML , será preciso expresarlas en función de la concentración total de proteína en la muestra, M_t , y la fracción de saturación de la misma, θ , así, para cada punto de la titulación, se cumple que:

$$F_i = F_M \cdot M_t \cdot (1 - \theta_i) + F_{ML} \cdot \theta_i \cdot M_t \quad (\text{VI.xi.})$$

y reordenando la ecuación anterior, eq. VI.ix., nos queda finalmente la ecuación siguiente, eq. VI.xii.:

$$F_i = F_M \cdot M_t + (F_{ML} - F_M) \cdot M_t \cdot \theta_i \quad (\text{VI.xii.})$$

y si normalizamos por la concentración de proteína total en la muestra, M_t , cada medida de fluorescencia, nos queda la ecuación final, eq. VI.xiii.:

$$F_{i,n} = \frac{F_i}{M_t} = F_M + (F_{ML} - F_M) \cdot \theta_i = F_M + \Delta F \cdot \theta_i \quad (\text{VI.xiii.})$$

donde $F_{i,n}$ se refiere a la intensidad de fluorescencia normalizada por la concentración total de proteína en cada punto de la titulación.

Este proceso de *n m l z c ó n* es especialmente necesario cuando se realizan los experimentos de titulación adicionando volúmenes crecientes de disolución stock de ligando sobre un cierto volumen constante de una disolución madre de proteína de concentración conocida, tal y como se indica en el apartado 5.2.2. de la sección de Resultados y Discusión, ya que a medida que se avanza, y opuestamente a la concentración total de ligando en la muestra va aumentando, la de proteína va disminuyendo, es decir, tiene lugar un fenómeno de dilución que va reduciendo

paulatinamente la señal de emisión de fluorescencia observada. En el caso de que la metodología sea diferente, esto es, que se realice la titulación con disoluciones diferentes en las que la concentración de proteína se mantenga constante a un valor dado, no es necesario este procedimiento de *n m l z c ó n*, ya que el incremento en la señal de fluorescencia medida es directamente proporcional a la saturación de la proteína que se alcanza en cada punto.

Finalmente es preciso indicar también que en muchos de los casos ha sido preciso introducir un factor adicional en las ecuaciones VI.x. y VI.xii. y VI.xiii., que da cuenta de la fluorescencia “residual” del ligando libre en disolución, F_L , tal y como se indica también en el mismo apartado 5.2.2. de la sección de Resultados y Discusión. De esta manera, dichas ecuaciones quedan como sigue, eqs. Vi.xiv., VI.xv. y VI.xvi.:

$$F_i = F_0 \cdot M + F_{ML} \cdot ML + F_L \cdot L \quad (\text{VI.xiv.})$$

$$F_i = F_M \cdot M_i + (F_{ML} - F_M) \cdot M_i \cdot \theta_i + F_L \cdot L \quad (\text{VI.xv.})$$

$$F_{i,n} = \frac{F_i}{M_i} = F_M + (F_{ML} - F_M) \cdot \theta_i + F_L \cdot L = F_M + \Delta F \cdot \theta_i + F_L \cdot \frac{L}{M_i} \quad (\text{VI.xvi.})$$

Ese factor, F_L , referido al ligando no es simplemente la fluorescencia medida de una disolución de ligando libre, sino que es preciso normalizarla también por la concentración total del mismo en la disolución en la que se mide y por tanto, será un parámetro fijo en el ajuste de los datos experimentales a las ecuaciones del modelo propuesto.