

1. Introducción

1.1. Estabilidad termodinámica de las proteínas

Las proteínas son las encargadas de llevar a cabo una gran diversidad de funciones en los seres vivos, pero solamente serán capaces de realizarlas si adoptan la conformación adecuada. Conocer como es su estabilidad y como poder aumentarla, tiene gran interés desde varios puntos de vista (Ayuso, S. 2012).

- Biológico (conocimiento de la Biología molecular).
- Industrial (es común la utilización de enzimas que no trabajan en condiciones fisiológicas)
- Biomédico (numerosas enfermedades están causadas por proteínas mal plegadas).

La estabilidad conformacional de una proteína, se define como el cambio de energía libre de la reacción (ΔG), Figura 1:



Figura 1: Variación de Energía entre: Estado Nativo (plegado) y Desnaturalizado (desplegado)

Para muchas proteínas, esta reacción de plegamiento es reversible y, además, sólo comprende los dos estados anteriormente vistos en la figura 1. En condiciones fisiológicas el plegamiento de las proteínas es termodinámicamente favorable, ΔG del plegamiento será negativa, ec.1.1.

$$\text{ec.1.1.} \quad \Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Durante las reacciones de plegamiento o de desplegamiento se forman o rompen, cientos de interacciones covalentes, puede esperarse que aparezcan conformaciones transitorias que posean algunas de las interacciones presentes en el estado de partida pero que no posean una energía tan elevada como la del estado desplegado. Estas serán llamadas intermediarios, son más estables respecto a las especies que inmediatamente preceden o a las siguientes en la reacción. (Bueno, 2006). Las principales interacciones que contribuyen a la estabilidad de una proteína son:

- Puente de Hidrógeno.
- Fuerzas de Van der Waals.
- Interacciones con residuos aromáticos.
- Interacciones electrostáticas.
- Puentes disulfuro.

1.2. Intermediarios de equilibrio

El plegamiento de las proteínas de mayor tamaño es más complejo y la aparición de barreras de energía en su paisaje energético determina la acumulación transitoria de intermediarios de plegamiento, que en algunos casos son productivos y en otros constituyen vías muertas de la reacción (Roder *et al.*, 2006).

Muchas proteínas presentan equilibrios de cierta complejidad, en los que podrían aparecer uno o más intermediarios. En el caso de la Flavodoxina de *Anabaena*, presenta un intermediario en desnaturalización térmica.

Como estos intermediarios suelen carecer de actividad biológica, puede considerarse la estructura del estado activo biológicamente (nativo), como la suma de dos contribuciones (Sancho et al., 2002):

Término relevante: el cual es el encargado de salvaguardar su actividad biológica, corresponderá a la diferencia de energía libre entre estado nativo y el intermediario.

Término residual: estabilidad del intermediario no funcional. Corresponde a la energía libre asociada al equilibrio entre el intermediario y el estado desplegado.

El efecto de una mutación estabilizante en un proceso de dos estados es obvio, la estabilización de la estructura plegada y activa con respecto de la población desplegada. En cambio, cuando se trata de proteínas con especies intermediarias, conlleva que una estabilización producida de manera global pueda distribuirse entre las distintas transiciones (N-I e I-D) (Sancho et al., 2002). En la práctica podemos seguir estos efectos causados por los cambios introducidos calculando la diferencia entre las estabilidades relevantes y residuales de la proteína de referencia menos el mutante ($\Delta\Delta G_{NI} = \Delta G_{NI(ref)} - \Delta G_{NI(mut)}$ y $\Delta\Delta G_{ID} = \Delta G_{ID(ref)} - \Delta G_{ID(mut)}$) (Campos *et al.*, 2004).

Mientras más se acerquen las temperaturas de ambas transiciones producto del aumento del ΔG_{NI} comparado con el ΔG_{ID} , más se desestabilizará el intermediario desapareciendo como especie en equilibrio.

De esta manera, una modificación dirigida hacia la transición nativo-intermediario, provocará una modificación en la estabilidad del estado nativo, llamada estabilidad relevante. Sin embargo, si la modificación esta dirigida hacia la transición intermediario-desplegado, producirá una modificación en la estabilidad referida al término residual.

1.3. Flavodoxina como modelo de estudio

Los estudios realizados se han basado en el uso de flavodoxina de *Anabaena* PCC7119, proteína cuya estabilidad y plegamiento se han analizado ampliamente en nuestro laboratorio, y servirán de base para los datos obtenidos y para conclusiones sacadas de ellos.

Las flavodoxinas son proteínas de pequeño tamaño 14-23 kDa, que actúan como transportadores de electrones. Contiene un cofactor FMN, está unido de manera no covalente, el cual es necesario para sus propiedades redox (Simondsen et al., 1980).

1.3.1 Función

Las flavodoxinas son proteínas tipo α/β que tienen como función el transporte de electrones y presentan como grupo redox una molécula de FMN unida no covalentemente (Simondsen et al., 1980). El papel fisiológico de la flavodoxina es el transporte de electrones entre el fotosistema I (PSI) y la enzima ferredoxina-NADP⁺ reductasa (FNR) durante la fotosíntesis (figura 2). En condiciones normales, este papel es llevado a cabo por la ferredoxina; sin embargo, en ciertas cianobacterias y algas eucariotas, bajo condiciones de carencia de Fe, la flavodoxina la reemplaza en su papel de transportador de electrones entre el PSI y la FNR (Fillat et al., 1988).

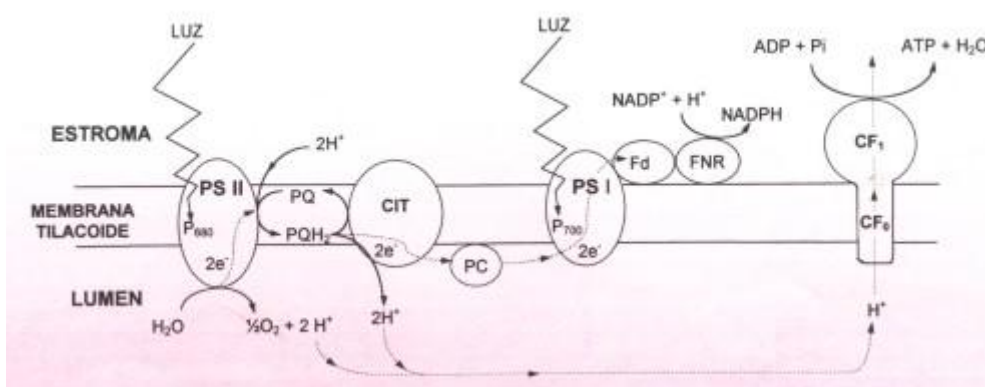


Figura 2: Esquema del transporte fotosintético de electrones y de su distribución en la membrana tilacoide. Los complejos descriptos son: PSII, Fotosistema II; CIT, Complejo de citocromos b₆/f; PSI, Fotosistema I; CF₀-CF₁, ATPsintetasa; PQ, Plastoquinona; PC, Plastocianina; F_D, Ferredoxina; FNR, Ferredoxina-NADP oxidoreductasa. Las flechas indican el sentido en que se producen el transporte de electrones y el bombeo de protones.

1.3.2. Estructura

La flavodoxina es una proteína tipo α/β (Figura 3) (Jon López-Llano et al., 2004a), está construida por una lámina β de 5 hebras paralelas, con 5 hélices α empaquetadas a ambos lados. Los residuos 4-9, 30-36, 48-45, 81-89 y 115-117/141-143 forman las cinco hebras. La quinta hebra, contiene un bucle entre los residuos 117 y 141 en el que se muestra una pequeña lámina de tres hebras entre los aminoácidos 120 y 138. Los residuos que forman las hélices son: 13-26, 40-46, 70-76, 100-110 y 149-168 (Bueno, 2006).

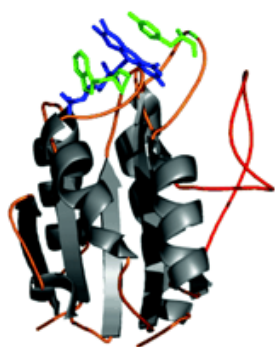


Figura 3: Holoflavodoxina de *Anabaena*, en la representación se puede ver: FMN (azul), los lazos que llevan los residuos Trp57 y Tyr94 (bucles de color naranja, residuos en verde) y el característico bucle largo de las flavodoxinas de cadena larga (en rojo).

El FMN (Figura 4), responsable de su función se encuentra fijado en el sitio activo. Esta región tienen una movilidad, la cual le da una plasticidad pudiendo permitir la entrada o salida del cofactor.

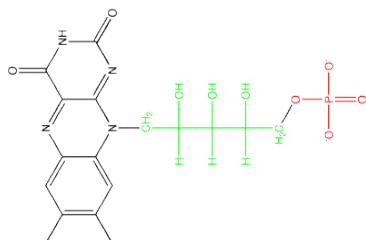


Figura 4: Cofactor de la holoflavodoxina, FMN. El cual está compuesto por un anillo de isoxacina (negro), cadena ribitilo (verde) y un grupo fosfato (rojo).

La proteína se pliega perfectamente en ausencia del cofactor (forma apo) con una estructura prácticamente idéntica a la proteína con el FMN unido (Genzor et al., 1996b). Las flavodoxinas pueden dividirse en dos grupos, las flavodoxinas de cadena larga tienen 20 aminoácidos adicionales y su estructura tridimensional muestra que este bucle interactúa estrechamente con el bucle en el que está la tirosina que se une al FMN. La función de este bucle no es clara, aunque muchas flavodoxinas lo presentan (López-Llano et al., 2004a; López-Llano et al., 2004b). La flavodoxina de *Anabaena* PCC7119 pertenece a la familia de las flavodoxinas de cadena larga.

1.3.3. Estabilidad

La desnaturalización térmica de la flavodoxina de *Anabaena* PCC7119 presenta un intermediario, se sigue por diferentes técnicas espectroscópicas obteniendo cuatro gráficas no superponibles, (dicroísmo circular en el lejano, cercano, absorbancia y fluorescencia). Sin embargo, la desnaturalización química no presenta intermediario, el proceso se seguirá por emisión de fluorescencia a distintas concentraciones de urea.

1.4. Diseño mutaciones

Se va utilizar un diseño racional de mutantes en la Apoflavodoxina de *Anabaena*, para conseguir un aumento racional de la proteína modelo. El objetivo de este estudio es profundizar en el conocimiento sobre la estabilidad de la apoflavodoxina de *Anabaena* PCC 7119. Se analizaran la WT y 7 mutantes en este trabajo, los cuales fueron diseñados basándose en estudios anteriores (Bueno, 2006).

La apoflavodoxina de *Anabaena* como se ha introducido anteriormente presenta un intermediario térmico (figura 5) (Ayuso-Tejedor et., al 2010). El intermediario térmico mantiene una parte común al estado nativo (color negro) y otra que se encuentra desnaturalizada (color rosa). Como se ha explicado anteriormente según donde vayan dirigidas las mutaciones, afectarán a la estabilidad relevante o residual de la proteína.

Mutaciones dirigidas a la zona común al estado nativo (color negro), provocarán modificaciones en la estabilidad residual; mientras que mutaciones dirigidas a la zona ya desnaturalizada en el intermediario térmico (color rosa), provocarán modificaciones en la estabilidad relevante.

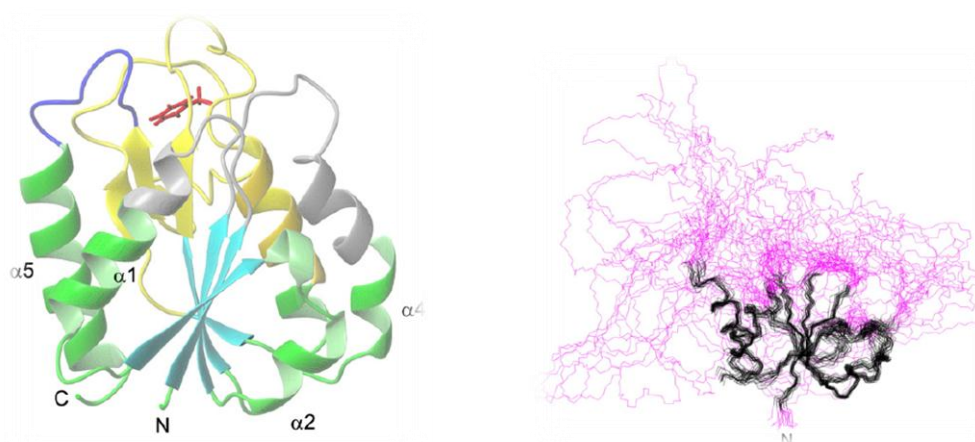


Figura 5: A la izquierda se ve la estructura de la apoflavodoxina de *Anabaena* en el estado nativo, obtenida por rayos X y depositada en el pdb con el código 1FTG.

La figura de la derecha corresponde al intermediario térmico obtenida por R.M.N y depositada en el pdb con el código 2KQU.

Se usaron dos proteínas de partidas, WT y una proteína mutante con 3 mutaciones (E20K/E72K/D126K/I92A), obtenida anteriormente en el departamento. Gracias a las estructuras resueltas, tanto de la apoflavodoxina (1FTG) como del intermediario térmico de esta (2KQU), se podrán ver de manera más clara el lugar de las mutaciones y si afectarán a la estabilidad relevante o residual. Para la realización de estas figuras se usó el programa PyMOL.

Mutantes basados en la apoflavodoxina de *Anabaena* WT:

1.4.1. I59A (figura6)

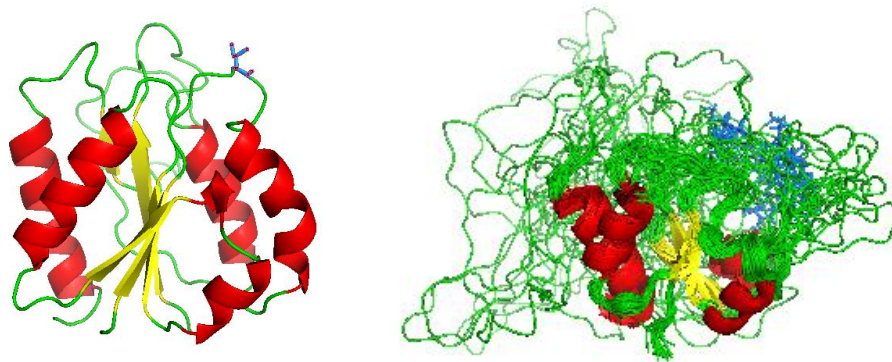


Figura 6: Representación sobre la WT. Sobre el estado nativo a la izquierda, y sobre el intermediario a la derecha, del mutante I59A. En azul la mutación introducida.

Se produce el cambio de Isoleucina por Alanina en el aminoácido 59. Cambio de un residuo apolar de cadena larga por uno apolar de cadena corta en la superficie de la proteína. La mutación se encuentra en la parte desestructura del intermediario, lo cual conllevará una variación en la estabilidad relevante.

1.4.2. D100N (figura 7)

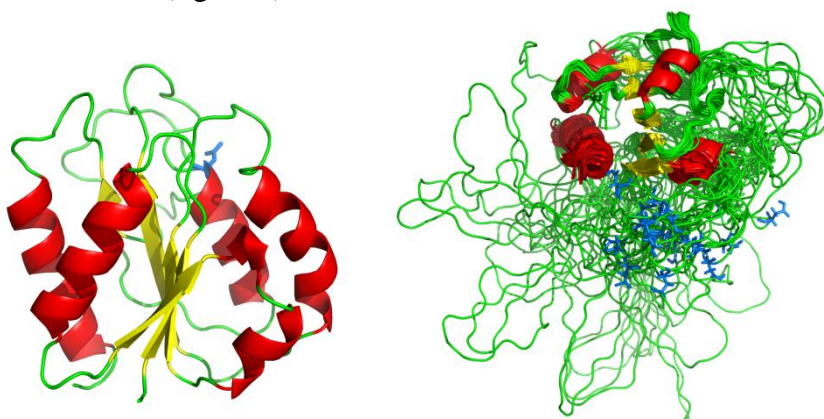


Figura 7: Representación sobre la WT. Sobre el estado nativo a la izquierda, y sobre el intermediario, a la derecha, del mutante D100N. En azul la mutación introducida.

Se produce el cambio de Aspártico por Asparragina en el aminoácido 100. Cambio de un residuo ácido por uno polar, con la consiguiente descarga de un puente de H. La mutación se encuentra en la parte desestructurada del intermediario, con lo cual conllevará una variación en la estabilidad relevante.

1.4.3. A142V (figura 8)

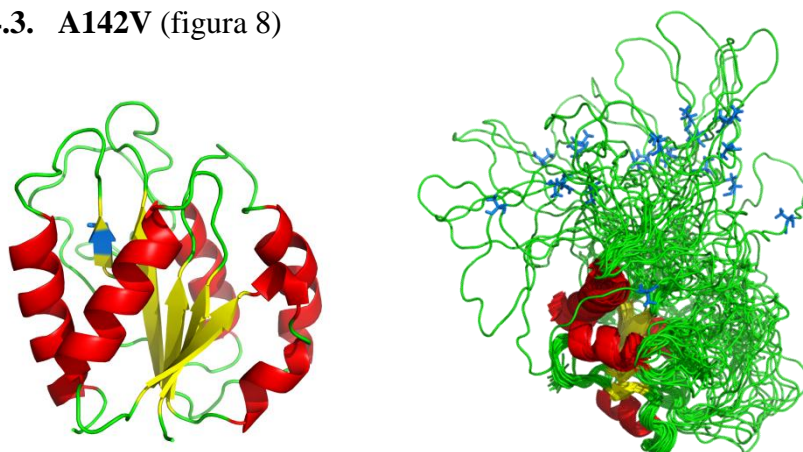


Figura 8: Representación sobre la WT. Sobre el estado nativo a la izquierda, y sobre el intermediario a la derecha, del mutante A142V. En azul la mutación introducida.

Se produce el cambio de Alanina por Valina en el aminoácido 142. Cambio de un residuo apolar de cadena corta por otro apolar pero de cadena más larga, corresponde al relleno de una cavidad. La mutación se encuentra en la parte desestructurada del intermediario, con lo cual conllevará una variación en la estabilidad relevante.

1.4.4. En el caso de la utilización del **3M** (E20K/E72K/D126K) (figura 9) como proteína de partida, las mutaciones a analizar serán:

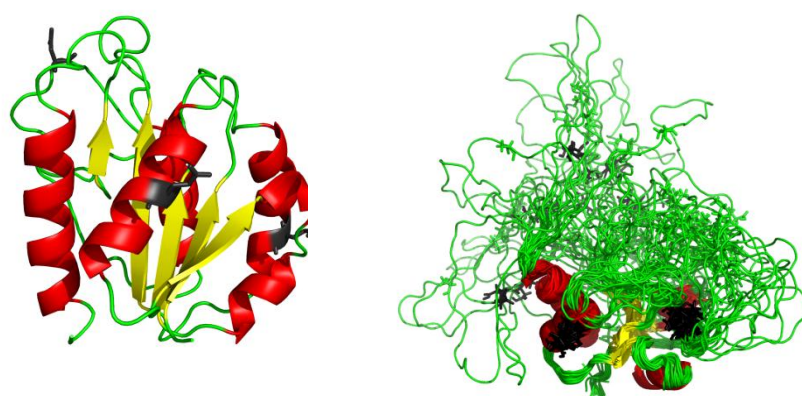


Figura 9: Representación sobre la WT. Sobre el estado nativo a la izquierda, y sobre el intermediario a la derecha, del mutante E20K/E72K/D126K. Marcado en negro las mutaciones introducidas.

Se producen 3 mutaciones

- E20K: Se produce el cambio de Ácido Glutámico por una Lisina en el aminoácido 20. Cambio de un residuo ácido por otro básico, produciendo un cambio de carga. La mutación se encuentra en la parte estructurada del intermediario, con lo cual conllevará una variación en la estabilidad residual.
- E72K: Se produce el cambio de Ácido Glutámico por una Lisina en el aminoácido 72. Cambio de un residuo ácido por otro básico, produciendo un cambio de carga. La mutación se encuentra en la parte desestructurada del intermediario, con lo cual conllevará una variación en la estabilidad relevante.

- D126K: Se produce el cambio de Ácido Aspártico por una Lisina en el aminoácido 126. Cambio de un residuo ácido por otro básico, produciendo un cambio de carga. La mutación se encuentra en la parte desestructurada del intermediario, con lo cual conllevará una variación en la estabilidad relevante.

1.4.5. E20K/E72K/D126K/G87V (figura 10)

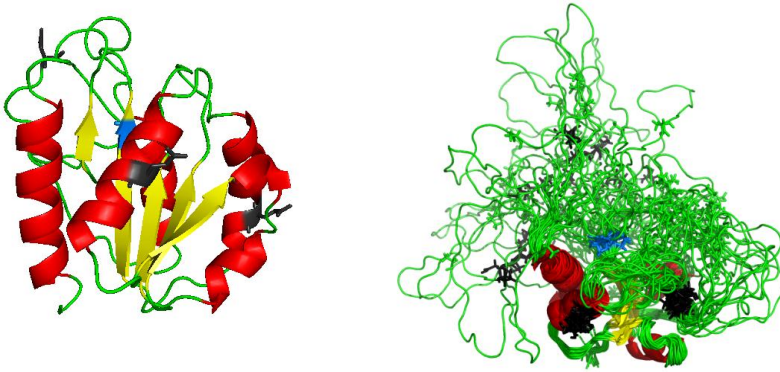


Figura 10: Representación sobre la WT. Sobre el estado nativo a la izquierda, y sobre el intermediario a la derecha, del mutante E20K/E72K/D126K/G87V. Los residuos negros corresponden a las mutaciones del triple mutante E20K/E72K/D126K (3M), y en azul a la mutación G87V.

Se produce un cambio de Glicina por Valina en el aminoácido 87, partiendo como modelo para la mutagénesis del triple mutante (3M) (E20K/E72K/D126K). Cambio de un residuo apolar por otro apolar pero de mayor tamaño, corresponde al relleno de una cavidad. La mutación se encuentra en la parte desestructurada del intermediario, lo que conllevará una variación en la estabilidad relevante.

1.4.6. E20K/E72K/D126K/D100N (figura 11)

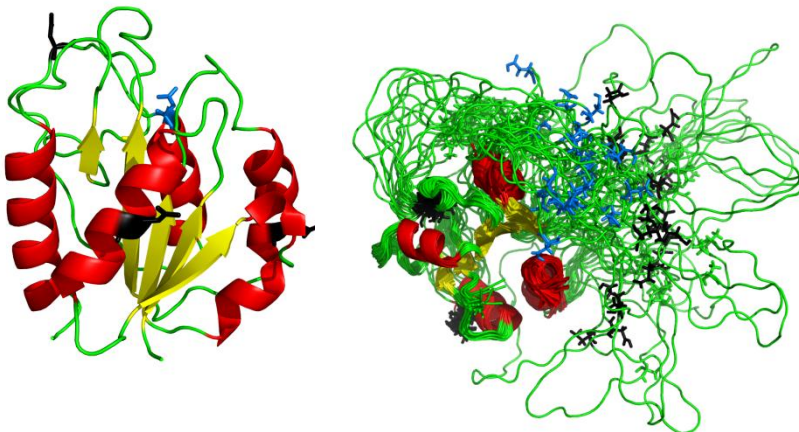


Figura 11: Representación sobre la WT. Sobre el estado nativo a la izquierda, y sobre el intermediario a la derecha, del mutante E20K/E72K/D126K/D100N. Los residuos negros corresponden a las mutaciones del triple mutante E20K/E72K/D126K (3M), y en azul a la mutación D100N.

Se produce un cambio de Ácido Aspártico por Asparagina en el aminoácido 100, partiendo como modelo para la mutagénesis del triple mutante (3M) (E20K/E72K/D126K). Cambio de un residuo ácido por uno polar, con la consiguiente descarga de un puente de H. La mutación se encuentra en la parte desestructurada del intermediario, lo que conllevará una variación en la estabilidad relevante.

1.4.7. E20K/E72K/D126K/A142V (figura 12)

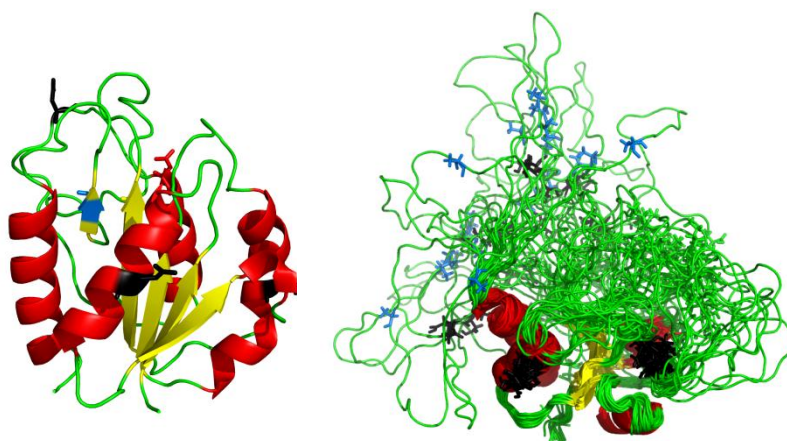


Figura 12: Representación sobre la WT. Sobre el estado nativo a la izquierda, y sobre el intermediario a la derecha, del mutante E20K/E72K/D126K/A142V. Los residuos negros corresponden a las mutaciones del triple mutante E20K/E72K/D126K (3M), y en azul a la mutación A142V.

Se produce un cambio de Alanina por Valina en el aminoácido 142, partiendo como modelo para la mutagénesis del triple mutante (3M) (E20K/E72K/D126K). Cambio de un residuo apolar de cadena corta por otro apolar pero de cadena más larga, corresponde al relleno de una cavidad. La mutación se encuentra en la parte desestructurada del intermediario, lo que conllevará una variación en la estabilidad relevante.

2. Objetivos

El objetivo general de este estudio es profundizar en el conocimiento de la estabilidad de la apoflavodoxina de *Anabaena* PCC 7119.

Objetivos concretos:

- Cultivo y purificación de los mutantes de flavodoxina diseñados.
- Caracterización espectroscópica.
- Estudio comparativo de su estabilidad química en relación con la de la WT y la del triple mutante E20K/E72/D126K.
- Estudio comparativo de su estabilidad térmica en relación con la de la WT y la del triple mutante E20K/E72/D126K.

Globalmente, pretendemos averiguar si los mutantes estudiados estabilizan el estado nativo frente al intermediario.

Objetivo a largo plazo del grupo:

- Se pretende avanzar con este trabajo en el diseño y obtención de una flavodoxina mutante en la que ya no se pueble el intermediario. Cuando se consiga, se investigará si la unión de FMN y la función de la proteína se conservan en ausencia de intermediario.

3. Materiales y Métodos

3.1. Material Biológico

3.1.1. Cepa

Las flavodoxinas analizadas en este trabajo fin de Máster son proteínas recombinantes obtenidas en una cepa BL.21 de *E. coli*, cuyo genotipado es:

$$E. coli \text{ B F- } dcmompThsdS(r_B^- m_B^-) \text{ gal } [malB^+]_{K-12}(\lambda^S)$$

Esta cepa se ha utilizado en la clonación y expresión de proteínas.

3.1.2. Cultivo de *E. coli*

3.1.2.1. Medios de cultivo líquido

El medio líquido de cultivo de *E. coli* es el LB

Triptona	10g/l
Ectracto de levadura	5g/l
NaCl	5g/l

Una vez preparado se autoclava a 120°C, para conseguir su esterilización, cuando acabe este proceso se usará al volumen preparado o en su defecto se guardará en la nevera hasta su uso.

3.1.2.2. Medio de cultivo sólido

El medio sólido se preparará utilizando *PlateCount Agar*, el cual está compuesto por triptona (5.0 g/L), extracto de levadura (2.5g/L), dextrosa (1.0 g/L) y agar (15.0 g/L). Para preparar un litro de LBA se disuelve 23.5g por litro de agua. La mezcla solo se disuelve calentando así que se aprovecha el paso de autoclavado. La disolución resultante se enfría y se añade el antibiótico, ampicilina. Se vierte en placas *Petri* \approx 20ml y se deja solidificar en la cámara de flujo laminar y bajo luz ultravioleta. Las placas se inoculan con las bacterias transformadas ayudándose con un asa de siembra, se dejan incubando a 37°C hasta el día siguiente.

3.1.3. Conservación de Cepas

Se evita el paso de transformaciones posteriores.

Aprovechar cuando se cultiva para hacer un stock de células competentes transformadas. Aproximadamente a las 2 horas de su incubación en el orbital medir su densidad óptica en un espectrofotómetro (uso cubeta de cuarzo), debe estar entre 0.4-0.6 para que la célula se encuentre en la fase exponencial de crecimiento (figura 13).

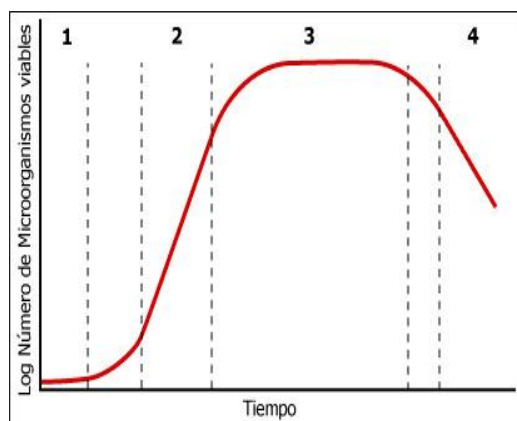


Figura 13: Representación de la curva de crecimiento. 1.- Fase de latencia, 2.- Fase exponencial, 3.- Fase estacionaria, 4.- Fase de muerte

En el espectrofotómetro se usa como blanco medio LB, y la muestra se medirá diluida para evitar que se salga de rango (100 μ l falcon + 900 μ l LB). El valor que obtenga midiendo a 600nm lo multiplicaré por 10 (factor de dilución usado) y sabré si está en la fase correcta de crecimiento.

El siguiente paso se llevará a cabo en campana y con esterilidad.

Una vez cumplida la condición de la densidad óptica se guarda en glicerol \approx 30%, (están ya esterilizados en *ependorf* a un volumen de 200 μ l), se añade 400 μ l de muestra a cada *ependorf* de glicerol, de tal manera que quedará guardado en glicerol al 33.3%. En estas condiciones ya pueden ser guardadas y almacenadas a -80°C .

3.2. Manipulación de DNA

3.2.1. Características del plásmido

Se utilizó el plásmido pTrc99A 7119 (Genebank S68006.1, EMBL, (Fillat *et al.*, 1991) con el gen de la proteína de estudio, flavodoxina (figura 14). Entre las características de este plásmido se

encuentra que contiene aproximadamente 4176 pares de bases, un promotor Lac inducible con IPTG, un origen pBR322, una secuencia codificante para resistencia a ampicilina, un origen de replicación para *E. coli* y sitios de corte para varias enzimas de restricción (Amann *et al.*, 1988). Este vector fue diseñado para el clonaje y expresión de proteínas en *E. coli*.

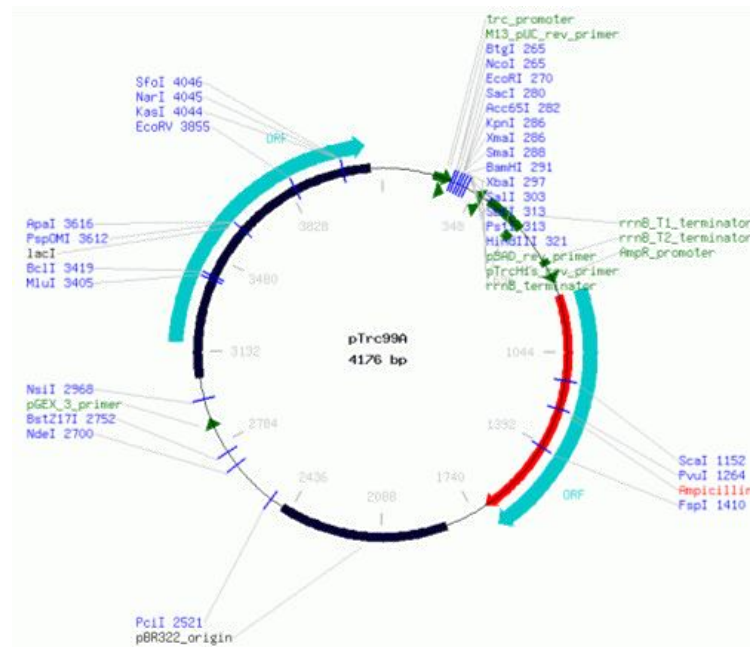


Figura 14: Plásmido pTrc99A.

Los plásmidos utilizados para realizar la mutagénesis dirigida fueron encargados a la empresa Mutagenex; cada uno de los plásmidos utilizados contenían la flavodoxina mutada o WT a sobreexpresar.

3.2.2. Purificación de plásmidos

Se realiza este paso para asegurar que haya un stock de los plásmidos, se utilizó para ello el “GenelutePlasmid Mini-Pret Kit (SIGMA)”

En este proceso no es necesario esterilidad.

Partir de un falcón del proceso de cultivo, cada falcon contiene 10 ml LB+ 10 µl ampicilina + colonias.

Echar a un *ependorff* 1.4 ml del falcon y centrifugar durante 1 minuto a velocidad máxima, tirar el sobrenadante y volver a repetir la misma operación.

Añadir al pellet obtenido 200 µl de la solución de resuspensión (resuspender bien con la pipeta).

Añadir 200 µl de solución de lisis y remover suavemente vorteoando con la mano, en este paso no se puede estar más de 5.

Añadir 450 µl de solución de neutralización y vortear con la mano 4-6 veces, posteriormente centrifugar durante 10 minutos.

Añadir a la columna que viene en el Kit 500 µl de solución de preparación de la columna, centrifugar 1 minuto y desechar el sobrenadante. (La columna va colocada dentro de un *eppendorf* y el sobrenadante quedará en la parte inferior de este).

Adicionar a la columna el sobrenadante resultante del paso 5, centrifugar 1 minuto y desechar el sobrenadante.

Añadir 500 µl de la solución de lavado opcional, centrifugar 1 minuto y desechar el sobrenadante. A continuación añadir 750 µl de solución de lavado, centrifugar 1 minutos y desechar el sobrenadante.

Poner la columna en un *eppendorf* abierto y añadir 50 µl de agua milli-Q estéril, centrifugar 1 minuto, eliminar la columna y quedarse con el *eppendorf* donde estará el plásmido purificado.

Etiquetar correctamente el *eppendorf* y congelar.

3.2.3. Transformación en células competentes

Se trabajará en condiciones de esterilidad (y en hielo cuando se indique). Se hará un control negativo para comprobar que el proceso de transformación ha transcurrido de manera satisfactoria.

Adicionar a cada *eppendorf*:

Control (-) 100 µl células competentes (BL21) + 10 µl agua mlli-Q

Muestras 100 µl células competentes (BL21) + 5 µl plásmido con el que deseamos transformar

Realizar un ciclo de temperatura:

Incubar en hielo 15 minutos, 50 segundos en un baño seco a 42°C y volver a incubar en hielo 2 minutos

Añadir a cada *eppenforf* 900 µl de LB fresco e incubar en un orbital 2h a 37°C.

Sembrar 100 µl de cada *ependorf* en una placa de LBA + ampicilina y extender de manera homogénea ayudados de un asa de siembra. Incubar placas sembradas a 37°C en la estufa durante 12-14 horas.

3.3. Obtención de Flavodoxina

3.3.1 Expresión de proteínas recombinantes

3.3.1.1. Expresión a media escala

Se realiza un cultivo de 10ml de LB fresco en un falcon (x10) al cual a la llama se le adicionan 10µl de ampicilina y una colonia de *E. coli* ya transformada. Dejar en crecimiento 4-5 horas en un orbital a 37°C con una agitación de 220 rpm.

3.3.1.2. Expresión a mayor escala

Preparar erlenmeyer con 1 litro de LB (x10), tapar las bocas con papel de aluminio y cinta indicadora de autoclavado, se autoclava y posteriormente se atempera, (si la temperatura del medio de cultivo fuera elevada provocaría la inhibición del crecimiento cuando fueran inoculadas las bacterias ya transformadas).

Adicionar al erlenmeyer el falcon con las células de *E. coli* en crecimiento y 1ml de ampicilina (a la llama para evitar contaminaciones), dejar en crecimiento 5-6 horas en un orbital a 37°C y 220 rpm.

Pasado el tiempo de crecimiento exponencial (densidad óptica a 600 nm sea de 0.6-0.8) añadir a la llama para evitar contaminaciones 1ml de IPTG a cada Erlenmeyer (x10) para inducir la sobreexpresión. Dejar en el orbital a 37°C y 220 rpm overnight.

El cultivo se recogerá mediante centrifugaciones (previamente equilibrado de los tubos 2 a 2 con la balanza romana) a 4°C, 9000 rpm y durante 10 minutos usando un rotor JA-10. Las dos últimas centrifugaciones se harán de 15 minutos para que quede más adherido el *pellet* y minimizar así posibles pérdidas.

El sobrenadante de las centrifugaciones se tira a un bidón de desecho de *E. coli* siempre con un poco de lejía y en la campana.

Una vez recogidos en falcon y pesados, congelarlos a -20°C hasta su uso.

3.3.2. Purificación de flavodoxina

El protocolo usado para la purificación de los mutantes utilizados, es una pequeña variación del utilizado para la flavodoxina silvestre (Fillat et al., 1991). El bajo punto isoelectrico de la flavodoxina ($pI=3.8$) hace que esté cargada a pH neutro y, por lo tanto, permite la utilización de intercambiadores aniónicos débiles como la DEAE-celulosa en su purificación (M. Bueno, 2006). En todo momento se intenta que la temperatura de trabajo sea de 4°C o muy próxima a ella.

3.3.2.1. Obtención de extracto crudo

Los *pellets* obtenidos en el paso anterior se resuspenden en 10 volúmenes de TRIS-Venenoso 50mM (Tris-HCl 50mM, pH 8, EDTA 100 μ M, β -mercaptoetanol 100 μ M) por cada gramo de células, ayudándose de una pipeta de plástico, según vaya tomando una consistencia líquida pasarlo a un vaso de precipitados, el cual debe estar dentro de una cubeta con hielo (durante el proceso de purificación se hará todo de manera refrigerada para evitar el deterioro de las proteínas).



La lisis celular se realiza por sonicación (figura 15), (sonicador DRH UP200 DR *Hielsher*), el cual dará la lisis por ciclos de ultrasonidos. Se realizan de 8 a 10 ciclos de 45 segundos al 70% de potencia con descansos de 30 segundos entre ciclo y ciclo. La muestra se mantiene en todo momento en hielo para evitar su calentamiento y por consiguiente su deterioro.

Figura 15: Proceso de sonicación, sonicador DRH UP200 DR *Hielsher*.

Los restos celulares se eliminarán por centrifugación en frío utilizando una centrífuga Avanti™ J-25 (figura 16), siguiendo el programa: 4°C, 18000 rpm, 30 minutos y usando un rotor JA.25.50, se desecha el precipitado, donde quedarán restos celulares. En el sobrenadante esta entre otros compuestos citoplasmáticos estará nuestra proteína de estudio, llamándose esta mezcla extracto crudo.

Figura 16: Centrífuga Avanti™ J-25.



3.3.2.2. Precipitación con sulfato de amonio

El extracto crudo obtenido es tratado con sulfato de amonio molido con el fin de conseguir la precipitación de proteínas y restos celulares no deseados. La adición se realiza lentamente para evitar que se produzcan una acidificación no homogénea y pueda dañar la proteína, se agrega sulfato de amonio molido hasta una saturación del 60% (36.1 gramos por cada 100ml de extracto crudo). La adición se hará en frío (el vaso debe estar dentro de una cubeta con hielo), con agitación y en oscuridad (cubierto de papel de plata) (figura 17). Se deja reposar en estas condiciones durante 30 minutos para conseguir una precipitación satisfactoria.



Figura 17: Proceso de precipitación con sulfato de amonio.

En esta etapa se eliminan muchos restos celulares así como una gran cantidad de proteínas. Centrifugar en frío a 4°C, 18000rpm y 30 minutos (rotor JA 25.50). Se elimina el precipitado, el cual contendrá todavía restos celulares y alguna proteína; en el sobrenadante se encontrará la proteína de estudio (flavodoxina).

El sobrenadante obtenido se pondrá en un vaso cubierto de papel de plata, con un pequeño testigo para que cuando se adicione a la columna se vea por dónde va el nivel.

3.3.2.3. Cromatografía de intercambio iónico en gradiente reverso de sulfato de amonio

El sobrenadante obtenido de la precipitación con sulfato de amonio al 60%, se carga en una columna de DEAE-celulosa (figura 18); previamente equilibrada. El equilibrado se realiza pasando 200-300ml de Tris-HCl 50mM pH 8 y posteriormente 3 volúmenes (450ml) de TRIS-HCl 50mM pH 8 con sulfato amónico al 60%. Se realiza en la cámara fría y aquí es donde se adicionará también el sobrenadante obtenido en la precipitación con sulfato de amonio.



Terminado este paso se lava la columna con 3 volúmenes (450 ml) de tampón Tris-HCl 50 mM con sulfato amónico al 60%.

Figura 18: Columnas de DEAE-celulosa (ya equilibradas) cargando el sobrenadante obtenido de la precipitación del extracto crudo con sulfato de amonio. Sistema montado en la cámara fría para mantener la temperatura de 4°C.

3.3.2.4. Purificación mediante FPLC™

Con la concentración de sal utilizada la flavodoxina se quedará retenida en la columna, eluyendo de esta manera otras proteínas. Para conseguir eluir nuestra proteína ahora fijada en la columna, se hará un gradiente reverso de sulfato amónico (60% al 0%). Este gradiente reverso se realiza con la ayuda del sistema de ÄKTA *prime* (figura 19) pudiendo recoger de forma automatizada fracciones de 6.5 ml. Bien ayudados por el cromatograma (figura 20) cuando aparezca el pico de absorbancia UV-Vis, como por la característica coloración naranja que presenta la holoflavodoxina de *Anabaena* debido a su unión al cofactor FMN.



Figura 19: ÄKTA *prime*

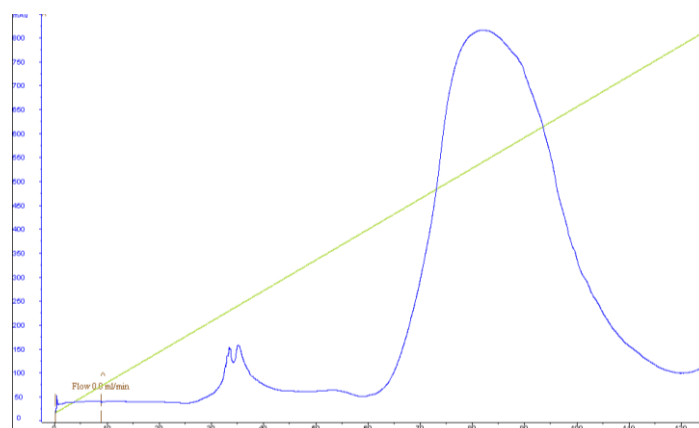


Figura 20: Cromatograma del primer paso de purificación cromatográfica de la flavodoxina de *Anabaena*. El color azul representa la absorbancia en el UV-VIS a 280nm y en color verde el gradiente aplicado.

Todas las disoluciones utilizadas en el AKTA deberán estar previamente desgasificadas, utilizando un equipo de vacío (figura 21), evitando de esta manera la entrada de impurezas y burbujas en el equipo.

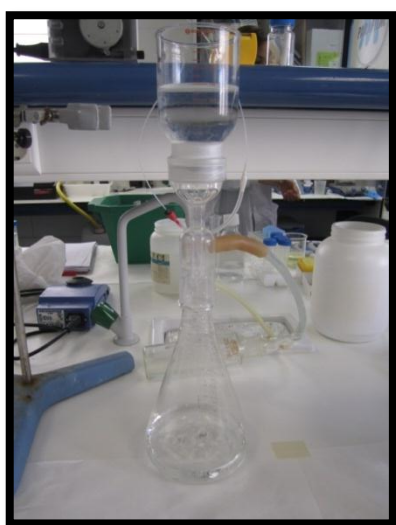


Figura 21: Equipo de vacío.

Disoluciones purificadas y desgasificadas:

1ª cromatografía

- TRIS-HCl 50mM pH 8 con sulfato mónico al 60%
- Tris 50mM pH 8

2ª cromatografía

- Tris 50mM pH 8
- TRIS-NaCl 0.5M

Agua milliQ (lavado del equipo)

3.3.2.5. Diálisis

Las fracciones recogidas se dializarán 3 veces con TRIS-HCl 50mM pH 8 en frío y oscuridad (figura 23), cada 3-4 horas cambiar la diálisis.

3.3.2.6. Cromatografía en intercambio iónico en gradiente de cloruro de sodio

La muestra dializada se carga en una segunda columna de DEAE-Celulosa equilibrada previamente con 450ml (3 volúmenes) de TRIS-HCl 50mM pH 8, se lava la columna con 3 volúmenes del mismo tampón (TRIS-HCl 50mM pH 8). La proteína se eluye con un gradiente salino de 0-0.5M de cloruro de sodio en el tampón de trabajo. Este gradiente reverso se realiza con la ayuda del sistema de *ÄKTAprime* (figura 19) pudiendo recoger de forma automatizada fracciones de 6.5 ml. Bien ayudados por el cromatograma (figura 20) cuando aparezca el pico de absorbancia UV-Vis, como por la característica coloración naranja que presenta la holoflavodoxina de *Anabaena* debido a su unión al cofactor FMN.

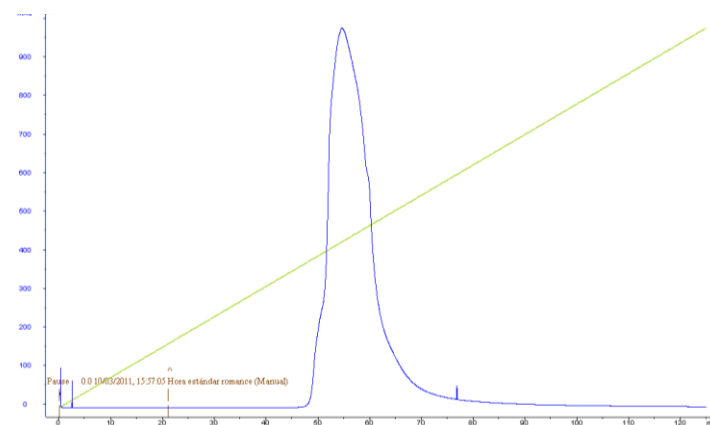


Figura 22: Cromatograma del segundo paso de purificación cromatográfica de la flavodoxina de *Anabaena*. El color azul representa la absorbancia en el UV-VIS a 280nm y en color verde el gradiente aplicado.

3.3.2.7. Diálisis

Las fracciones obtenidas se dializarán en TRIS-HCl 50mM pH 8 al igual que en el caso anterior 3 veces en frío y oscuridad (figura 23), cambiando cada 3-4 horas.

La muestra se prepara en alícuotas y se conserva a -20°C.



Figura 23: Proceso de Diálisis.

3.3.3. Obtención apoflavodoxina

La realización de todas las pruebas de caracterización espectroscópica así como los estudios de estabilidad, se llevaron a cabo usando la proteína en su forma apo (sin estar unida al FMN). En el proceso de obtención de la flavodoxina, se obtiene en su forma holo (unida al FMN). De esta manera las apoproteínas utilizadas en este trabajo se obtuvieron a partir de las holoproteínas correspondientes por precipitación con ácido tricloroacético (Edmondsn et al., 1971).

Para cada ml de muestra se añaden 11µl de DTT 100mM y 101µl de TCA al 33%

El TCA provoca la disociación del cofactor y como consecuencia su precipitación en medio ácido, y el DTT evita la formación de dímeros. Se produce una suspensión que deberá ser centrifugada en frío durante 5 minutos a 5000 rpm, el precipitado obtenido se resuspende en una solución fría de TCA al 3% y DTT 1mM volviendo a centrifugar en las mismas condiciones. Se repetirá tanta veces como haga falta hasta que el precipitado sea completamente blanco, esto será indicativo de que ha soltado todo el cofactor.

La proteína precipitada se resuspende en MOPS 1M pH 7, para neutralizar el medio ácido. El resuspendido se dializa en centricones (*Amicon® Ultra-15 de Millipore*) con MOPS 50mM pH 7 las veces necesarias hasta que la proteína este a una concentración de 400-700mM. Los ciclos de centrifugación fueron de 3 a 5 minutos a 4000 rpm. La proteína se alicuota y almacena a -20°C.

3.3.4. Electroforesis desnaturalizante: Phast System

La comprobación de la pureza de las proteínas purificadas se realiza haciendo una electroforesis desnaturalizante (SDS) en gel de poliacrilamida (PhastGel™ Gradient 8-25). La electroforesis se lleva a cabo en el equipo Phast System (figura 24). La separación de las proteínas se realiza en función de su tamaño molecular, las proteínas pequeñas migraran de forma más rápida y las de mayor tamaño lo harán de forma más lenta. Para la visualización se usa tinción con Azul de Coomassie; la aparición de una única banda, de peso molecular esperado, es indicativa de una alta pureza.



Figura 24: Phast System.

3.4. Caracterización Espectroscópica

Las flavodoxinas han sido caracterizadas espectroscópicamente mediante sus espectros de absorción en el UV-visible, de emisión de fluorescencia y de dicroísmo circular en el UV-lejano y en el UV-cercano. Los coeficientes de extinción de las apoproteínas mutantes no se han determinado de manera experimental ya que las tirosinas y triptófanos no se encuentran mutados en ninguno de ellos. Se trabajará con el coeficiente de la apoproteína WT que a 280nm es de $34.1 \pm 0.5 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ (Genzor et al., 1996a).

3.4.1. Absorbancia UV-VIS

El espectro de Absorbancia de las proteínas presenta picos característicos comunes, y en ocasiones, otros picos de máxima absorción correspondiente a cofactores, o moléculas unidas a la proteína analizada. En las proteínas los enlaces peptídicos absorben a longitudes de onda cercanas a los 200nm, los anillos aromáticos en la zona de 280nm. Los cofactores unidos a las proteínas también pueden presentar picos característicos que absorben entre los 400-700 nm.

Los espectros de absorción UV-VIS fueron registrados utilizando el espectrofotómetro *Cary 100 Bio* (figura 25), realizando barridos entre 200-800nm. El tampón utilizado fue MOPS 50mM, pH 7.0.



Figura 25: Espectrofotómetro *Cary 100 Bio*.

Una característica importante de la absorbancia es su proporcionalidad con la concentración de compuesto; sigue la ley de Lambert-Beer (ec.3.4.1.1). En este estudio, se ha utilizado esta propiedad para calcular la concentración de las muestras de apoflavodoxina, y además, como comprobación de la eliminación del cofactor FMN.

$$\text{ec.3.4.1.1.} \quad Abs = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

La pureza y concentración de los mutantes analizados se ha determinado tomando como referencia los datos espectroscópicos de la flavodoxina recombinante WT. ($\epsilon_{274}=34.1\text{mM}^{-1}$).

3.4.2. Emisión de Fluorescencia

El fenómeno de emisión de fluorescencia consiste en la liberación, mediante la emisión de fotones de energía ligeramente inferior a la energía luminosa previamente absorbida por una molécula. Por ello, la longitud de onda de emisión de fluorescencia es mayor a la de absorción. Los fluoróforos de las proteínas son los residuos aromáticos y algunos cofactores, (trabajamos con la proteína en forma apo, con los cual los únicos fluoróforos serán los aminoácidos aromáticos). El triptófano aporta normalmente la mayor parte de la señal de fluorescencia de las proteínas y presenta un máximo de emisión de fluorescencia a 355 nm en estado libre, mientras que en una proteína aparece a valores menores que dependerá del entorno en el que se encuentre.

Los espectros de emisión de fluorescencia se registraron con una resolución de 1 nm en el espectrofluorímetro termostatzado *Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer* (figura 26), utilizando una cubeta cuadrangular de 1 cm de paso de luz. En el caso de los espectros de emisión en

el UV, se registro la señal de 300 a 400 nm a una velocidad de barrido de 50 nm.s^{-1} ; habiendo excitado previamente a 280 nm. Las muestras fueron preparadas a una concentración de proteína de $2\mu\text{M}$ en MOPS 50 mM pH 7.0.



Figura 26: Espectrofluorímetro termostatzado *Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer*

3.4.3. Espectros de Dicroísmo Circular

La actividad óptica de las proteínas es también de gran utilidad. Un cromóforo muy interesante que aparece en todas las proteínas es el enlace peptídico. Aunque el enlace peptídico por si no es una estructura quiral (con actividad óptica o capacidad de absorber de modo distinto luz polarizada a la derecha o la izquierda), la interacción entre grupos peptídicos adyacentes dispuestos en

determinadas orientaciones determina que las proteínas presenten actividad óptica (C. Gómez-Moreno, J. Sancho, 2003), de igual manera ocurre con los aminoácidos aromáticos; el entorno que ocupan es el responsable de esa actividad óptica. Esta diferencia de absorción es lo que se llama dicroísmo circular (DC). En las proteínas los aminoácidos aromáticos y la cadena peptídica producen una rotación óptica y un espectro de DC (S. Ayuso, 2012).

Se utilizó un espectropolarímetro *Chirascan* de *Applied Photophysics* (figura 27). Las condiciones para el dicroísmo circular UV en el cercano y en el lejano fueron diferentes.



Figura 27: Espectropolarímetro *Chirascan* *Applied Photophysics*

3.4.3.1. UV lejano

En la región 180-250nm, presentan señal los enlaces peptídicos, por lo que se puede utilizar para conocer el contenido de hélices α y láminas β de una muestra proteica.

La concentración de apoflavodoxina utilizada fue de 20 μ M en MOPS 5mM y NaCl 15mM final. Las cubetas usadas fueron de anchura de 1mm, con una resolución de 0.5nm a una velocidad de 20nm \cdot min⁻¹ y en un rango de longitud de onda entre 200nm-250nm.

La señal experimental se obtiene en grados de elipticidad (θ) y ha de transformarse en elipticidad molar por residuo, ec.3.4.3.1.1.

$$\text{ec.3.4.3.1.1.} \quad [\theta]_{mr} = \left(\frac{\theta}{10 \times c \times l \times N} \right) = \left(\frac{\theta}{10 \times 2^{-4} \times 0.4 \times 169} \right)$$

Donde θ es la señal experimental obtenida, c es la concentración en M, l es la anchura de la cubeta en centímetros y N es el número de aminoácidos de la proteína.

3.4.3.2. UV cercano

En la región 250-310 nm, presentan señal los aminoácidos aromáticos, y depende considerablemente de la estructura terciaria de la proteína.

La concentración de apoflavodoxina utilizada fue de 20 μ M en MOPS 5mM pH 7.0. Las cubetas usadas fueron de anchura de 0.4 cm, con una resolución de 0.5 nm a una velocidad de 20nm \cdot min⁻¹ y en un rango de longitud de onda entre 250nm-310nm.

La señal experimental se obtiene en grados de elipticidad (θ) y ha de transformarse en elupticidad molar, ec.3.4.3.2.1.

$$\text{ec.3.4.3.2.1.} \quad [\theta]_{mr} = \left(\frac{\theta}{10 \times c \times l \times N} \right) = \left(\frac{\theta}{10 \times 2^{-4} \times 0.1 \times 169} \right)$$

Donde θ es la señal experimental obtenida, c es la concentración en M, l es la anchura de la cubeta en centímetros y N es el número de aminoácidos de la proteína.

3.5. Estabilidad conformacional

3.5.1. Desnaturalización química

Un aumento de la fuerza iónica del medio (por adición de urea) provoca una disminución en el grado de hidratación de los grupos iónicos superficiales de la proteína, ya que estos solutos compiten por el agua y rompen los puentes de hidrógeno o las interacciones electrostáticas (C. Gómez-Moreno, J. Sancho, 2003). El procedimiento consiste en seguir a diferentes concentraciones de urea la emisión de fluorescencia de los triptófanos y las tirosinas de la proteína, aprovechando que presentan diferente rendimiento cuántico en el estado nativo y en el estado desnaturalizado (M. Bueno, 2006). En esta proteína en concreto, la emisión de fluorescencia del estado nativo es mayor que la del desnaturalizado (Genzor et al., 1996a).

3.5.2. Preparación de disoluciones de urea

Se preparan disoluciones a distintas concentraciones de urea (tabla 1) (para poder seguir la transición entre el estado nativo y desplegado) por pesada en balanza analítica y enrasadas en matraces aforados de 25ml con H₂O milli-Q.

[Urea]final	[Urea]real	g Urea/25 ml
0	0	0
0,2	0,22	0,33033
0,4	0,44	0,66066
0,6	0,66	0,99099
0,8	0,88	1,32132
1	1,1	1,65165
1,2	1,32	1,98198
1,4	1,54	2,31231
1,6	1,76	2,64264
1,8	1,98	2,97297
2	2,2	3,3033
2,2	2,42	3,63363
2,4	2,64	3,96396
2,6	2,86	4,29429
2,8	3,08	4,62462
3	3,3	4,95495
3,2	3,52	5,28528
3,4	3,74	5,61561
3,6	3,96	5,94594
3,8	4,18	6,27627
4	4,4	6,6066
4,2	4,62	6,93693
4,4	4,84	7,26726
4,6	5,06	7,59759
4,8	5,28	7,92792
5	5,5	8,25825
5,2	5,72	8,58858
5,4	5,94	8,91891
5,6	6,16	9,24924
5,8	6,38	9,57957
6	6,6	9,9099
6,2	6,82	10,24023
6,4	7,04	10,57056
6,6	7,26	10,90089
6,8	7,48	11,23122
7	7,7	11,56155
7,2	7,92	11,89188

Tabla 1: Preparación de las distintas disoluciones de Urea.

Las disoluciones se alicuotan en eppendorfs a un volumen de 900µl (si no van a ser utilizados en el momento se congelarán a -20°C), a cada alícuota se añadirá 100µl de proteína tamponada (20µM en MOPS 50mM pH 7). Tanto la preparación de las muestras de agente desnaturante (Urea) como de la proteína tamponada, se realizaran con ayuda de una jeringuilla Hamilton (figura 28).



Figura 28: Jeringuilla Hamilton. Usada para alicuotar las soluciones de urea, volumen 1ml. La jeringuilla usada para la adición de proteína fue de un volumen de 100µl.

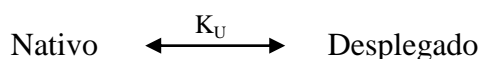
Una vez preparadas las muestras, se dejan en reposo durante 30 minutos a 25°C, con el fin de que alcancen el equilibrio termodinámico.

3.5.3. Medidas de fluorescencia

La concentración final de proteína en las disoluciones con urea fue de 2 µM en MOPS 50 Mm, pH7. La fluorescencia se recogió en un fluorímetro *Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer* (figura 25), equipado con un porta cubetas termostatzado. La temperatura se controla mediante una sonda en contacto con la muestra y acoplada al equipo. Las muestras se excitaron a 280 nm y se recogieron las emisiones de fluorescencia a 320 nm y 360 nm. Se utilizaron cubetas rectangulares de 10 x 4 mm de paso de luz (*Hellma*) y de 1.5 ml de capacidad.

3.5.4. Análisis de los datos

Las curvas obtenidas se ajustan a un modelo de dos estados, no hay presencia de intermediario químico, siguiendo un equilibrio de desnaturalización de 2 estados.



La constante de equilibrio del proceso K_U (ec.3.5.4.1) viene dada por una relación entre [nativo] y [desnaturalizado] y a partir de este valor se obtiene la energía libre (ec.3.5.4.2.) del estado de desnaturalización (figura 29).

$$\text{ec.3.5.4.1.} \quad K_U = \frac{[U]}{[N]} \quad \text{ec.3.5.4.2.} \quad \Delta G = -RT \cdot \ln K_U$$

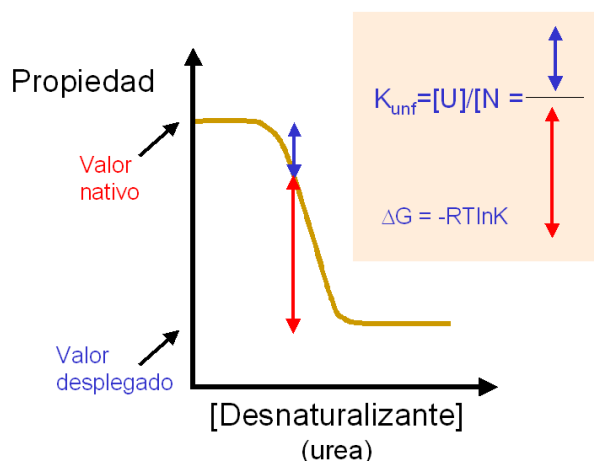


Figura 29: Mediada de la estabilidad conformacional de una proteína mediante desnaturalización química.

La energía libre de Gibbs en el equilibrio muestra una dependencia lineal con la concentración de desnaturalizante, en la desnaturalización térmica la dependencia lineal se produce con la temperatura.

Las diferencias de energía libre se calculan siempre a partir de constantes de equilibrio. La forma más sencilla de medir la constante del equilibrio de plegamiento es el método de extrapolación lineal (LEM) que se basa en medir una propiedad espectroscópica de la proteína, en este caso usaremos la fluorescencia, a distintas concentraciones de una sustancia desnaturalizante (urea) y extrapolar la estabilidad a concentración nula de desnaturalizante (ec.3.5.4.3). Los valores calculados dependen de la pendiente m , por lo que suele referirse con mayor precisión el valor de concentración de desnaturalizante en la que la mitad de las moléculas de proteína están en su estado nativo y la otra mitad en el estado desnaturalizado, ec.3.5.4.4.(figura 30). (C. Gómez-Moreno et J. Sancho 2003).

$$\text{ec.3.5.4.3.} \quad \Delta G = \Delta G_w - m[D]$$

$$\text{ec.3.5.4.4.} \quad (D)_{1/2} = U_m = \frac{\Delta G_w}{m}$$

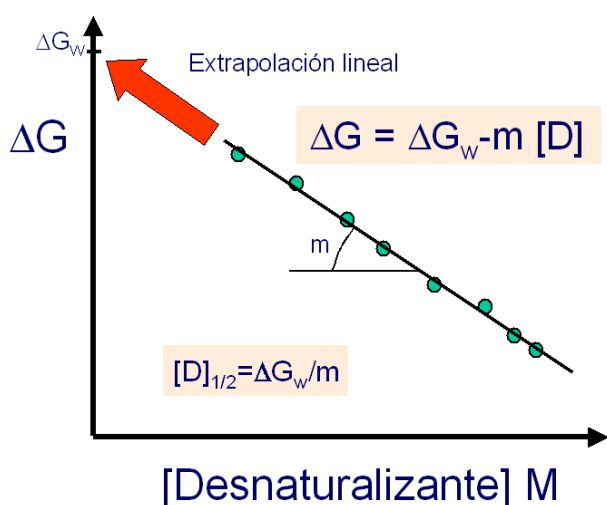


Figura 30: Método de extrapolación lineal para calcular la estabilidad de las proteínas por desnaturalización química. Representación de la relación entre ΔG y m . ΔG_w corresponde a la estabilidad de la proteína en ausencia de Urea $[D]$. La pendiente m es la constante de proporcionalidad.

Para cada concentración de urea, la constante de equilibrio se puede calcular a partir de la emisión de fluorescencia observada (S), la emisión de fluorescencia observada en el estado nativo (S_N) y en el desnaturalizado (S_U), ec.3.5.454.(M. Bueno, 2006).

$$\text{ec.3.5.4.5.} \quad K_U = \frac{(S_N - S)}{(S - S_U)}$$

Se asume que la emisión de fluorescencia de los estados nativo (S_N) y el desnaturalizado (S_U) de la proteína varía linealmente con la concentración de Urea (Santoro et Bolen, 1988).

La señal espectroscópica obtenida se ajusta a la siguiente ecuación (ec.3.5.4.6.)

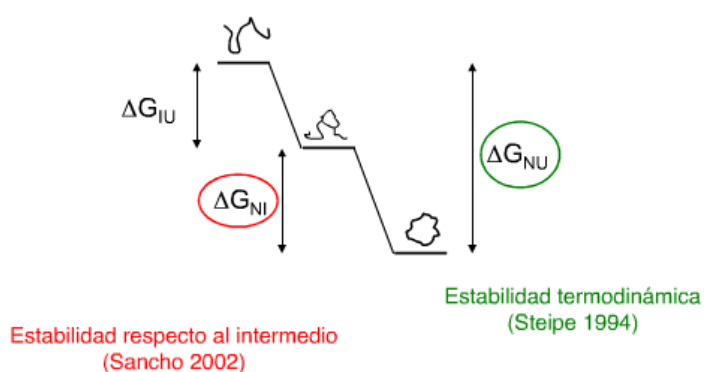
$$\text{ec.3.5.4.6.} \quad S = \frac{S_N + m_N[D] + (S_U + m_U[D])e^{\left(\frac{-\Delta G_W - m[D]}{RT}\right)}}{1 + e^{\left(\frac{-\Delta G_W - m[D]}{RT}\right)}} \quad \begin{array}{l} R \text{ constante de los gases ideales} \\ T \text{ temperatura absoluta} \end{array}$$

Los valores obtenidos fueron ajustados usando el programa Origin™ (OriginLab).

3.6. Desnaturalización térmica

Cuando la temperatura es elevada aumenta la energía cinética de las moléculas con lo que se desorganiza la envoltura acuosa de las proteínas, y se desnaturalizan. Así mismo, un aumento de la temperatura destruye las interacciones débiles y desorganiza la estructura de la proteína, de forma que el interior hidrófobo interacciona con el medio acuoso (C. Gómez-Moreno et J. Sancho 2003).

Se realiza un seguimiento de la desnaturalización térmica midiendo en un rango de temperatura de 8-90°C varias propiedades espectroscópicas a diferentes temperaturas mediante diferentes experimentos, en concreto con el uso de 4 técnicas espectroscópicas. Las proporciones entre la forma



plegada y desplegada de la proteína cambia al ir aumentando la temperatura.

La desnaturalización térmica a diferencia de la desnaturalización química sigue un proceso de 3 estados, tiene en cuenta la existencia de un estado intermediario (figura 31).

Figura 31: Esquema del proceso de desnaturalización de una proteína que sigue un proceso de 3 estados.

3.6.1. Seguimiento de la desnaturalización térmica: Técnicas Espectroscópicas

El seguimiento de la desnaturalización térmica se lleva a cabo siguiendo cuatro propiedades espectroscópicas: Dicroísmo circular en el cercano, en el lejano, absorbancia y emisión de fluorescencia.

3.6.1.1. Dicroísmo circular en el cercano, lejano y absorbancia

Los valores de absorbancia se recogen a la vez que los de dicroísmo circular en el cercano, con lo cual las características de la disolución y condiciones de programación del sistema serán iguales para ambas propiedades espectroscópicas. Las condiciones de la solución de proteína a analizar son las mismas que se describieron para la obtención de los espectros.

La muestra (aproximadamente 1 ml para DC UV cercano y 300 μ l para DC UV lejano) fue adicionada a una cubeta termostatzada igual a la usada para obtener los espectros para cada caso. Se cerró con *parafilm* para evitar pérdidas de la muestra por evaporación al aumentar la temperatura. Se utilizó el espectropolarímetro *Chirascan* de *Applied Photophysics* (figura 27), acoplado a un sistema de control de temperatura y automatizado. Las medias fueron registradas en un rango de temperatura de 8-90°C, siendo la velocidad de incremento de temperatura igual a 1 °C/min. Las medidas se registraron a una longitud de onda determinada según el experimento: 222 nm para dicroísmo circular en el cercano (DCC) y Absorbancia, y 288 nm, para dicroísmo circular en el lejano (DCL) (L.A. Campos, 2004).

3.6.1.2. Emisión de fluorescencia

La emisión de fluorescencia por desnaturalización térmica fue seguida usando el espectrofluorímetro *Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer* (figura 26). Las condiciones de la solución de proteína a analizar fueron las mismas que se describieron para la obtención de los espectros.

Se utilizó una cubeta cuadrangular de 1 cm de paso de luz, se cerró con su tapón de teflón y la temperatura se controló con la ayuda de una sonda acoplada al equipo. Las medias fueron registradas en un rango de temperatura de 8-90°C, siendo la velocidad de incremento de temperatura igual a 1 °C/min. La emisión de fluorescencia se registró a dos longitudes, 320nm y 360nm, tras excitar previamente a una longitud de onda de 280nm. Para minimizar la fuerte dependencia de la fluorescencia con la temperatura se representó el cociente de emisión de estas dos longitudes 320/360 (S. Ayuso, 2012).

3.6.2. Análisis de datos obtenidos por técnicas espectroscópicas

Los valores analizados con el programa OriginTM (originLab) y MLAB para cada una de las pruebas espectroscópicas nos dieron unos valores de ΔH , ΔC_p y T_m . A partir de la diferencia de entalpía (ΔH), la diferencia de capacidad calorífica (ΔC_p) y la temperatura media de desnaturalización (T_m), la estabilidad puede calcularse a cualquier temperatura (ec.2.6.2.1.).

$$(ec. 3.6.2.1.) \quad \Delta G_{D \rightarrow N} = -RT \cdot \ln K_{D/N} \quad (ec.3.6.2.2.) \quad \Delta G_{D \rightarrow N} = \Delta H_{D \rightarrow N} - T \Delta S_{D \rightarrow N}$$

$$(ec.3.6.2.3.) \quad \Delta G_{D \rightarrow N} = \Delta H_{D \rightarrow N}(T_m) - T_m \Delta S_{D \rightarrow N}(T_m) = 0$$

Integrando la entalpía y entropía de la ecuación 3.6.2.2. desde T a T_m y sustituyendo $\Delta H_{D \rightarrow N}(T_m)$ y $\Delta S_{D \rightarrow N}(T_m)$ en la ec.3.6.2.3. (Privalov, 1979) se llega a una ecuación que relaciona la constante de equilibrio con los parámetros termodinámicos en el punto medio de transición, T_m (ec.3.6.2.4.) (M, Bueno 2006). Para un proceso de tres estados la ec. 3.6.2.4. quedara de la siguiente manera, ec. 3.6.2.5. y ec.3.6.2.6.:

$$ec. 3.6.2.4. \quad \Delta G_{D \rightarrow N}(T) = \Delta H_{D \rightarrow N} \cdot \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) + \Delta C_p \cdot \left[(T_m - T) + T \cdot \ln\left(\frac{T}{T_m}\right)\right]$$

$$ec. 3.6.2.5. \quad \Delta G_{NI} = \Delta H_{NI} \cdot \left(1 - \frac{T}{T_{mNI}}\right) + \Delta C_{pNI} \cdot \left[(T_{mNI} - T) + T \cdot \ln\left(\frac{T}{T_{mNI}}\right)\right]$$

$$ec. 3.6.2.6. \quad \Delta G_{ID} = \Delta H_{ID} \cdot \left(1 - \frac{T}{T_{mID}}\right) + \Delta C_{pID} \cdot \left[(T_{mID} - T) + T \cdot \ln\left(\frac{T}{T_{mID}}\right)\right]$$

Teniendo en cuenta la relación existente entre la constante de equilibrio y las fracciones molares de los estados en el equilibrio ($K_{eq} = \frac{X_D}{X_N}$ y $X_D + X_N = 1$), y asumiendo que la señal espectroscópica de los estados nativos y desnaturalizado varía de una forma lineal con la temperatura, se obtiene la ecuación ec.3.6.2.5.

$$ec. 3.6.2.5. \quad y = \frac{(y_N^0 + m_N T) + (y_D^0 + m_D T) e^{-\{\Delta H_{D \rightarrow N}(T_m)[1 - T/T_m] - \Delta C_p[(T_m - T) + T \ln(T/T_m)]\}/RT}}{1 + e^{-\{\Delta H_{D \rightarrow N}(T_m)[1 - T/T_m] - \Delta C_p[(T_m - T) + T \ln(T/T_m)]\}/RT}}$$

De manera análoga la ecuación para un proceso de tres estados quedará, ec.3.6.2.6.:

$$ec.3.6.2.6. \quad y = \frac{(y_N^0 + m_N T) + (y_I^0 + m_I T) e^{-\{\Delta G_{NI}\}/RT} + (y_D^0 + m_D T) e^{-\{\Delta G_{NI} + \Delta G_{ID}\}/RT}}{1 + e^{-\{\Delta G_{NI}\}/RT} + e^{-\{\Delta G_{NI} + \Delta G_{ID}\}/RT}}$$

Con este procedimiento se obtiene una alta precisión para la estimación de T_m , menor en la $\Delta H(T_m)$ y escasa en la ΔC_p (Pace & Laurents, 1989).

El ajuste se realizó de manera global, para poder obtener parámetros comunes que caractericen el proceso con una mayor precisión, teniendo en cuenta la existencia de un intermediario térmico (I), según: Estado Nativo (N) \leftrightarrow Intermediario (I) \leftrightarrow Estado Desnaturalizado (D)

Si se tratara de una proteína de dos estados, las curvas obtenidas por las cuatro técnicas espectroscópicas deberían superponerse. Sin embargo, cuando aparece un intermediario este hecho no ocurre y no son superponibles. Las curvas obtenidas por fluorescencia y dicroísmo circular en el cercano describen mejor el desplegamiento de la estructura terciaria, mientras que las curvas de absorbancia y dicroísmo circular en el lejano nos describen mejor el desplegamiento de la estructura secundaria (S. Ayuso, 2012).

Para cada proteína analizada se obtienen diferentes curvas, las cuales proceden de experimentos independientes; por eso se hace un tratamiento global para obtener parámetros comunes; además serán normalizadas para que todas tengan el mismo peso en la ecuación.

Las curvas normalizadas fueron analizadas con el programa MLAB, la representación se hará con el programa Origin usando los valores obtenidos con el programa citado anteriormente.

3.6.3. Seguimiento de la desnaturalización térmica: Calorimetría Diferencial de Barrido

Para obtener una descripción termodinámica completa del equilibrio de desnaturalización se utiliza la calorimetría diferencial de barrido de alta sensibilidad o DSC (Sánchez-Ruiz, 1995). Esta

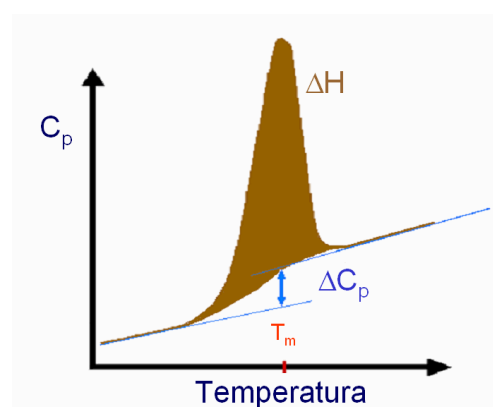


Figura 32. Termograma, mediada de la estabilidad conformacional de una proteína mediante calorimetría diferencial de barrido o DSC

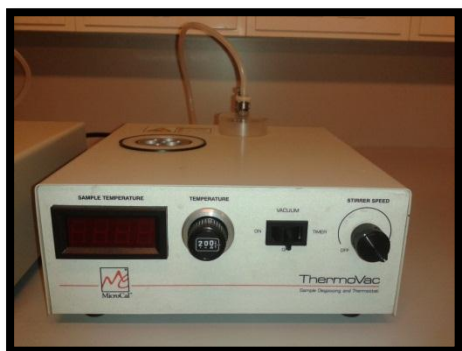
técnica, posiblemente sea la técnica mas fiable que proporciona los valores de ΔG correspondiente al desplegamiento de proteínas, sobre todo para proteínas de 2 estados. Se basa en obtener los valores de capacidad calorífica de una disolución de proteínas en función de la temperatura. El perfil de C_p frente a la temperatura, termograma (figura 32), suele mostrar un pico o transición correspondiente con el desplegamiento de la proteína, se pueden obtener de manera directa los parámetros termodinámicos (ΔH , T_m , ΔC_p) (C. Gómez-Moreno et J. Sancho 2003).

La capacidad calorífica de las flavodoxinas de los mutantes seleccionados de *Anabaena*, se midió utilizando un calorímetro diferencial de barrido VP-DSC Microcalorimeter MicroCAITM



figura 33. Tanto las muestras como los buffer se desgasificaron utilizando un desgasificador ThermoVac MicroCal™ (figura 34), evitando de esta manera la entrada de burbujas al equipo que nos darían como consecuencia lecturas erróneas.

Figura 33: Microcalorímetro diferencial de barrido VP-DSC Microalorimeter, MicroCal™



La desnaturalización térmica de las apoflavodoxinas se realizó en condiciones de concentración de proteína 40μM en MOPS 50 mM pH 7, con una velocidad de barrido de 1 °C/min y en rampa de temperatura de 10-100°C.

Figura 34: Desgasificador ThermoVac MicroCal™

3.6.4. Análisis de datos obtenidos por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los datos obtenidos por esta técnica se analizaron preliminarmente sin ser necesario un ajuste fino para saber si las proteínas propuestas (mutantes 3M+D100N y 3M+A142V) se ajustaban a un modelo de una sola transición, es decir, un desplegamiento basado en dos estados (nativo-desnaturalizado). Se restará la línea base correspondiente al Buffer MOPS 50mM pH 7, se normalizará por concentración (las disoluciones de muestra se prepararon a 40μM) y por último se restará la contribución química.

Se obtendrá un termograma (figura 32) del cual se obtendrán los datos: T_m , ΔH_{cal} (calor requerido para desnaturalizar 1 molécula de proteína) y ΔC_p .

Con estos datos se calculará la Entalpía de van't Hoff (ec.3.6.4.1)

$$\text{ec.3.6.4.1.} \quad \Delta H_{VH} = \frac{4 \cdot R \cdot T_m^2 \cdot C_{p_{max}}}{\Delta H_{cal}}$$

El cociente entre ΔH_{VH} y ΔH_{cal} nos dará la información del proceso de desplegamiento que sufre nuestra proteína. Siendo: un proceso de dos estados cuando el cociente sea igual 1, un proceso con presencia de intermediario cuando el cociente sea <1 y reflejando una asociación en el estado nativo cuando el cociente sea >1.

4. Resultados

Con el objetivo de profundizar en el conocimiento sobre estrategias para conseguir la estabilización de las proteínas, se procedió a sintetizar dos grupos de mutantes que se diferencian en la proteína de partida. Un primer grupo fue realizado sobre la proteína WT, el segundo grupo de mutantes fueron obtenidos a partir de uno ya existente en nuestro departamento que contiene 3 mutaciones (3M (E20K/E72K/D126K). Este triple mutante es mucho más estable que la proteína WT (Bueno, 2006).

4.1. Obtención de mutantes de la apoflavodoxina de *Anabaena* PCC 7119.

Con los plásmidos que contenían los genes mutados correspondientes a cada mutante se transformaron células BL21 de *E. coli*, fueron cultivadas de las cuales se purificaron las proteínas mutadas. Estas se obtienen en su forma holo: complejo de la apoflavodoxina con el FMN. El FMN se eliminó según el procedimiento habitual obteniéndose las apoflavodoxinas mutadas. Podemos señalar que durante el proceso de purificación todos los mutantes se comportaron de forma similar a la proteína silvestre con ligeros retrasos en la fase de elución manteniendo el color naranja, típico de la presencia del FMN unido a la flavodoxina, con la excepción de los mutante D100N (figura 35) y E20K/E72K/D126K/G87V (figura 36), los cuales no presentaron color.



Figura 35: Mutante D100N cargado en la columna de DEAE-celulosa, no presenta la coloración característica de las holoflavodoxinas debida a su unión al cofactor FMN.

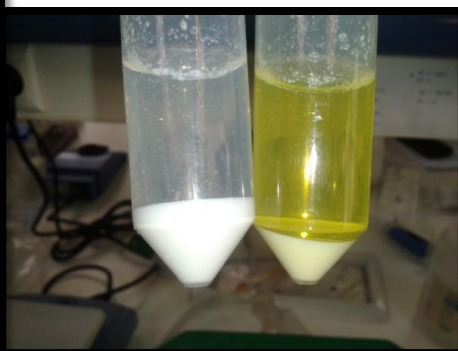


Figura 36: Primer paso de la transformación de holo a apoflavodoxina, a la izquierda el mutante E20K/E72K/D126K/G87V, el cual no presenta la coloración debida al FMN. A la derecha el mutante E20K/E72K/D126K/D100N, el cual presenta la coloración característica.

El mutante E20K/E72K/D126K/D100N durante el lavado con el tampón de sulfato de amonio en la cromatografía de intercambio iónico en gradiente reverso de sulfato de amonio en lugar de

quedarse retenido a la columna, se empezó a eluir de esta una solución naranja, recogiendo lo eluido en este paso y lo obtenido durante el gradiente para ver si se trataba de la misma proteína o era FMN libre que eluia con algún compuesto. Se realizó una electroforesis desnaturalizante de ambas muestras como comprobación (figura 37).

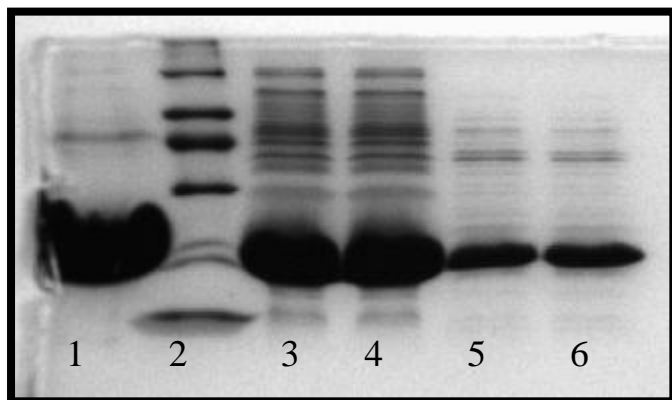


Figura 37: Gel desnaturalizante donde de izquierda a derecha se puede ver:

1)WT, 2)Marcador de peso Molecular, 3) y 4) Fracción eluida con el tampón de lavado, 5) y 6) Fracciones recogidas después de la cromatografía de intercambio iónico en gradiente reverso de sulfato de amonio.

Para asegurarse de que ambas muestras correspondían a la misma proteína, se mandaron alícuotas de ambas a la empresa Matrix Science (<http://www.matrixscience.com>), obteniendo resultados de espectroscopía de masas a través de tripsinado; concluyendo que se trataba de la misma proteína (Flavodoxina de *Anabaena* PC 7119.)

Datos referentes a la alícuota recogida durante el lavado de la columna:

Nominal mass (M_r): **19009**; Calculated pI value: **4.17**
 NCBI BLAST search of [FLAV ANASO](#) against nr
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Nostoc sp. PCC 7119](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
 Sequence Coverage: **27%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MSKK**IGLFYGTQTGK**TESVA EIIRDEFGND VVTLHDVSQA EVTDLNDYQY
 51 LIIGCPTWNI GELQSDWEGL YSELDDVDFN GKLVAIFYGTG DQIGYADNFQ
 101 DAIGILEEKI SQRGGKTVGY WSTDGYDFND SKALR**NGKFV GLALDEDNQS**
 151 **DLTDDRIKSW VAQLKSEFGL**

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
5 - 15	1184.5875	1183.5802	1183.6237	-0.0435	0	K.IGLFYGTQTGK.T (No match)
5 - 15	1184.5875	1183.5802	1183.6237	-0.0435	0	K.IGLFYGTQTGK.T (Ions score 81)
136 - 156	2322.0110	2321.0037	2321.0771	-0.0734	1	R.NGKFVGLALDEDNQSDLTDDR.I (No match)
136 - 156	2322.0110	2321.0037	2321.0771	-0.0734	1	R.NGKFVGLALDEDNQSDLTDDR.I (Ions score 11)
139 - 156	2022.8575	2021.8502	2021.9178	-0.0676	0	K.FVGLALDEDNQSDLTDDR.I (No match)
139 - 156	2022.8575	2021.8502	2021.9178	-0.0676	0	K.FVGLALDEDNQSDLTDDR.I (Ions score 134)
139 - 158	2264.0278	2263.0205	2263.0968	-0.0763	1	K.FVGLALDEDNQSDLTDDR.I.S (No match)
139 - 158	2264.0278	2263.0205	2263.0968	-0.0763	1	K.FVGLALDEDNQSDLTDDR.I.S (Ions score 110)
159 - 170	1364.6713	1363.6640	1363.7136	-0.0496	1	K.SWVAQLKSEFGL.- (No match)
159 - 170	1364.6713	1363.6640	1363.7136	-0.0496	1	K.SWVAQLKSEFGL.- (Ions score 69)

Datos referentes a la alícuota recogida durante el lavado de la columna:

Nominal mass (M_r): **19009**; Calculated pI value: **4.17**

NCBI BLAST search of [FLAV ANASO](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Nostoc sp. PCC 7119](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

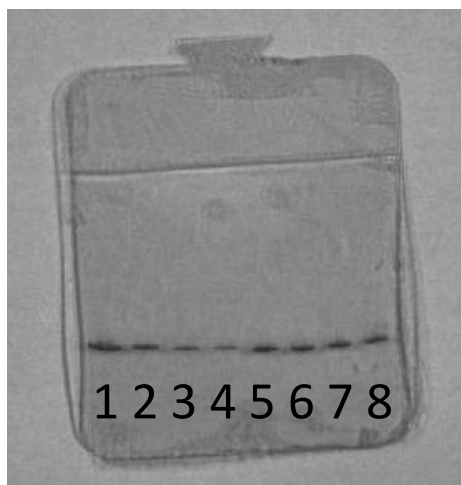
Sequence Coverage: **27%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MSKK**IGLFYGTQTGK**TESVA EIIRDEFGND VVTLHDVSQA EVTDLNDYQY
51 LIIGCPTWNI GELQSDWEGL YSELDDVDFN GKLVAIFYGTG DQIGYADNFQ
101 DAIGILEEKI SQRGGKTVGY WSTDGYDFND SKALR**NGKFV GLALDEDNQS**
151 **DLTDDRIKSW VAQLKSEFGL**

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
5 - 15	1184.5916	1183.5843	1183.6237	-0.0394	0	K.IGLFYGTQTGK.T (No match)
5 - 15	1184.5916	1183.5843	1183.6237	-0.0394	0	K.IGLFYGTQTGK.T (Ions score 72)
136 - 156	2322.0188	2321.0115	2321.0771	-0.0656	1	R.NGKFVGLALDEDNQSDLTDDR.I (Ions score 11)
139 - 156	2022.8680	2021.8607	2021.9178	-0.0571	0	K.FVGLALDEDNQSDLTDDR.I (No match)
139 - 156	2022.8680	2021.8607	2021.9178	-0.0571	0	K.FVGLALDEDNQSDLTDDR.I (Ions score 81)
139 - 158	2264.0330	2263.0257	2263.0968	-0.0711	1	K.FVGLALDEDNQSDLTDDRIK.S (No match)
139 - 158	2264.0330	2263.0257	2263.0968	-0.0711	1	K.FVGLALDEDNQSDLTDDRIK.S (Ions score 102)
159 - 170	1364.6749	1363.6676	1363.7136	-0.0460	1	K.SWVAQLKSEFGL.- (No match)
159 - 170	1364.6749	1363.6676	1363.7136	-0.0460	1	K.SWVAQLKSEFGL.- (Ions score 91)

Esto nos indica que habría un mal empaquetado de la columna, con el consiguiente eluido de la proteína cuando se realizó el lavado con el tampón sulfato de amonio.



Una vez obtenidas las proteínas, se determinó el grado de pureza mediante electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida, obteniéndose en cada caso una única banda a la altura esperada comparada con la apoflavodoxina silvestre de *Anabaena* PCC 7119 usada como control (figura 38).

Figura 38: Gel de poliacrilamida (PhastGel™ Gradient 8-25). Donde puede verse en los carriles: 1. WT, 2. I59A, 3. D100N, 4. A142V, 5. E20K/E72K/D126K (3M), 6. E20K/E72K/D126K/G87V, 7. E20K/E72K/D126K/D100N, 8. E20K/E72K/D126K/A142V.

4.2. Caracterización Espectroscópica

Se han obtenido espectros de absorbancia UV-Visible, emisión de fluorescencia y dicroísmo circular en el UV-cercano y lejano, para realizar una caracterización espectroscópica de los mutantes

de apoflavodoxina. Con estas técnicas podemos tener información relacionada con la integridad estructural de los mutantes.

4.2.1. Absorbancia UV-VIS

Esta caracterización espectroscópica se realizó al concluir el paso de Holo a Apo-flavodoxina, para poder calcular su concentración. A partir de los espectros (figura 39) se determinó la concentración de cada mutante a 280nm (Genzor *et al.*, 1996a) basándose en el coeficiente de extinción de la apoflavodoxina silvestre a esa longitud de onda ($34.1 \pm 0.5 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$).

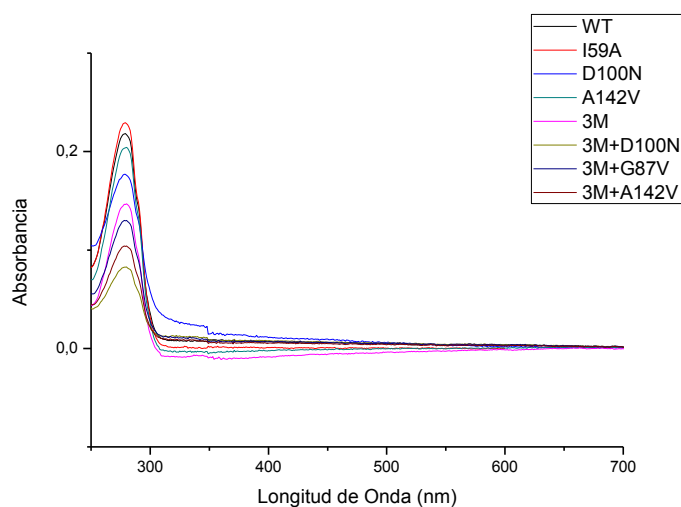


Figura 39: Espectros de Absorbancia de los mutantes estudiados al final del proceso de purificación

Se ve como se encuentran en la forma apoflavodoxina, ya que no presentan absorción en la zona donde se une el FMN a las proteína (figura 40).

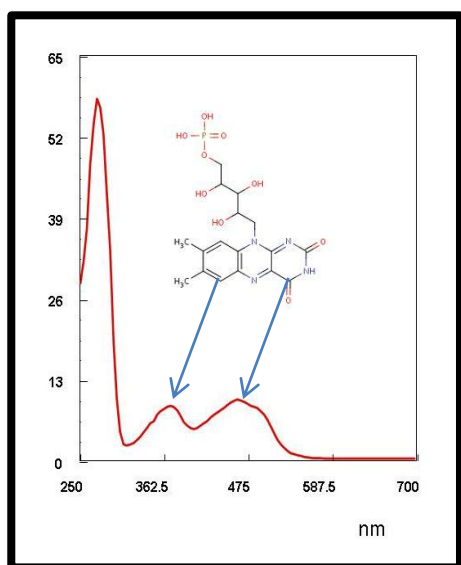


Figura 40: Espectro de absorbancia de la holoflavodoxina, se ven los picos característicos correspondientes al FMN, ausentes en el espectro de la apoflavodoxina.

4.2.2. Dicroísmo circular en el cercano

En la región del ultravioleta cercano, los cromóforos más importantes son los grupos aromáticos de las cadenas laterales de triptófano, tirosina, y fenilalanina. Ya que la asimetría en estos grupos químicos, se debe exclusivamente a su entorno y como los residuos aromáticos se encuentran distribuidos en toda la macromolécula, los espectros en esta región son un reflejo de la conformación global de la proteína. Además las señales en esta región son extremadamente sensibles a los cambios en la conformación (C. Gómez-Moreno, J. Sancho, 2003).

Si miramos con detalle el espectro de dicroísmo circular en el cercano a 25°C (figura 41) vemos una gran similitud entre la mayoría de las muestras, lo cual quiere decir que no ha habido un cambio de estructura, hay una similitud estructural.

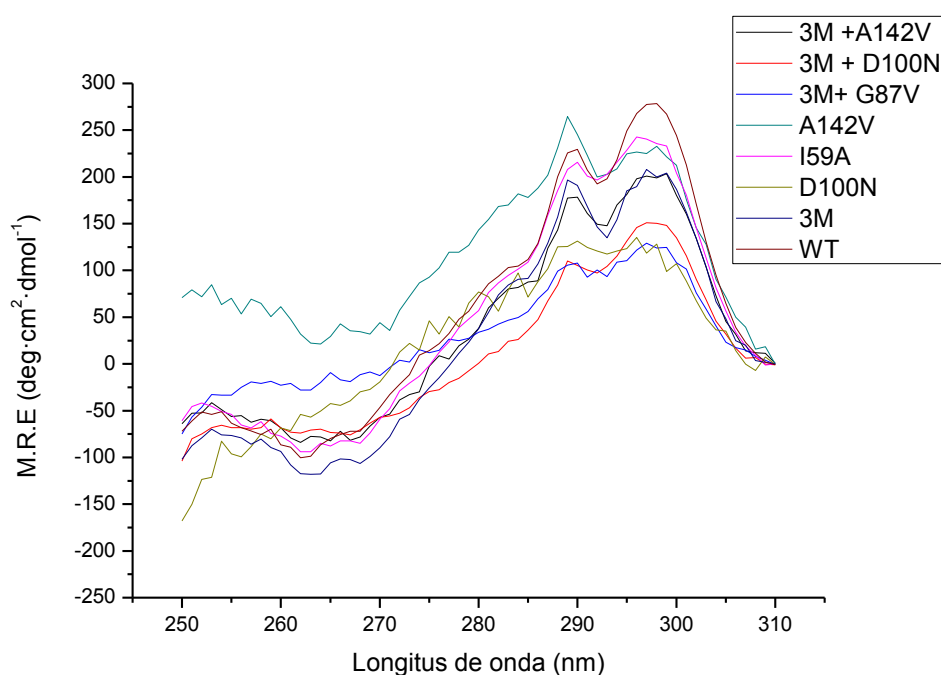


Figura 41: Espectros de dicroísmo circular en el cercano (DCC), 25 °C en MOPS 50 mM. pH 7.0 con una concentración de proteína de 20 μ M.

Se registró de igual manera el espectro de las apoflavodoxinas a una temperatura de 90°C, donde se puede observar como la estructura terciaria se ha perdido debido a la desnaturalización sufrida como consecuencia de estas condiciones de temperatura (figura 42).

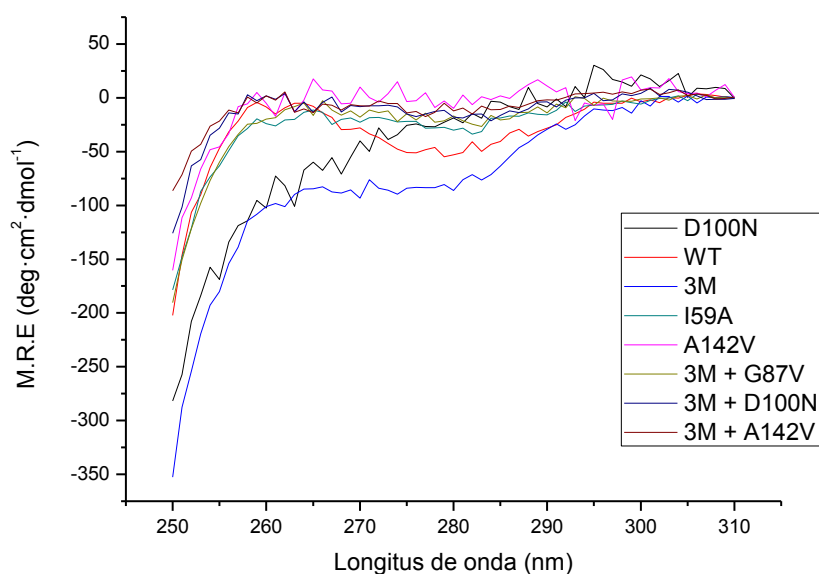


Figura 42: Espectros de dicroísmo circular en el cercano (DCC), 90 °C en MOPS 50 mM. pH 7.0 con una concentración de proteína de 20 μ M.

4.2.3. Dicroísmo circular en el lejano

Los espectros de dicroísmo en la región del ultravioleta lejano, se deben principalmente a los enlaces amida que unen los residuos de los aminoácidos entre sí. La asimetría de estos cromóforos se debe al arreglo espacial de la cadena principal de la proteína, por lo cual, las señales de dicroísmo circular se pueden interpretar en términos del contenido de estructura secundaria presentes, es decir, del porcentaje de residuos que se encuentran en alguna conformación estructural (hélices α , hojas β , giros y otros tipos estructurales).

Si miramos los espectros (figura 43) obtenido de las diferentes muestras vemos al igual que en el caso anterior una gran similitud entre ellas, con lo cual no ha ocurrido una modificación estructural como resultado de las mutaciones.

Los mutantes mostraron la misma forma en los espectros comparados con las proteínas de partida lo que sugiere la conservación de la estructura e interacciones entre sus residuos.

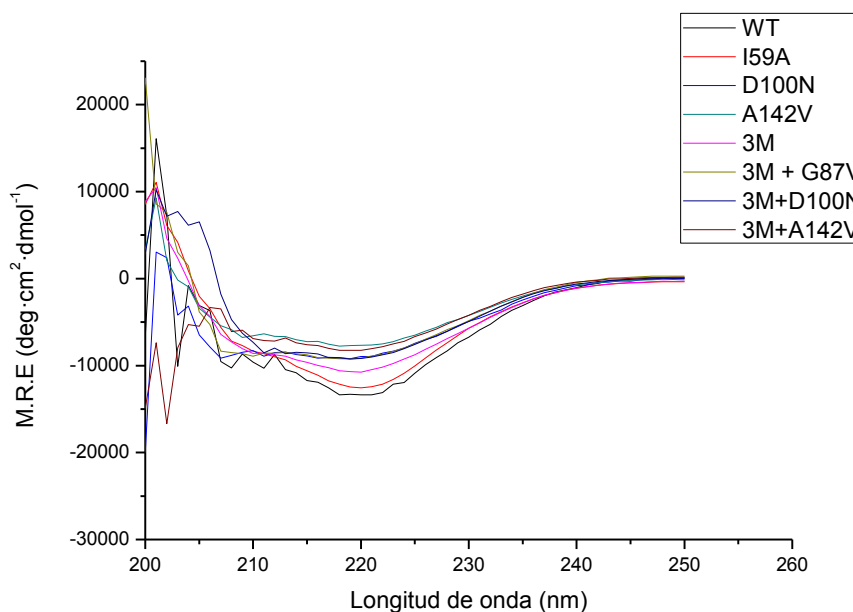


Figura 43: Espectros de dicroísmo circular en el lejano (DCL), 25 °C en MOPS 5 mM. NaCl 15mM pH 7.0 con una concentración de proteína de 20μM.

Se registró de igual manera el espectro de las apoflavodoxinas a una temperatura de 90°C, donde se puede observar como la estructura terciaria se ha perdido debido a la desnaturalización sufrida como consecuencia de estas condiciones de temperatura (figura 44).

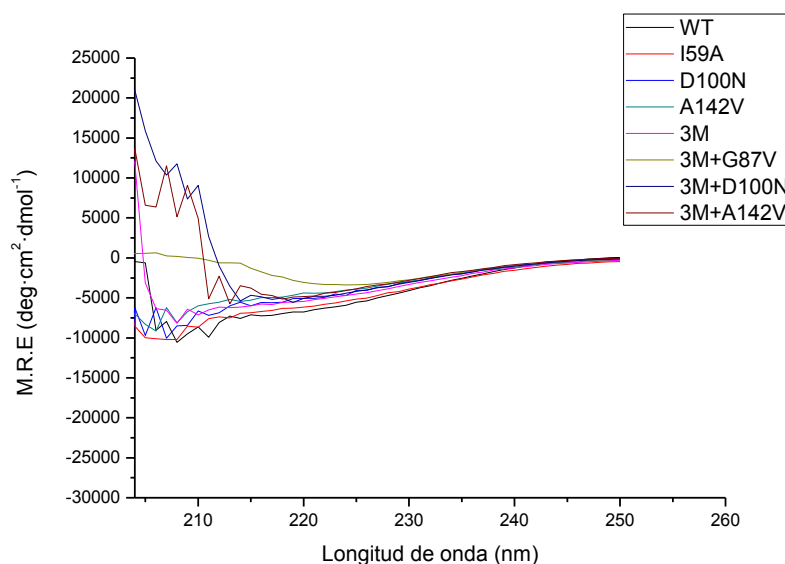


Figura 44: Espectros de dicroísmo circular en el lejano (DCL), 95 °C en MOPS 5 mM. NaCl 15mM pH 7.0 con una concentración de proteína de 20μM.

4.2.4. Emisión de fluorescencia

El triptófano aporta normalmente la mayor parte de la señal de fluorescencia de las proteínas y presenta un máximo de emisión de fluorescencia ≈ 355 nm en el estado libre, mientras que en una proteína aparece a valores menores, dependerá del entorno en el que encuentre. Los espectros obtenidos para las proteínas diseñadas se pueden ver en la figura 45.

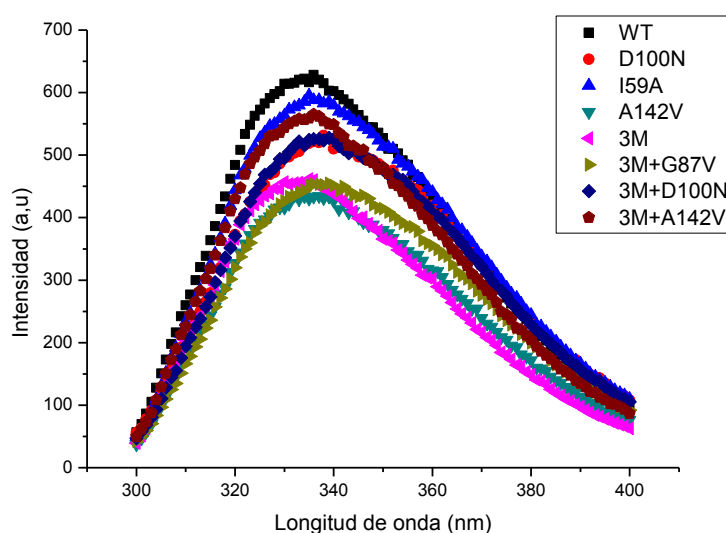


Figura 45: Espectros de emisión de fluorescencia. $2\mu\text{M}$ de proteína, 50mM MOPS pH 7, 25°C .

Se registró de igual manera el espectro de las apoflavodoxinas a una temperatura de 90°C (figura 46), donde se puede observar como la estructura terciaria se ha perdido debido a la desnaturalización sufrida como consecuencia de estas condiciones de temperatura, puede verse de manera muy clara en la tabla 2.

	WT	I59A	D100N	A142V	3M	3M+G87V	3M+D100N	3M+A142V
$\lambda_{\text{max. } 25^{\circ}\text{C}} \text{ (nm)}$	336	337	338	337	335	339	337	336
$\lambda_{\text{max. } 90^{\circ}\text{C}} \text{ (nm)}$	354	356	354	353	353	352	353	353

Tabla 2: Longitudes de onda donde la emisión de fluorescencia es máxima a 25°C y a 90°C .

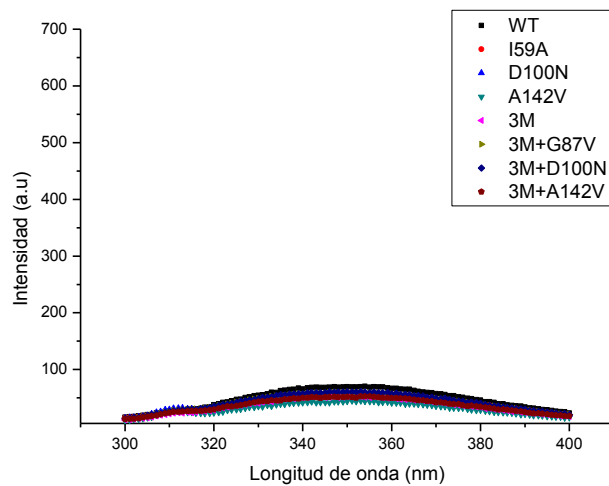


Figura 46: Espectros de emisión de fluorescencia. 2 μ M de proteína, 50mM MOPS pH 7, 90°C.

4.3. Desnaturalización Química por Urea.

La estabilidad de las 8 proteínas fue analizada mediante desnaturalización en equilibrio con urea. Las proteínas se agrupan claramente en dos, dependiendo de la proteína de partida para su diseño, se representaran por un lado todas las proteínas (figura 47) y por otro lado las proteínas basadas en triple mutante (figura 48). Las gráficas del ajuste de cada uno de los mutantes así como el de sus replicas, pueden verse en el apéndice. Si la curva se encuentra desplazada hacia la derecha corresponderá con mutaciones estabilizantes, mientras que si se desplaza hacia la izquierda serán desestabilizantes.

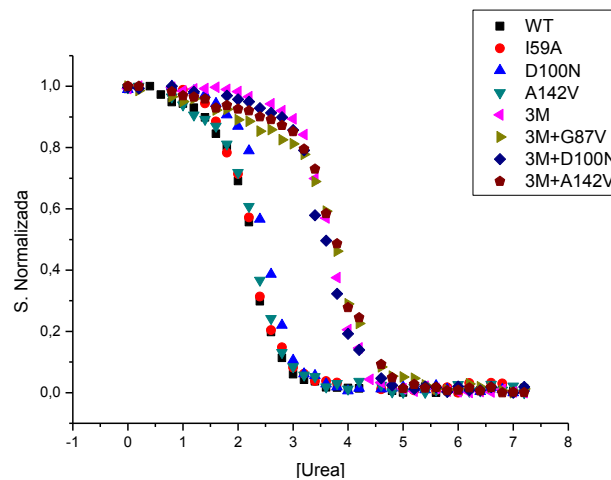


Figura 47: Curvas de desnaturalización con Urea. Análisis para mutantes respecto a WT. Las condiciones de ensayo se encuentran descritas en Materiales y Métodos.

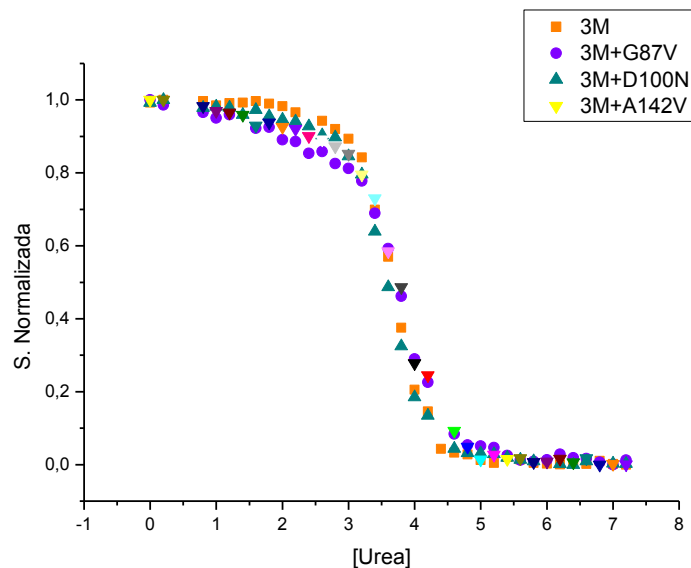


Figura 48: Curvas de desnaturalización con Urea. Análisis para mutantes respecto al triple mutante 3M. Las condiciones de ensayo se encuentran descritas en Materiales y Métodos.

Las curvas fueron ajustadas con el programa Origin a un modelo de 2 estados obteniéndose valores de m y U_m . Se realizó una comparación de todos los mutantes frente a la WT para saber como el total de las mutaciones de cada uno de ellos estabilizaba o no frente a la WT (tabla 3 y figura 49); de igual manera se hizo una comparación de los cuádruples mutantes frente al triple de referencia para ver como actuaba la mutación introducida frente a la referencia (tabla 4 y figura 50).

Tabla 3: Estabilidad de mutantes de apoflavodoxina comparada con WT, medidas por desnaturalización con urea.

Proteína	m^a (Kcal/mmmol.m)	U_m (M)	$\Delta\Delta G^c$ (kcal/mol)
WT	$2,23 \pm 0,12$	$2,29 \pm 0,014$	---
I59A	$2,51 \pm 0,078$	$2,48 \pm 0,01$	$-0,21 \pm 0,014$
D100N	$2,26 \pm 0,15$	$2,26 \pm 0,024$	$0,91 \pm 0,026$
A142V	$2,47 \pm 0,14$	$2,31 \pm 0,019$	$0,303 \pm 0,023$
3M	$2,29 \pm 0,01$	$3,69 \pm 0,008$	$-2,42 \pm 0,0205$
3M+G87V	$2,12 \pm 0,1$	$3,84 \pm 0,016$	$-2,13 \pm 0,022$
3M+D100N	$2,17 \pm 0,09$	$3,61 \pm 0,015$	$-1,80 \pm 0,018$
3M+A142V	$2,16 \pm 0,11$	$3,96 \pm 0,017$	$-2,32 \pm 0,025$

^{a)} Los valores de m y de U_m son la media de dos medidas calculados por ajuste de curvas de desnaturalización en un modelo de dos estados, con \pm SE

$$SE = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

^{b)} ΔG calculado como $\Delta G = m \times U_m$, y el error mediante propagación de errores de m y de U_m con la ecuación $\delta(\Delta G) = \Delta G \times \left(\sqrt{\left(\frac{\delta m}{m}\right)^2 + \left(\frac{\delta(U_m)}{U_m}\right)^2} \right)$

^{c)} $\Delta\Delta G$ calculado como $\Delta\Delta G = m(wt) \times U_{m(wt)} - m(mut) \times U_{m(mut)} = \Delta G^c(wt) - \Delta G^c(mut)$. Los errores fueron calculados por propagación de m y de U_m . $\delta\Delta\Delta G = \sqrt{(\delta\Delta G^2) + (\delta\Delta G^2)}$

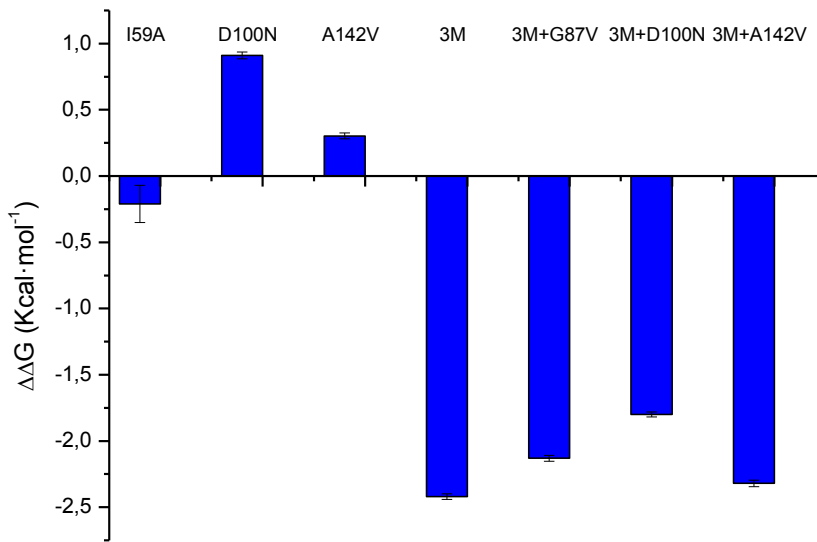


Figura 49: Gráfico que representa la estabilidad de cada mutante comparada con la WT, valores positivos corresponden con desestabilización mientras que valores negativos corresponde con estabilización. Las barras negras corresponden a los errores.

Tabla 3: Estabilidad de mutantes de apoflavodoxina comparada con 3M, medidas por desnaturalización con urea.

Proteína	m (Kcal/mol.m) ^a	U _m (M)	ΔΔG (kcal/mol) ^c
3M	2,29±0,01	3,69±0,008	----
3M+G87V	2,12±0,1	3,84±0,016	0,294±0,024
3M+D100N	2,17±0,09	3,61±0,015	0,621±0,021
3M+A142V	2,16±0,11	3,96±0,017	0,103±0,027

^{a)} Los valores de m y de U_m son la media de dos medidas calculados por ajuste de curvas de desnaturalización en un modelo de dos estados, con \pm SE $SE = \frac{SD}{\sqrt{n}}$

^{b)} ΔG calculado como $\Delta G = m \times U_m$, y el error mediante propagación de errores de m y de U_m con la ecuación $\delta(\Delta G) = \Delta G \times \left(\sqrt{\left(\frac{\delta m}{m}\right)^2 + \left(\frac{\delta(U_m)}{U_m}\right)^2} \right)$

^{c)} $\Delta\Delta G$ calculado como $\Delta\Delta G = m(wt) \times U_{m(wt)} - m(mut) \times U_{m(mut)} = \Delta G^c(wt) - \Delta G^c(mut)$. Los errores fueron calculados por propagación de m y de U_m . $\delta\Delta\Delta G = \sqrt{(\delta\Delta G^2) + (\delta\Delta G^2)}$

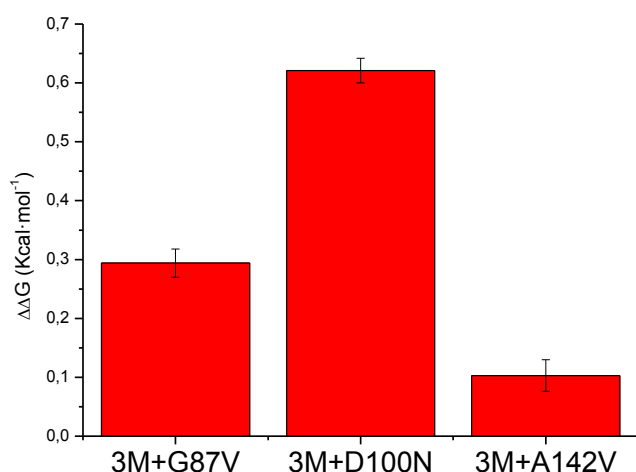


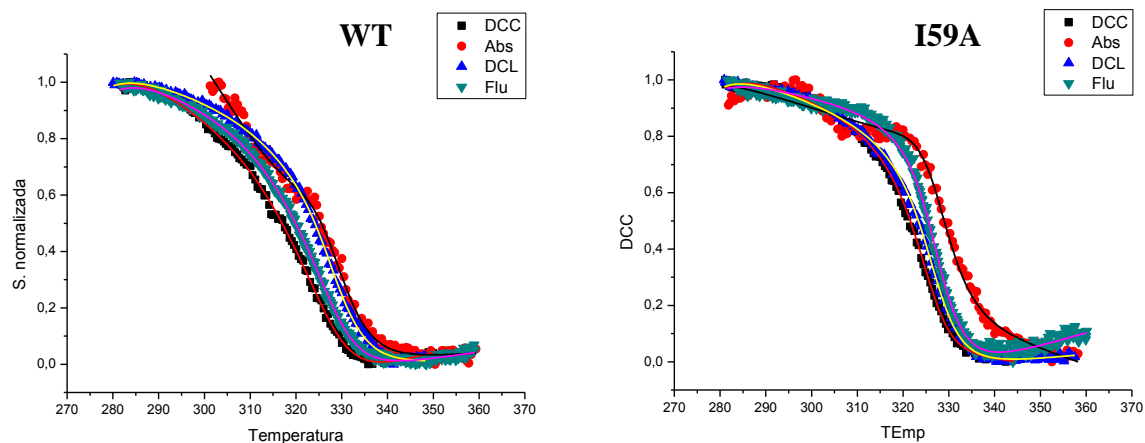
Figura 50: Gráfico que representa la estabilidad de los cuádruples mutantes comparados con el 3M, valores positivos corresponden con desestabilización mientras que valores negativos corresponde con estabilización. Las barras negras representan los errores.

4.4. Desnaturalización Térmica

Una forma de tener alguna pista sobre la existencia de un intermediario en un equilibrio de desnaturalización es por la no superposición de las diferentes curvas de desnaturalización térmica (Campos *et al.*, 2004). Como anteriormente ha sido comentado, la flavodoxina de *Anabaena* presenta un intermediario térmico (Irún *et al.*, 2001), por lo que su desnaturalización ocurre por un proceso de 3 estados.

4.4.1. Ajuste a un modelo de 3 estados

Se realizó un ajuste global de las cuatro técnicas espectroscópicas narradas anteriormente en materiales y métodos, se realizaron ajustes de todas las proteínas de estudio a un modelo de 3 estados (Nativo-Intermediario-Desnaturalizado) (figura 51). Obteniéndose gráficas para todas aquellas proteínas que cumplían estas transiciones. Los ajustes fueron realizados como se describe en materiales y métodos.



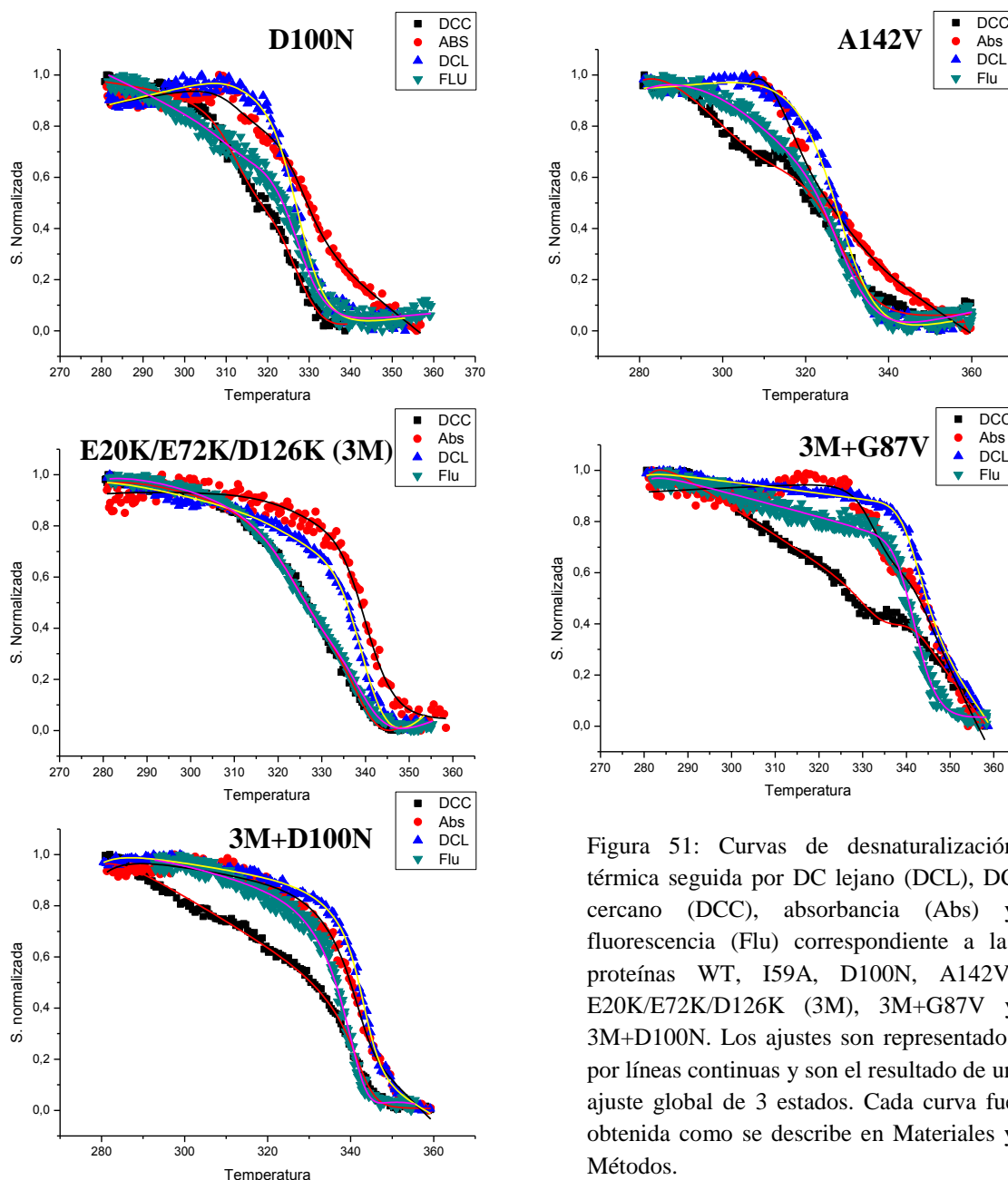


Figura 51: Curvas de desnaturalización térmica seguida por DC lejano (DCL), DC cercano (DCC), absorbancia (Abs) y fluorescencia (Flu) correspondiente a las proteínas WT, I59A, D100N, A142V, E20K/E72K/D126K (3M), 3M+G87V y 3M+D100N. Los ajustes son representados por líneas continuas y son el resultado de un ajuste global de 3 estados. Cada curva fue obtenida como se describe en Materiales y Métodos.

Las curvas fueron ajustadas con el programa Origin (previo ajuste con el programa MLAB) a un modelo de 3 estados obteniéndose valores de T_m , ΔH y ΔC_p . Se realizó una comparación de todos los mutantes frente a la WT para saber como el total de las mutaciones de cada uno de ellos estabilizaba o no frente esta (tabla 4 y figura 52); de igual manera se hizo una comparación de los cuádruples mutantes frente al triple de referencia para ver como actuaba la mutación introducida frente a la de referencia (3M) (tabla 5 y figura 53).

Tabla 4: Estabilidad de los mutantes de apoflavodoxina comparados con la WT. Estudio de desnaturalización térmica.

Proteína	T _{mNI} (K)	T _{mIU} (K)	T _{mIU} (K) - T _{mNI} (K)	$\Delta\Delta G_{NI}^a$ (kcal·mol ⁻¹)	$\Delta\Delta G_{IU}^a$ (kcal·mol ⁻¹)	$\Delta\Delta G_{NU}^b$ (kcal·mol ⁻¹)
WT	318,54±0.08	328,98±0.05	10.44	---	---	---
I59A	323,24±0.13	328,42±0.09	5.18	-0.64±0.08	-0,036±0.5	-0,68±0,095
D100N	311,56±0,196	327,31±0,063	15,75	1,22±0,25	0,14±0,04	1,36±0,25
A142V	303,66±0,2	327,86±0,06	24,2	1,22±0,25	0,14±0,04	1,2±0.25
3M	323,2±0.08	340,1±0,05	16,9	-0,54±0,045	-2,62±0,064	-3,16±0,08
3M+G87V	331,97±0,19	341,89±0,065	9,92	-3,25±0,64	-4,28±0,12	-7,53±0,65
3M+D100N	341,15±0,09	342,94±0,18	2,84	-3,29±0,28	-4,86±0,45	-8,14±0,53

a) ΔG_{NI} y ΔG_{IU} fue calculado siguiendo la ecuación $\Delta G = \Delta H \cdot \left(1 - \frac{T}{T_m}\right)$ (como T usaremos 318,54) y los errores como

$$\delta(\Delta G) = \Delta G \cdot \left(\sqrt{\left(\frac{\delta\Delta H}{\Delta H}\right)^2 + \left(\frac{T \cdot \delta(T_m)}{(T_m - T) \cdot T_m}\right)^2} \right)$$

$\Delta\Delta G_{NI}$ fue calculado por la $\Delta\Delta G = \Delta G_{WT} - \Delta G_{MUT}$ y los errores como $\delta\Delta\Delta G = \sqrt{(\delta\Delta G_{WT})^2 + (\delta\Delta G_{MUT})^2}$

b) $\Delta\Delta G_{NU}$ fue calculado siguiendo la ecuación $\Delta\Delta G_{NU} = \Delta\Delta G_{NI} + \Delta\Delta G_{IU}$ y los errores como $\delta\Delta\Delta G_{NU} = \sqrt{(\delta\Delta\Delta G_{NI})^2 + (\delta\Delta\Delta G_{IU})^2}$

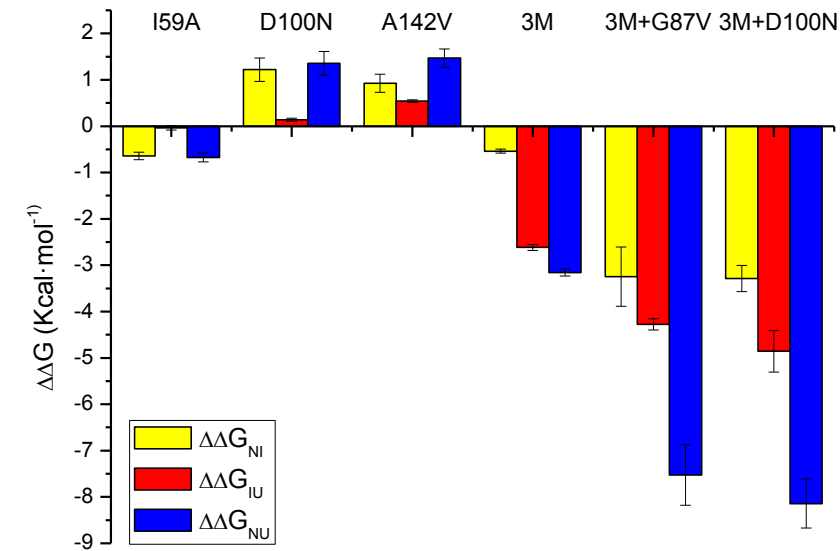


Figura 52: El gráfico que representa la estabilidad de los mutante que se ajustan a un modelo de 3 estados, comparados con la WT. Valores positivos corresponden con desestabilización, mientras que valores negativos corresponde con estabilización. Las barras negras corresponden a los

Tabla 5: Estabilidad de los cuádruples mutantes de apoflavodoxina comparados con el 3M. Estudio de desnaturalización térmica.

Proteína	T _{mNI} (K)	T _{mIU} (K)	T _{mIU} - T _{mNI}	$\Delta\Delta G_{NI}^a$ (kcal·mol ⁻¹)	$\Delta\Delta G_{IU}^a$ (kcal·mol ⁻¹)	$\Delta\Delta G_{NU}^b$ (kcal·mol ⁻¹)
3M	323,2±0,08	340,1±0,05	16,9	---	---	---
3M+G87V	331,97±0,19	341,89±0,065	9,92	-2,12±0,42	-1,40±0,11	-3,52±0,43
3M+D100N	341,15±0,09	342,94±0,18	2,84	-2,61±0,22	-1,92±0,36	-4,53±0,43

^{a)} ΔG_{NI} y ΔG_{IU} fue calculado siguiendo la ecuación $\Delta G = \Delta H \cdot \left(1 - \frac{T}{T_m}\right)$ (como T usaremos 323.2) y los errores como

$$\delta(\Delta G) = \Delta G \cdot \left(\sqrt{\left(\frac{\delta\Delta H}{\Delta H}\right)^2 + \left(\frac{T \cdot \delta(T_m)}{(T_m - T) \cdot T_m}\right)^2} \right)$$

$\Delta\Delta G_{NI}$ fue calculado por la $\Delta\Delta G = \Delta G_{WT} - \Delta G_{MUT}$ y los errores como $\delta\Delta\Delta G = \sqrt{(\delta\Delta G_{WT})^2 + (\delta\Delta G_{MUT})^2}$

^{b)} $\Delta\Delta G_{NU}$ fue calculado siguiendo la ecuación $\Delta\Delta G_{NU} = \Delta\Delta G_{NI} + \Delta\Delta G_{IU}$ y los errores como $\delta\Delta\Delta G_{NU} = \sqrt{(\delta\Delta\Delta G_{NI})^2 + (\delta\Delta\Delta G_{IU})^2}$

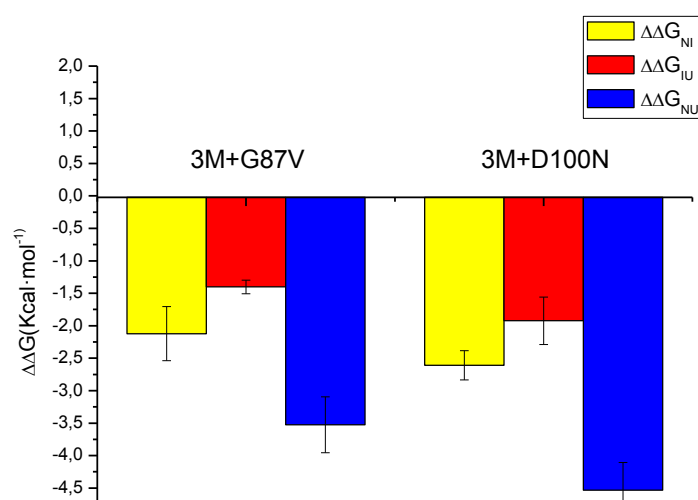


Figura 53: El gráfico representa la estabilidad de los cuádruples mutantes que se ajustan a un modelo de 3 estados, comparados frente al 3M. Valores positivos corresponden con desestabilización mientras que valores negativos corresponde con estabilización. Las barras negras corresponden a los errores.

4.4.2. Ajuste a un modelo de 2 estados

Se observaron proteínas que o no se ajustan a un modelo de 3 estados (3M+A142V) o lo hacían dejando muy poca separación entre las T_m (3M+D100N). Para ver si las mutaciones introducidas habían conseguido la obtención de una flavodoxina mutante en la que ya no se poblara el estado intermediario, se realizó un Test de dos estados.

Para poder comprobar que la mutación diseñada cumple los requisitos adecuados, se debe realizar un test de dos estados como comprobación. Este test de 2 estados consiste en:

- Análisis por técnicas espectroscópicas, las curvas serán superponibles.
 - (DCC, DCL, Absorbancia y Fluorescencia).
- Calorimetría diferencial de barrido.

Para que una proteína se ajuste a un modelo de 2 estados debe cumplir: Superposición de curvas obtenidas con distintas técnicas espectroscópicas (es una condición necesaria pero no suficiente) y transición de dos estados implica total cooperatividad (ausencia de otros estados parcialmente plegados, intermediarios).

4.4.2.1. Análisis mediante Técnicas Espectroscópicas

Dado que se obtiene, para la misma proteína, cada una de las curvas se obtiene por técnicas espectroscópicas diferentes, han de ser normalizadas para equiparar el peso de cada una de ellas en el ajuste global (para obtener parámetros comunes que caractericen el proceso de desplegamiento) y facilitar así su análisis obteniendo amplitudes aparentes de aproximadamente 1. Se usará como proteína de referencia el 3M ya que en esta están basadas ambas proteínas sobre este triple mutante.

Las técnicas espectroscópicas fueron analizadas mediante un ajuste global a un modelo de 2 estados usando el programa Origin. (Figura 54).

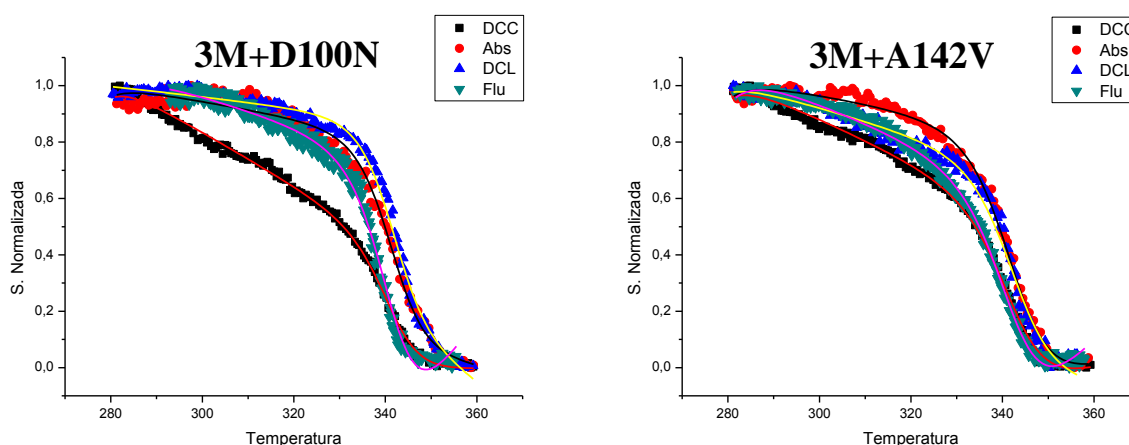


Figura 54: Curvas de desnaturalización térmica seguida por DC lejano (DCL), DC cercano (DCC), absorbancia (Abs) y fluorescencia (Flu) correspondiente a las proteínas 3M+D100N y 3M+A142V. Los ajustes son representados por líneas continuas y son el resultado de un ajuste global de 2 estados. Cada curva fue obtenida como se describe en Materiales y Métodos.

Cuando un proceso de desnaturalización se ajusta a un modelo de 2 estados, se produce un solapamiento de las curvas espectroscópicas obtenidas condición necesaria pero no suficiente.

Con el ajuste realizado usando el programa Origin se obtuvieron los datos reflejados en la tabla 6.

Tabla 6: Valores obtenidos por técnicas espectroscópicas del mutante 3M (ajusta a un modelo de 3 estados) y de los mutantes 3M+D100N y 2M+A142V (ajustados a un modelo de 2 estados).

Proteína	Técnica	T _{m1} (K)	ΔH_1 (Kcal/mol)	T _{m2} (K)	ΔH_2 (Kcal/mol)	ΔG_{Total} (Kcal/mol)
3M	Espectroscopia	323,2±0,08	37,47±0,46	340,1±0,05	69,70±0,91	---
3M+D100N	Espectroscopia	---	---	340,77±0,21	57,41±1,16	-0,113±0,013
3M+A142V	Espectroscopia	---	---	340,90±0,24	52,36±0,97	-0,94±0,02

^{a)} ΔG_{NI} y ΔG_{IU} fue calculado siguiendo la ecuación $\Delta G = \Delta H \cdot \left(1 - \frac{T}{T_m}\right)$ (como T usaremos 323.2) y los errores como

$$\delta(\Delta G) = \Delta G \cdot \left(\sqrt{\left(\frac{\delta\Delta H}{\Delta H}\right)^2 + \left(\frac{T \cdot \delta(T_m)}{(T_m - T) \cdot T_m}\right)^2} \right)$$

$\Delta\Delta G_{NI}$ fue calculado por la $\Delta\Delta G = \Delta G_{WT} - \Delta G_{MUT}$ y los errores como $\delta\Delta\Delta G = \sqrt{(\delta\Delta G_{WT})^2 + (\delta\Delta G_{MUT})^2}$

^{b)} $\Delta\Delta G_{NU}$ fue calculado siguiendo la ecuación $\Delta\Delta G_{NU} = \Delta\Delta G_{NI} + \Delta\Delta G_{IU}$ y los errores como $\delta\Delta\Delta G_{NU} = \sqrt{(\delta\Delta\Delta G_{NI})^2 + (\delta\Delta\Delta G_{IU})^2}$

4.4.2.2. Análisis mediante Calorimetría Diferencial de Barrido

Los datos obtenidos por calorimetría diferencial de barrido (DSC) de las proteínas 3M, 3M+D100N y 3M+A142V están reflejados en la tabla 7.

Tabla 7: Valores obtenidos por calorimetría diferencial de barrido de los mutantes 3M, 3M+D100N y 3M+A142V.

Proteína	T _m aparente (K)	ΔH_{cal} (cal/mol)	C _p _{max} (cal/K·mol)	ΔH_{VH} (cal/mol)	$\Delta H_{VH} / \Delta H_{cal}$
3M	341,35	72.800	4350	55340	0.76
3M+D100N	341,75	77.800	6170	73600	0.95
3M+A142V	342,6	70.800	5560	73.300	1.04

5. Discusión

Los resultados presentados en este trabajo fin de Máster están de acuerdo con los objetivos concretos planteados, como también a nivel de objetivos a largo plazo del grupo.

5.1. Cultivo y purificación

Se sobre expresaron, cultivaron y purificaron todas las proteínas referidas en este trabajo, un total de 8, la WT y 7 mutantes. Cabe destacar el comportamiento anómalo de coloración presentado por dos mutantes: D100N (figura 35) y E20K/E72K/D126K/G87V (figura 36). Esta falta de coloración independientemente de hacer más complicada su purificación (no presentan una coloración que se pueda usar como referencia), nos indica que no unen o lo hace en una pequeña proporción el cofactor FMN; con lo cual aunque nos aportarán luz sobre su estabilidad y el diseño de mutaciones racionales, no podría hacerse con ellos un estudio posterior de unión al cofactor o de actividad biológica, si se hubiera conseguido con estas mutaciones despoblar el intermediario térmico.

Las proteínas estudiadas se obtuvieron con un alto grado de pureza tras el proceso de purificación como indica la figura 38 (obtención de una única banda para cada una de ellas) y en la forma apoflavodoxina como se puede ver en la figura 39 (no aparecen los picos de absorción característicos del FMN en ninguno de los espectros de absorción).

5.2. Caracterización Espectroscópica

5.2.1. Espectros de absorbancia UV-Visible

Los espectros de absorbancia además de ser útiles para conocer la concentración de nuestras proteínas de estudio y comprobar que están en la forma apoflavodoxina, sirven como un método sencillo de detección de casos de agregación proteica. Si miramos detenidamente los espectros de absorción obtenidos (figura 39), se observa como a partir de 320nm su espectro es completamente plano para todas las proteínas excepto para el mutante D100N; no habrá problemas de agregación. En el caso del mutante D100N se observa que cuando se aproxima a longitudes de onda más pequeñas deja de ser plana y asciende, debido a la dispersión de la luz que provocan las partículas de agregados. Para calcular su concentración y no sobrestimar excesivamente la concentración, debemos sustraer la línea base.

Si medimos cualquier propiedad cuyo valor no dependa de la concentración de muestra (cualquier propiedad de las denominadas intensivas: coeficientes de extinción, temperatura de desnaturalización...). Como la estabilidad conformacional es una propiedad molecular que no depende, en principio, de la concentración de proteína (cada molécula se desnaturaliza sin mediación de las otras moléculas de proteína de la solución) se deberá obtener siempre la misma temperatura media de desnaturalización. Si fuera destinada a hacer cristalización o análisis de RMN habría sido descartada (C. Gómez-Moreno, J. Sancho, 2003).

Todos los experimentos realizados en este trabajo se han hecho por duplicado, obteniendo para cada una de ellas valores reproducibles, debido a esto se realizó tanto el análisis conformacional como espectroscópico del mutante D100N (datos mostrados en resultados) pese al espectro de absorción registrado.

5.2.2. Espectros de dicroísmo circular en el cercano

Los espectros de dicroísmo circular en el cercano a 25°C (figura 41) nos dan una idea de cómo es su estructura terciaria, hay una gran similitud entre ellos, con la excepción de los mutantes A142V y D100N, denotando con esto que presentan una conformación terciaria similar. En el caso del mutante A142V se ve como se invierte el tamaño de los picos comprado con la WT y el resto de mutantes, el pico de la izquierda es de mayor altura que el de la derecha (figura 55). Respecto al mutante D100N se ve como presenta mas bien una meseta en la zona entre 280-300nm (figura 56), dándonos una información al igual que en caso anterior de que ambos mutantes presentan una estructura terciaria diferente a la proteína modelo.

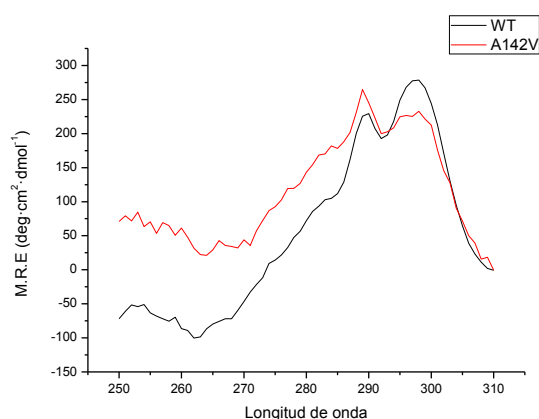


Figura 55: Espectro de dicroísmo circular en el cercano del mutante A142V y la WT a 25°C en MOPS 50mM pH 7 con una concentración de proteína de 20µM.

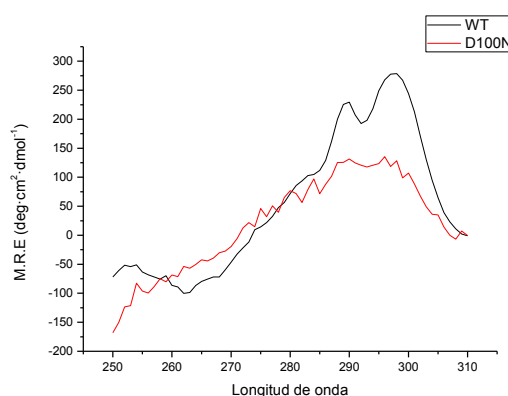


Figura 56: Espectro de dicroísmo circular en el cercano del mutante D100N y la WT a 25°C en MOPS 50mM pH 7 con una concentración de proteína de 20µM.

Los espectros de dicroísmo circular en el cercano a 90°C (figura 42) nos demuestran que a una temperatura de 90°C las proteínas no presentan una estructura terciaria, se encuentran desnaturalizadas todas ellas.

5.2.3. Espectros de dicroísmo circular en el lejano

Los espectros de dicroísmo circular en el lejano a 25°C (figura 43) nos muestran una gran similitud en todos ellos, observando el mismo esquema en todos con un mínimo entorno a 200nm; como consecuencia todos tendrán una similar estructura secundaria.

Los espectros de dicroísmo circular en el lejano a 90°C (figura 44) nos demuestran que a una temperatura de 90°C las proteínas no presentan una estructura secundaria, se encuentran desnaturalizadas todas ellas presentando un mismo patrón.

5.2.4. Espectros de emisión de fluorescencia

La emisión de fluorescencia nos da una idea de si una proteína presenta una conformación compacta o esencialmente desplegada.

Los espectros de emisión de fluorescencia a 25°C (figura 45) presentan un comportamiento similar, con unos valores de λ_{max} similares entre ellos (tabla 1), aunque con algunas diferencias en la anchura de los picos, esto denota que el entorno que ocupan los aminoácidos aromáticos no es exactamente igual en todas ellas.

Los espectros de emisión de fluorescencia a 90°C (figura 46) nos demuestran que a una temperatura de 90°C las proteínas no presentan una estructura secundaria, se encuentran desnaturalizadas todas ellas presentando un mismo patrón. Presentan una conformación desplegada ya que los valores de λ_{max} se desplazan al rango entre 350-355nm (tabla 1); esto se debe a que los aminoácidos aromáticos están completamente expuestos al solvente y no formando parte de una conformación compacta.

5.3. Desnaturalización Química por Urea

El estudio conformacional mediante desnaturalización química por Urea, presenta un proceso que se ajusta a un modelo de 2 estados a diferencia de la desnaturalización térmica que se ajusta a un modelo de 3 estados debido a la existencia de un intermediario térmico. La apoflavodoxina en concreto presenta una emisión de fluorescencia del estado nativo mayor a la del estado desnaturalizado (Genzor et al., 1996a).

Se hicieron comparaciones de todos los mutantes frente a la WT, con el fin de saber como variaba la estabilidad del proceso con respecto a ella. Con estas comparaciones se puede sacar información de cómo actúan las mutaciones de los mutantes simple (llevan una sola mutación) pero no se puede saber cual es el comportamiento de los cuádruples, ya que hay 4 mutaciones comparada con la WT y lo que se verá es como el conjunto de todas ellas afecta a la estabilidad (figura 47 y tabla 3). Para poder saber como afecta la cuarta mutación introducida sobre la base del triple mutante, se realiza una comparación frente a este, de esta manera si que sabré como afecta esa mutación de manera individual (figura 48 y tabla 4).

Las comparaciones se realizan mirando las $\Delta\Delta G$ (ec.5.3.1), comparando la variación de Energía libre de Gibbs entre el mutante y la WT o proteína de referencia. Valores negativos nos indicarán una estabilización, mientras que valores positivos nos indicarán una desestabilización del proceso.

$$\text{ec.5.3.1.} \quad \Delta\Delta G = m(wt) \times U_{m(wt)} - m(mut) \times U_m(mut)$$

Comparaciones frente a la WT:

- Mutante I59A estabiliza, la mutación I59A es estabilizante.
- Mutante D100N desestabiliza, la mutación D100N es desestabilizante.
- Mutante A142V desestabiliza, la mutación A142V es desestabilizante.
- Mutante E20K/E72K/D126K o 3M estabiliza, el conjunto de mutaciones son estabilizantes.
- Mutante 3M+G87V estabiliza, el conjunto de mutaciones son estabilizantes.
- Mutante 3M+D100N estabiliza, el conjunto de mutaciones son estabilizantes.
- Mutante 3M+A142V estabiliza, el conjunto de mutaciones son estabilizantes.

Cabe destacar que las mutaciones que desestabilizan el proceso, son las mismas que presentaban un comportamiento diferente en los espectros de dicroísmo circular en el cercano a 25°C (figuras 55 y 56).

Comparaciones frente al 3M (E20K/E72K/D126K):

- Mutante 3M+G87V desestabiliza, la mutación G87V es desestabilizante
- Mutante 3M+D100N desestabiliza, la mutación D100N es desestabilizante
- Mutante 3M+A142V desestabiliza, la mutación A142V es desestabilizante

En esta comparación se ve el efecto concreto de la nueva mutación introducida sobre el entorno del triple mutante, puede ser desestabilizante comparada frente a este, pero el conjunto de las 4 mutaciones puede ser estabilizante frente a la WT.

5.4. Desnaturalización Térmica

5.4.1. Ajuste a un modelo de 3 estados

Como anteriormente se ha comentado, la flavodoxina de *Anabaena* presenta un intermediario térmico (Irún *et al.*, 2001), por lo que su desnaturalización sigue un proceso de 3 estados. El objetivo que se plantea el grupo a largo plazo es la obtención de una flavodoxina mutante en la que ya no se pueble el intermediario.

Se ha realizado un análisis y ajuste global de las curvas de desnaturalización térmica obtenidas por cuatro técnicas espectroscópicas diferentes para las 8 proteínas de estudio, ajustándose a un modelo de 3 estado solo 7 de ellas.

Se trabajo de manera similar a lo realizado con la desnaturalización térmica, se hizo una comparación de todas frente a la WT para ver como el conjunto de las mutaciones que portaban afectaban a la estabilidad del proceso, y para poder saber como afecta la cuarta mutación introducida sobre la base del triple mutante, se realizó una comparación frente a este, de esta manera se sabrá como afecta esa mutación de manera individual a la estabilidad del proceso.

Comparaciones frente a la WT (tabla 4 y figura 52):

- Mutante I59A: estabilidad residual, relevante y total estabilizadas. La primera T_m se ha desplazado notablemente a temperaturas mayores y la segunda T_m apenas ha variado, disminuyendo así el rango de temperatura donde puebla el intermediario térmico.
- Mutante D100N: estabilidad residual, relevante y total desestabilizadas. La primera T_m se ha desplazado a temperaturas menores y la segunda T_m apenas ha variado, aumentando así el rango de temperatura donde puebla el intermediario térmico.
- Mutante A142V: estabilidad residual, relevante y total desestabilizadas. La primera T_m se ha desplazado considerablemente a temperaturas menores y la segunda T_m apenas ha variado, aumentando así el rango de temperatura donde puebla el intermediario térmico.
- Mutante E20K/E72K/D126K o 3M: el conjunto de mutaciones afectan a la estabilidad residual, relevante y total estabilizándolas. La primera T_m se ha desplazado notablemente a temperaturas mayores así como la segunda, esto provoca una aumento en el salto entre una transición y otra (diferencia entre las T_m de 10.44 para la WT y 16.9 para el triple mutante). Debido a que se produce un estabilización en los términos residual y relevante y se produce un aumento en el salto entre un transición y otra, se eligió este mutante como modelo para probar nuevas mutaciones y poder conseguir así la desaparición de la población del intermediario térmico.

- Mutante 3M+G87V: el conjunto de mutaciones afectan a la estabilidad residual, relevante y total estabilizándolas. La primera T_m se ha desplazado notablemente a temperaturas mayores así como la segunda, pero a diferencia del mutante 3M se disminuye el salto entre una transición y otra (diferencia entre las T_m de 10.44 para la WT y 9.92 para el cuádruple mutante). Se ha producido una estabilización tanto de cada transición como del global pero con una disminución del rango de temperatura donde puebla el intermediario térmico.
- Mutante 3M+D100N: el conjunto de mutaciones afectan a la estabilidad residual, relevante y total estabilizándolas. La primera T_m se ha desplazado notablemente a temperaturas mayores así como la segunda, pero a diferencia del mutante 3M se disminuye el salto entre una transición y otra (diferencia entre las T_m de 10.44 para la WT y 2.84 para el cuádruple mutante). Se ha producido una estabilización tanto de cada transición como del global pero con una disminución del rango de temperatura donde puebla el intermediario térmico.
- Mutante 3M+A142V: no se ajustó a un modelo de 3 estados.

Cabe destacar que las mutaciones que desestabilizan el proceso, son las mismas que presentaban un comportamiento diferente en los espectros de Dicroísmo circular en el cercano a 25°C (figuras 55 y 56), así como una desestabilización del proceso de desnaturalización química por Urea (figura 47 y tabla3).

5.4.2 Ajuste a un modelo de 2 estados

Se observaron proteínas que o no se ajustan a un modelo de 3 estados (3M+A142V) o lo hacían dejando muy poca separación entre las T_m (3M+D100N). Para ver si las mutaciones introducidas habían conseguido la obtención de una flavodoxina mutante en la que ya no se poblara el estado intermediario, se realizó un ajuste a un modelo de 2 estados. En este caso la comparación se realizó exclusivamente frente al 3M, tomando este como referencia.

5.4.2.1. Ajuste mediante Técnicas Espectroscópicas

Se ve como en el mutante 3M+A142V se produce un solapamiento de las 4 curvas espectroscópicas, indicativo de un ajuste a un modelo de 2 estados (figura 54). En cambio el mutante 3M+D100N sufre un solapamiento peor, cabe destacar la curva correspondiente al dicroísmo circular en el cercano, esta diferencia radica en la pendiente de la curva aunque al final de ella se puede ver como se produce el solapamiento. Las T_m fueron muy similares en ambos mutantes y al 3M, mientras que las ΔH de ambos mutantes fueron muy similares aunque menores a la del 3M.

El solapamiento de las curvas espectroscópicas es una condición necesaria a cumplir pero no suficiente, por esta razón se llevo a cabo un estudio mediante calorimetría diferencial de barrido.

5.4.2.2. Ajuste mediante Calorimetría Diferencial de Barrido

Como pudo verse en el apartado de resultados, se realizó el análisis del mutante 3M (usado como proteína de referencia) así como de los mutantes 3M+D100N y 3M+A142V (proteínas sospechas de seguir un proceso de 2 estados). Se obtuvieron los parámetros de ΔH_{cal} , T_m y $\Delta C_{p_{max}}$, calculando con ellos la entalpía de van't Hoff (tabla 7). El cociente entre ΔH_{VH} y ΔH_{cal} nos dará la información del proceso de desplegamiento que sufre nuestra proteína; siendo: un proceso de dos estados cuando el cociente sea igual 1, un proceso con presencia de intermediario cuando el cociente sea <1 y reflejando una asociación en el estado nativo cuando el cociente sea >1 .

- Mutante 3M: se obtuvo una razón de 0.76 indicándonos como era de esperar, que sigue un modelo de 3 estados. Este resultado está en concordancia con lo obtenido mediante técnicas espectroscópicas.
- Mutante 3M+D100N: se obtuvo una razón de 0.95 dándonos una información dudosa de si se ajusta a un modelo de 2 o 3 estados; como ocurría por técnicas espectroscópicas ya que un conjunto de curvas se ajustaban a un modelo de 3 estados dando una diferencia entre T_m de 2.84 y cuando se hizo la replica de todas ellas no convergían en el ajuste y si lo hacían en un modelo de 2 ambos juegos de curvas.
- Mutante 3M+A142V: se obtuvo una razón de 1.04 dándonos una información de que se trata de una proteína que se ajusta a un modelo de 2 estados. Este hecho justifica que mediante técnicas espectroscópicas solo se ajuste a un modelo de 2 estados.

Para no poner en duda que el mutante 3M+D100N no siga un modelo de 2 estados de manera tan clara a como lo hace el mutante 3M+A142V, y se trate de una información inconcluyente se realiza la siguiente discusión. Si se aplica un error del 5% a cada una de las entalpías (ΔH_{VH} y ΔH_{cal}) estaríamos en un rango del 10% de error en la razón obtenida entre ellas.

El mutante 3M+D100N estaría en el rango [0.855-1.045] y el mutante 3M+A142V [0.94-1.114]. La flavodoxina de *Anabaena* se comporta como un monómero (Bueno. M, 2006), de esta manera no se ajustarían los valores mayores a 1 a esta característica de monómero. Si observamos el rango que presenta la razón entre ΔH_{VH} y ΔH_{cal} no cabe duda de que el mutante 3M+A142 sigue un modelo de 2 estados (0.94-1), mientras que el mutante 3M+D100N no es concluyente podría seguir un modelo de 2 estados o de 3 (0.855-1).

6. Conclusiones

Con los resultados obtenidos a lo largo del trabajo fin de máster podemos llegar a las siguientes conclusiones:

- Los mutantes D100N y 3M+G87V pierden su capacidad de unión al cofactor y como consecuencia su actividad biológica.
- Todos los mutantes presentan una estructura secundaria similar. La estructura terciaria, también es similar con la excepción de los mutantes D100N y A142V.
- Los mutantes I59A, 3M, 3M+G87V, 3M+D100N y 3M+A142V estabilizan el proceso de desnaturalización química con urea respecto a la WT, mientras que los mutantes D100N y A142V lo desestabilizan.
- El mutante 3M+A142V no se ajusta a un modelo de 3 estados en el proceso de desnaturalización térmica seguido por cuatro técnicas espectroscópicas. Todos los demás mutantes analizados sí se ajustan a un modelo de 3 estados.
- Los mutantes I59A, E20K/E72K/D126K o 3M, 3M+G87V y 3M+D100N estabilizan la estabilidad residual, relevante y total del proceso de desnaturalización térmica, mientras que los mutantes D100N y A142V lo desestabilizan.
- La información obtenida por calorimetría diferencial de barrido y técnicas espectroscópicas para el mutante 3M+D100N no es concluyente, pudiendo ajustarse un modelo de 2 estados o de 3.
- El mutante 3M+A142V sigue un modelo de 2 estados, cumpliendo así los objetivos a largo plazo del grupo.

7. Bibliografía

Amann, E., Ochs, B & Abel, K. J. (1988). Tightly regulated tacpromotor vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 69(2), 301-15.

Ayuso Tejedor, Sara (2012). Análisis estructural y termodinámico de las conformaciones que pueblan la desnaturalización térmica de la apoflavodoxina de *Anabaena* PCC 7119.

Ayuso-Tejedor, S., Espinosa, V. A., Bueno, M., Campos, L. A., Abián, O., Bernadó, Pau., Sancho, J & Jiménez, M. A. (2010). Design and Structure of an Equilibrium Protein Folding Intermediate: A Hint into Dynamical Regions of Proteins. *J. Mol. Biol.* 400, 922-934.

Bueno Fernandez, Marta (2006). Estabilidad y estabilización de proteínas con el modelo de la apoflavodoxina de *Anabaena* PCC 7119.

Campos Prieto, Luis Alberto (2004). Análisis energético y estructural de una proteína modelo con un equilibrio de tres estados: la flavodoxina de *Anabaena* PCC 7119.

Campos, L. A., Bueno, M., Lopez-Llano, J., Jiménez, M. A & Sancho, J. (2004). Structure of Stable Protein Folding Intermediates by Equilibrium ϕ -Analysis: The Apoflavodoxin Thermal Intermediate. *J Mol Biol* 344, 239-255.

Cremades, N., Sancho, J & Freire, E. (2006). The Native State Ensemble of Proteins Provides Clues for Folding, Misfolding and Function. *Trends Biochem. Sci* 31, 494-496.

Edmondson, D.E and Tollin, G. (1971). Chemical and physical characterization of the Shethna flavoprotein and apoprotein and kinetics and thermodynamics of flavin analog binding to the apoprotein. *Biochemistry* 10, 124-132.

Fillat MF, Borrias WE, Weisbeek PJ. (1991). Isolation and overexpression in *Escherichia coli* of the flavodoxin gene from *Anabaena* PCC 7119. *Biochem J.* 1991 Nov 15;280 (Pt 1):187-91.

Fillat, M.F., Sandman, G. and Gomez-Moreno, C. (1988) Flavodoxin from the nitrogen fixing cyanobacterium *Anabaena* PCC 7119. *Arch. Microbial.* 150, 160-164.

Genzor, C. G., Beldarrain, A., Gomez-Moreno, C., Lopez-Lacombe, J. L., Cortijo, M. & Sancho, J. (1996b). Conformational stability of apoflavodoxin. *Protein Sci* 5, 1376-1388.

Genzor, C.G., Perales-Alcón, A., Sancho, J. & Romeo, A. (1996a) "Closure of a tyrosine/tryptophan aromatic gate leads to a compact fold in apoflavodoxin". *Nat. Struct. Biol* 3: 329-332.

Gómez-Moreno, Carlos y Sancho Sanz, Javier (coords.) (2003) Estructura de proteínas. *Ariel Ciencia*

Irún, M. P., Garcia-Mira, M. M., Sanchez-Ruiz, J. M., & Sancho, J. (2001). Native hydrogen bonds in a molten globule: the apoflavodoxin thermal intermediate. *J Mol Biol* 306, 877-888.

López- Llano, J., Maldonado, S., Jain, S., Lostao, A., Godoy-Ruiz, R., Sanchez-Ruiz, J.M., Cortijo, M., Fernandez-Recio, J. and Sancho, J. (2004b). The long and short flavodoxins: II. The role of the differentiating loop in apoflavodoxin stability and folding mechanism. *J. Biol Chem* 279, 47184-47191.

López-Llano, J., Maldonado, M., Bueno, M., Lostao, A., Jiménez, M.A., Lillo, M.P., Sancho, J. (2004a). The role of differentiating loop in apoflavodoxin structure and FMN binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 47177-47183.

Pace, C.N & Laurents, D.V. (1989). A new method for determining a heat capacity change for protein folding. *Biochemistry* 28, 2520-2525.

Roder, H., Maki, K., & Cheng, H. (2006). Early events in protein folding explored by rapid mixing methods, *Chem. Rev* 106 pp, 1836–1861.

Sánchez-Ruiz, J.M. (1995) Differential Scanning Calorimetry of Proteins. B. B. Bisway y S. Roy (eds.), *Subcellular Biochemistry, Volume 24. Proteins: Structure, Function and Engineering*, Plenum Press, Nueva York, pp 133-176.

Sancho, J., M., Campos, L.A., Fernandez-Recio, j., Irun, M.P., Lopez, J., Machicado, C., Pedroso, I. and Toja, M. (2002). The relevance of protein stability of proteins with equilibrium intermediates. *ScientificWorldJournal* 2, 1209-1215.

Santoro, M.M and Bolen, D.W. (1988). Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. I. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry* 27, 8063-8068.

Simonsen, R.P and Tollin, G. (1980). Structure-function relations in flavodoxins. *Mol Cell Biochem* 33, 13-24

Steipe, B., Schiller, B., Plückthun, A., Steinbacher, S., (1994) Sequence statistics reliably predict stabilizing mutations in a protein domain.

8. Apéndice

A continuación pueden verse las gráficas de cada uno de los mutantes y la WT, así como sus réplicas del proceso de desnaturalización química por Urea.

