

Resumen

La familia de proteínas HMGB pertenece a la superfamilia de las proteínas HMG (*High Mobility Group*), que son las proteínas más abundantes en la cromatina después de las histonas. Las HMGB se unen al surco estrecho del ADN (ácido desoxirribonucleico) con poca o ninguna especificidad de secuencia, a partir de un motivo de unión al ADN denominado HMG-box. Existen dos dominios de HMG-box en las proteínas HMGB, las llamadas box A y box B. Cada una de ellas contiene aproximadamente 75 aminoácidos y presenta un plegamiento característico en forma de L que consta de tres hélices α . A través de estos dominios de unión al ADN, las HMGB inducen cambios estructurales en la cromatina, fomentando la unión de complejos de nucleoproteína que controlan los procesos del ADN, incluyendo la transcripción. Las proteínas HMGB están también implicadas en diferentes enfermedades y algunos tipos de cáncer, por ello su estudio estructural despierta un gran interés en el estudio de estrategias terapéuticas. Con este fin, se busca la obtención de cristales de la proteína HMGB1 con distintos oligonucleótidos.

Para obtener la proteína HMGB1, mediante el empleo de técnicas de ingeniería genética se introdujo en la bacteria *Escherichia coli* un plásmido que contiene: el gen que expresa la proteína de interés, un gen que confiere a la bacteria resistencia a la ampicilina (para poder seleccionar las bacterias que han incorporado el plásmido) y una cola GST (Glutación S-transferasa) que facilita la posterior purificación de la proteína. La expresión de la proteína se indujo mediante la adición de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido). Una vez expresada la proteína, ésta se ha de purificar hasta obtener muestras de elevada pureza para que se puedan cristalizar. Para ello, tras extraer la proteína del interior de la célula, se aplicaron tres técnicas cromatográficas diferentes (cromatografía de afinidad, de intercambio catiónico y de exclusión molecular).

A continuación se realizaron ensayos cristalográficos de distintos complejos HMGB1-ADN con secuencias ricas en adenina y timina mediante la técnica de difusión de vapor en gota colgante. Para encontrar condiciones óptimas de cristalización, se ensayaron distintas variables (relación proteína-ADN, pH, sales, etc.). Tras la obtención de cristales, éstos se pescaron y se congelaron en nitrógeno líquido. Posteriormente se procedió a su difracción mediante rayos X en el sincrotrón ALBA. Los datos obtenidos se procesaron mediante diferentes programas de ordenador para la resolución de la estructura. El método de resolución a emplear fue el de reemplazamiento molecular. A través del análisis de los diagramas de difracción obtenidos se ha resuelto la estructura del ADN, aunque se requiere la obtención de un cristal con más orden para poder precisar la posición de la proteína.

Sumario

RESUMEN	1
SUMARIO	3
1. GLOSARIO	5
2. PREFACIO	7
2.1. Origen del proyecto.....	7
3. INTRODUCCIÓN	9
3.1. Objetivos del proyecto.....	9
3.2. Alcance del proyecto.....	9
4. EL ADN Y LAS PROTEÍNAS HMGB1	11
4.1. El ADN.....	11
4.1.1. Estructura secundaria del ADN.....	12
4.1.2. Importancia de las regiones AT	17
4.2. Las proteínas HMGB1	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1. Obtención de la proteína HMGB1 en <i>Escherichia coli</i>	26
5.1.1. Transformación, selección y expresión.....	28
5.1.2. Tratamiento del sedimento bacteriano.....	31
5.2. Purificación de la proteína HMGB1	32
5.2.1. Cromatografía de afinidad GST	33
5.2.2. Cromatografía de intercambio catiónico	36
5.2.3. Cromatografía de exclusión molecular	40
5.2.4. Análisis electroforético de las fracciones en geles SDS-PAGE	42
5.2.5. Concentración de las fracciones	48
5.2.6. Determinación de la concentración de la proteína	52
5.3. Estudio de la interacción ADN-proteína en geles EMSA	53
5.4. Estudios cristalográficos	57
5.4.1. Fundamentos de la cristalización.....	57
5.4.2. Condiciones para la cristalización.....	59
5.4.3. Metodología de cristalización.....	61
5.4.4. Proceso de obtención de cristales	63
5.4.5. Análisis electroforético de los cristales	65
5.5. Cristalografía de rayos X.....	67

5.5.1. Conceptos previos.....	68
5.5.2. Difracción de rayos X	70
5.5.3. Análisis de los resultados.....	78
6. RESULTADOS	85
6.1. Obtención de la proteína HMGB1 en <i>Escherichia coli</i>	85
6.2. Purificación cromatográfica de la proteína	88
6.2.1. Cromatografía de afinidad GST	88
6.2.2. Cromatografía de intercambio catiónico.....	91
6.2.3. Cromatografía de exclusión molecular	94
6.3. Concentración final de la proteína	97
6.4. Ensayos cristalográficos con la proteína HMGB1	100
6.4.1. Oligonucleótido GA ₂ T ₂ A ₂ CGTACGT ₂ A ₂ T ₂ CG con la proteína HMGB1	103
6.4.2. Oligonucleótido CGCGT ₅ CGCGA ₅ CGCG ₂ con la proteína HMGB1	104
6.4.3. Oligonucleótido C ₂ A ₂ TA ₂ TCGCGAT ₂ AT ₂ G ₂ con la proteína HMGB1.....	107
6.5. Análisis de los resultados de difracción.....	111
CONCLUSIONES	123
AGRADECIMIENTOS	125
BIBLIOGRAFÍA	127
Referencias bibliográficas	127
Bibliografía complementaria	131
ANEXO A: MATERIALES Y MÉTODOS	133
A.1. Inducción con IPTG.....	133
A.2. Obtención de células competentes Rosetta(DE3)pLysS	133
A.3. Medio de cultivo	135
A.4. Soluciones Natrix HR2-116 y soluciones adaptadas.....	136
A.5. La unidad cristalina	139
A.6. Análisis de datos de difracción.....	141
ANEXO B: RESULTADOS	143
ANEXO C: ESTUDIO ECONÓMICO DEL PROYECTO	155
ANEXO D: ESTUDIO DEL IMPACTO AMBIENTAL	161

1. GLOSARIO

Ac: acetato (CH_3COO^-).

ADN: ácido desoxirribonucleico.

Amp: antibiótico ampicilina.

Amp^r: gen que otorga resistencia a la ampicilina.

AT: Adenina y Timina.

Cac: Cacodilato (dimetil-arsenato).

Cam: antibiótico cloranfenicol.

CG: Citosina y Guanina.

C-terminal: extremo carboxilo de una proteína.

Cv: volumen equivalente al empaquetado de una columna (del inglés *column volume*).

DO: densidad óptica.

DTT: ditioneitol.

EMSA: *Electrophoretic Mobility Shift Assay*.

FPLC: *Fast Protein Liquid Chromatography*.

FT: *flow through* (nombre que se asigna al volumen eluido que se recoge mientras se introduce la muestra de partida a una columna cromatográfica).

GST: glutatión S-transferasa.

HEPES: N-[2-hidroxietil]piperazina-N'[2-ácido etansulfónico].

HMG: *High Mobility Group*.

HMG-box: motivo de unión al surco estrecho del ADN de las proteínas HMGB.

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.

LB: medio de cultivo Luria Bertani.

MP: Muestra de partida (nombre que se asigna a la muestra que se introduce en la columna cromatográfica).

MPD: 2-metil-2,4-pentanodiol.

MR: Reemplazamiento molecular (del inglés *Molecular Replacement*).

MWCO: Límite de masa molecular máxima que puede retener una membrana (del inglés *molecular weight cut off*).

O.N.: toda la noche (del inglés *overnight*).

P:O: Proteína:Oligonucleótido.

pb: par de bases.

PFC: Proyecto final de carrera.

PEG: Polietilenglicol.

PSA: Persulfato amónico.

RMN: Resonancia magnética nuclear.

rpm: revoluciones por minuto.

SDS-PAGE: gel poliacrilamida-SDS (del inglés *Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*).

TBE: Solución de Tris, ácido bórico y EDTA.

TD: Tesis doctoral.

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina.

TFM: Trabajo final de máster.

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano.

U: Unidades.

UV: Ultravioleta.

2. PREFACIO

2.1. Origen del proyecto

La proteína HMGB1 es una proteína nuclear altamente conservada que actúa como factor de unión a la cromatina y dobla el ADN, además de reconocer una variedad de estructuras de ADN distorsionadas, promoviendo el acceso de proteínas transcripcionales en zonas del ADN. Por este motivo, la proteína HMGB1 está implicada en los procesos de regulación del ADN, tales como la transcripción, replicación y reparación, procesos que requieren el cambio de la conformación de la cromatina. Sin embargo, actualmente se desconocen los detalles de la interacción de la proteína HMGB1 con la cromatina. Con el fin de estudiar el mecanismo de acción de estas proteínas en los procesos celulares en los que participa, es necesario determinar la estructura tridimensional de los complejos de estas proteínas con el ADN.

Además de su papel nuclear, la proteína HMGB1 también actúa como una molécula de señalización extracelular durante la inflamación, la diferenciación celular, la migración celular y la metástasis tumoral. La sobreexpresión de la proteína HMGB1 se asocia a diversos sellos distintivos de cáncer, como el ilimitado potencial replicativo, evasión de la muerte celular programada, inflamación, invasión tisular y metástasis. Por ello, este estudio se considera de gran interés para contribuir al estudio de nuevas estrategias contra el cáncer.

3. Introducción

3.1. Objetivos del proyecto

El objetivo último de este proyecto es la obtención de la estructura tridimensional de los complejos de la proteína HMGB1 con oligonucleótidos sintéticos de secuencias ricas en adenina y timina. Para este fin se requiere la obtención de la proteína HMGB1 pura y la obtención de cristales del complejo HMGB1-oligonucleótido para su difracción mediante rayos X y el tratamiento de los datos obtenidos.

3.2. Alcance del proyecto

Además de la consulta bibliográfica de estudios previos, el proyecto abarca las siguientes etapas:

- Obtención de la proteína HMGB1 (concretamente la forma HMGB1(Δ 7-164)) en un cultivo de la bacteria *Escherichia coli* (cepa Rosetta (DE3) pLysS) mediante la técnica del ADN recombinante.
- Purificación de la proteína mediante una sucesión de etapas cromatográficas: Cromatografía de afinidad, de intercambio catiónico y de exclusión molecular.
- Cristalización del complejo ADN-HMGB1 mediante la técnica de difusión de vapor en gota colgante.
- Difracción mediante rayos X en el sincrotrón ALBA de los mejores cristales obtenidos.
- Análisis de los resultados obtenidos con el fin de determinar, si es posible, la estructura tridimensional del complejo.

4. EL ADN Y LAS PROTEÍNAS HMGB1

En este apartado se realiza una introducción sobre el ácido desoxirribonucleico (ADN) y las proteínas HMGB1, que son las moléculas estudiadas en el presente proyecto. El correcto desarrollo de las funciones del ADN depende de su interacción con diversas proteínas. Las proteínas HMG (a las que pertenece la HMGB1) son un ejemplo de tales proteínas.

4.1. EL ADN

El ADN es una macromolécula donde se almacena toda la información genética de un organismo en forma de genes. En la secuencia de sus genes se encuentra la información referente a la codificación de las proteínas que componen un organismo (cuándo, en qué tipo de células y en qué cantidad se tiene que sintetizar cada proteína). Existen otras secuencias de ADN que tienen propósitos estructurales y otras de las que se desconoce aún su función. Además, es el encargado de transmitir la información genética de unos organismos a otros, mediante la duplicación del material genético durante la división celular.

Químicamente, se trata de una molécula formada por una larga secuencia de nucleótidos. Cada nucleótido está formado por una base nitrogenada, un azúcar y un grupo fosfato (Figura 4.1) [1]. Se denomina ácido desoxirribonucleico debido a que el azúcar es la pentosa β -D-2'-desoxirribosa (en la cual el carbono 2' no está unido a un oxígeno). El grupo fosfato une las moléculas de azúcar entre sí, por medio de enlaces fosfodiéster (Figura 4.2) entre los átomos de carbono 3' y 5' de dos azúcares adyacentes. Unido al carbono 1' de la pentosa se encuentra la base nitrogenada, que puede ser adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G).

Estas bases nitrogenadas son compuestos heterocíclicos y aromáticos con dos o más átomos de nitrógeno, que se clasifican en purinas (A y G) formadas por dos anillos unidos entre sí, y las pirimidinas (T y C) formadas por un sólo anillo (Figura 4.1). Precisamente lo que distingue un nucleótido de otro es la base nitrogenada, y por ello la secuencia de ADN se especifica nombrando sólo la secuencia de sus bases. La disposición secuencial de estas cuatro bases a lo largo de la cadena es la que codifica la información genética.

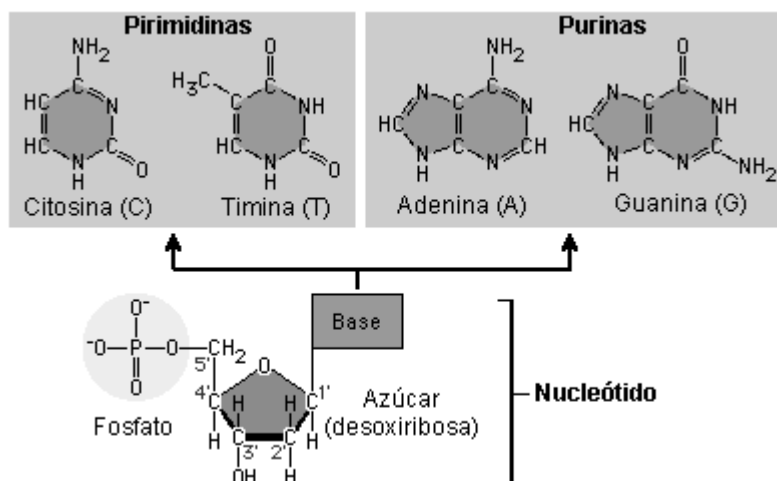


Figura 4.1: Los tres componentes de un nucleótido de ADN: una base nitrogenada (C, T, A o G), un azúcar de cinco carbonos (la β -D-2'-desoxirribosa) y un grupo fosfato.

<http://prettymolecularscience.blogspot.com.es>. [Feb-2015].

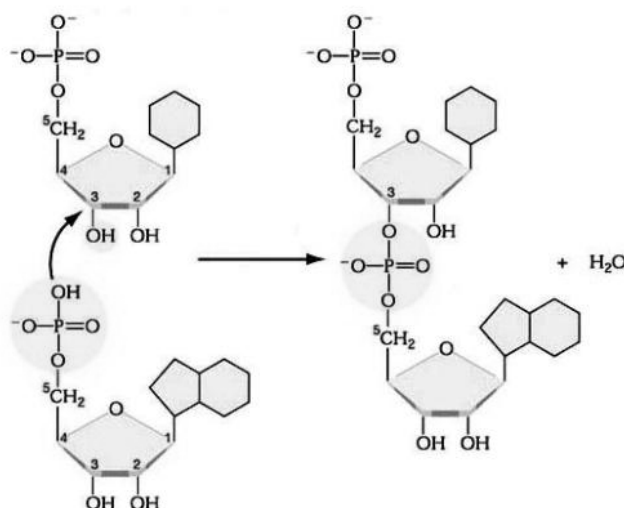


Figura 4.2: Enlace fosfodiéster entre dos nucleótidos adyacentes.

Se observa cómo se forma el enlace entre el carbono 3 de un azúcar y el carbono 5 del azúcar adyacente, liberándose en el proceso una molécula de agua.

<http://prettymolecularscience.blogspot.com.es>. [Feb-2015].

4.1.1. Estructura secundaria del ADN

En los seres vivos, el ADN forma una cadena de dos hebras enlazadas en doble hélice, en la cual la dirección de los nucleótidos en una hebra ($5' \rightarrow 3'$) es opuesta a la dirección en otra hebra ($3' \rightarrow 5'$), donde los números representan el número del carbono correspondiente del

azúcar (Figura 4.3). A esta organización de las hebras se le denomina antiparalela. Las pentosas y los fosfatos constituyen el esqueleto de la doble hélice mientras que las bases nitrogenadas de ambas cadenas quedan enfrentadas en el interior y se unen entre sí, manteniendo estable la doble hélice.

Cada tipo de base en una hebra forma enlace únicamente con un tipo de base en la otra hebra. A esto se le denomina complementariedad de las bases. Así, las purinas forman enlaces con las pirimidinas, de manera que A se une solamente con T y C sólo con G mediante dos y tres puentes de hidrógeno respectivamente. Debido a esta complementariedad de las bases nitrogenadas, la secuencia de éstas en una cadena determina por completo la secuencia de la otra cadena.

El fundamento de esta estructura comienza a asentarse con los estudios de Erwin Chargaff en 1940 [2], quien realizó algunos experimentos en los cuales descubrió que la proporción de purinas era idéntica a la de las pirimidinas ($[A]=[T]$, $[G]=[C]$), y que la cantidad de CG no es igual a la cantidad de AT.

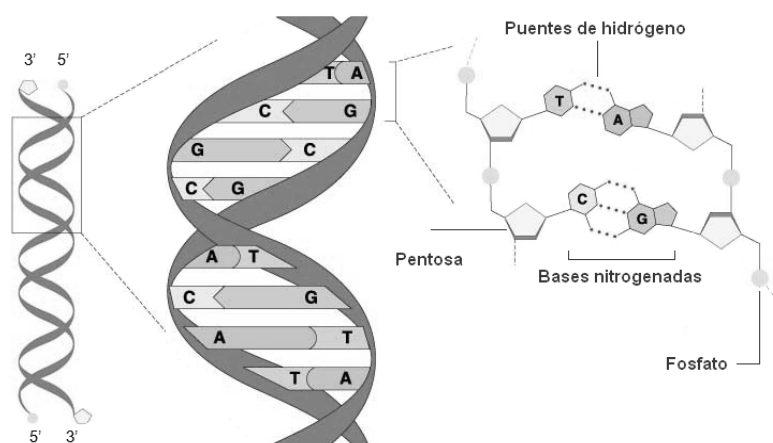


Figura 4.3: Esquema de la estructura secundaria del ADN.

El esqueleto de la doble hélice lo forman los azúcares y los fosfatos. A la derecha se observan los puentes de hidrógeno que se forman entre los pares de bases AT y CG (2 y 3 respectivamente).

<http://eduredes.ning.com/profiles/blogs/los-acidos-nucleicos>. [Feb-2015].

Con esta información junto con los datos de difracción de rayos X obtenidos por Rosalind Franklin a principios de 1950, James Watson y Francis Crick propusieron en 1953 el modelo de la doble hélice de ADN, concretamente de la denominada forma B, para representar la estructura tridimensional del polímero [3]. Este modelo consiste en dos cadenas de nucleótidos enrolladas una sobre otra alrededor del mismo eje formando una doble hélice dextrógira. Como se explicará más adelante, más tarde se descubrieron otras conformaciones de esta doble hélice, incluyendo la posibilidad de dobles hélices levógiras.

La forma B (ADN-B) presenta dos tipos de hendiduras: un surco mayor (o ancho) que mide unos 22 Å y un surco menor (o estrecho) de unos 12 Å. La hélice presenta un diámetro aproximado de 20 Å, una media de 10 pares de bases por vuelta y un paso de hélice de 33,8 Å, lo cual quiere decir que tiene una distancia entre pares de bases consecutivos de aproximadamente 3,38 Å (Figura 4.4).

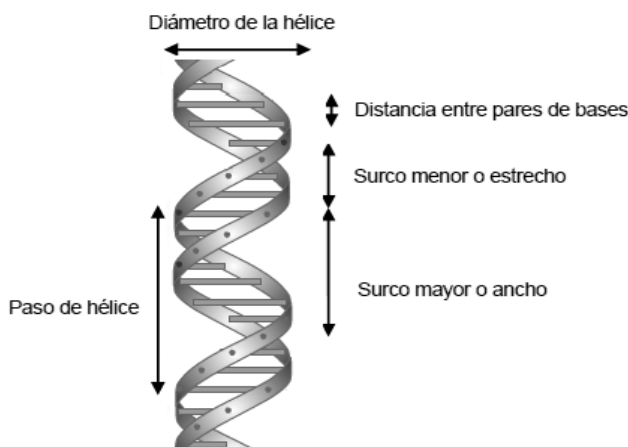


Figura 4.4: Situación de los surcos menor y mayor, así como algunos parámetros conformacionales del ADN.

Adaptado de http://farm1.static.flickr.com/177/475481204_05350cff5f_o.png. [Feb-2015].

La forma B del ADN es la más común en las células [4], sin embargo, no es la única estructura secundaria que existe [5]. Así, se han observado otras conformaciones como la A y la Z (siendo esta última la única levógira), que difieren en los valores de los parámetros conformacionales de la doble hélice (Figura 4.5). Estas diferencias se resumen en la Tabla 4.1.



Figura 4.5: Modelos de las figuras A, B y Z del ADN.

<http://image.slidesharecdn.com/t6acidosnucleicos-111112141635-phpapp02/95/t6-cidos-nucleicos-24-728.jpg?cb=1321107490>. [Feb-2015].

Tabla 4.1: Comparación entre las formas A, B y Z del ADN [6].

TIPO DE HÉLICE			
	ADN-A	ADN-B	ADN-Z
Sentido de giro de la hélice	Dextrógiro	Dextrógiro	Levógiro
Forma y tamaño	Más ancha y corta	Intermedia	Más estrecha y larga
Surco mayor	Estrecho y profundo	Amplio y profundidad media	Sin profundidad
Surco menor	Amplio y no profundo	Estrecho y profundidad media	Estrecho y profundo
Diámetro de la hélice	25,5 Å	23,7 Å	18,4 Å
Distancia entre pares de bases	2,3 Å	3,4 Å	3,8 Å
Paso de hélice	25,3 Å	35,4 Å	45,6 Å
Pares de bases por paso de hélice	11	10,4	12
Inclinación de los pares de bases	19°	1,2°	9°

La conformación que adopta el ADN depende de su secuencia, la presencia de modificaciones químicas en las bases y las condiciones de la solución (presencia de agua o de determinados iones, etc.). Por ejemplo, la forma ADN-A se observa en condiciones de baja humedad (75% de humedad relativa) [7].

Además del apareamiento canónico de bases descrito por Watson y Crick, existen otros como el de Hoogsteen [8]. Este tipo de apareamiento de bases presenta distintos enlaces por puente de hidrógeno que el apareamiento de Watson y Crick debido a que las purinas están giradas 180° respecto al enlace glucosídico (aquél que une el azúcar a la base nitrogenada) (Figura 4.6).

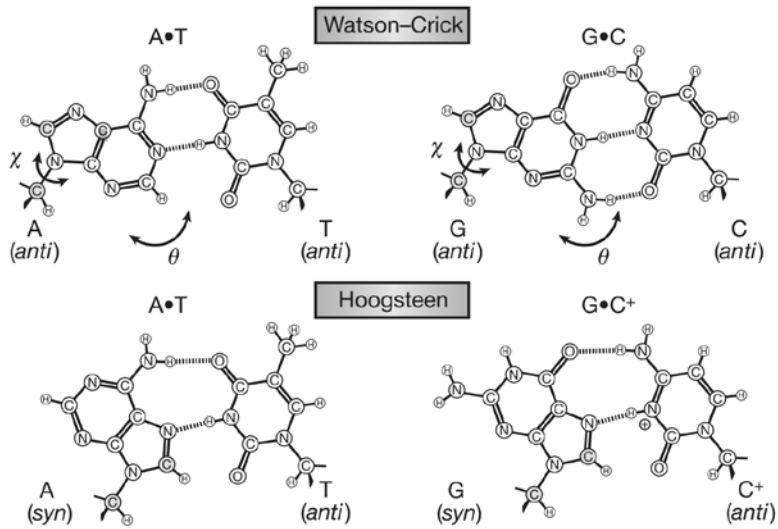


Figura 4.6: Comparación entre apareamiento de bases tipo Watson-Crick y tipo Hoogsteen.

<http://biologyforhighschool.net/?p=221>. [Feb-2015].

Además de las formas A, B y Z, existen otras estructuras más complejas, como es el caso de las cruciformes. La forma cruciforme [9] se produce debido a cambios en el apareamiento de bases dentro de las propias cadenas de la doble hélice del ADN y consiste en una estructura en forma de cruz. La formación de estas estructuras requiere la presencia de repeticiones invertidas de la secuencia (palíndromos) de la doble hélice del ADN, es decir, la secuencia de bases de las dos hebras tiene una simetría binaria por rotación alrededor de un centro (Figura 4.7).

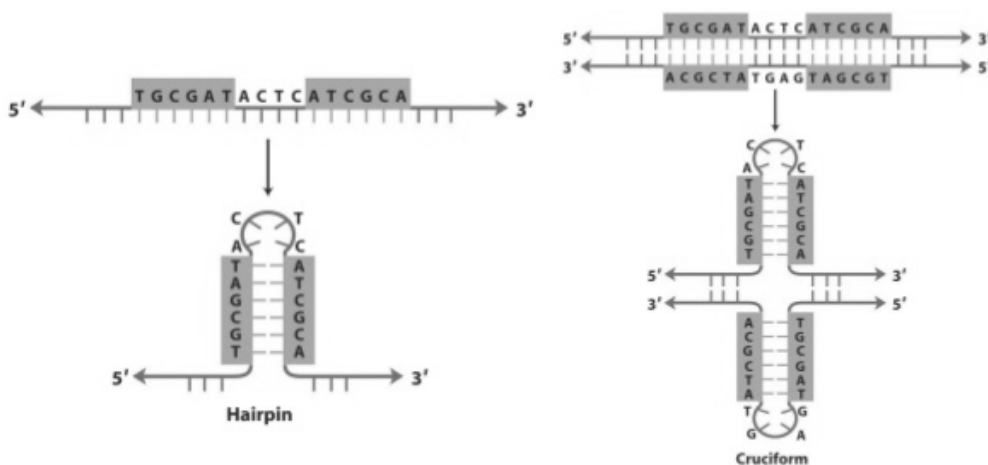


Figura 4.7: Representación esquemática de la formación de un cruciforme a partir de una secuencia de ADN palindrómica.

<http://biologyforhighschool.net/?p=221>. [Feb-2015].

4.1.2. Importancia de las regiones AT

La secuencia de ADN que conforma el genoma humano contiene codificada información en forma de genes. Sin embargo, en muchas especies sólo una pequeña fracción del genoma codifica proteínas. Por ejemplo, en el genoma humano, sólo un 1,5% del genoma codifica proteínas, mientras que más del 90% consiste en ADN no codificante. Hasta hace poco tiempo, a este ADN se le llamaba ADN basura o "*junk DNA*" [10] puesto que se pensaba que no tenía ninguna utilidad, pero estudios recientes indican todo lo contrario. Algunos estudios como el proyecto ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) [11] han demostrado que dicho ADN no es tan inactivo como parecía, ya que los resultados publicados hablan de la gran cantidad de transcripción que se detecta a lo largo del genoma humano (hasta un 75% de los nucleótidos son transcritos a ARN, de los cuales un alto porcentaje no codifican proteínas).

Muchas de las regiones no codificantes son ricas en ATs. Gracias principalmente a la difracción de rayos X, entre otras técnicas, diversos estudios han logrado explicar la estructura secundaria de diferentes secuencias ATs, aunque todavía son pocos. Algunos de los estudios realizados hasta el momento se comentan a continuación:

El primer oligonucleótido con secuencia constituida únicamente por AT del que se determinó su estructura por medio de rayos X fue el ATAT [12]. Esta estructura presentaba forma B del tipo Watson y Crick. Posteriormente se demostró que, en ocasiones, los oligonucleótidos ricos en AT formaban el apareamiento de bases Hoogsteen [13]. Hay estudios que demuestran que algunos oligonucleótidos que contienen solamente pares de bases AT presentan polimorfismo en su estructura dependiendo de la concentración de sales y de la temperatura a la que se encuentran [14].

El grupo de investigación MACROM estudia oligonucleótidos ricos en AT y su interacción con drogas, proteínas y péptidos. El objetivo de este proyecto es el estudio de la interacción de las proteínas HMG (en concreto la HMGB1) con secuencias ricas en AT. Algunos estudios recientes que se han llevado a cabo en este grupo de investigación han sido:

- Determinación de la estructura del complejo $d(ATATATATAT)_2$ con la droga pentamidina, un agente antiprotozoario usado en el tratamiento de la enfermedad del sueño y la leishmaniasis, entre otros. En esta estructura se observó una conformación de hélice superenrollada en forma B alternando pares de bases Watson-Crick y Hoogsteen [15]. La parte central de la droga se une al surco estrecho de esta hélice.

- Determinación por primera vez de la estructura tridimensional de un complejo del oligonucleótido d(CGAATTAATTCG)₂, rico en AT, con un péptido correspondiente a un dominio AT-hook (el AT-hook 3 de la proteína HMGA1a) [16].
- Determinación de la estructura cristalina del complejo del ADN d(AAAATTTT)₂ con la droga CD27. Esta droga representa una alternativa en el tratamiento de la malaria, ya que cubre por completo el surco estrecho del ADN, evitando el desarrollo normal y provocando la muerte de parásitos del género *Trypanosoma*, que producen en África la “enfermedad del sueño” y en América del Sur la “enfermedad de Chagas” [17].
- También por primera vez se determinó la estructura tridimensional de un complejo del dominio del box A de HMGB1 con el oligonucleótido ATATCGATAT, demostrando un nuevo modo de reconocimiento del ADN lineal por parte de los dominios HMG-box [18].

4.2. Las proteínas HMGB1

La gran longitud de ADN existente en una célula (aproximadamente 1 metro en las células humanas [19]), tiene que organizarse hasta alcanzar un grado de condensación importante para poder caber en el núcleo celular. Los procesos de replicación y transcripción del ADN están relacionados precisamente con este grado de condensación (las regiones de ADN que se están transcribiendo están menos condensadas, ya que los genes activos han de ser accesibles a las proteínas reguladoras). Estos cambios de empaquetamiento del ADN están controlados principalmente por unas proteínas llamadas histonas, que organizan el ADN en forma de nucleosoma (Figura 4.8).

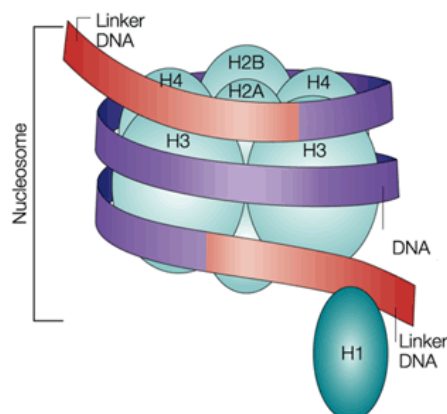


Figura 4.8: Organización del ADN en nucleosomas.

Las histonas empaquetan el ADN en forma de nucleosomas. El ADN que conecta los nucleosomas adyacentes se llama ADN enlazador (*linker DNA*) y se asocia con la histona H1.

http://www.nature.com/nri/journal/v2/n3/fig_tab/nri747_F1.html. [Feb-2015].

Otras proteínas que también provocan cambios estructurales en la organización del ADN son las proteínas HMG (*High Mobility Group*). Se trata de las proteínas cromosómicas más abundantes en la cromatina después de las histonas. Estas proteínas se descubrieron hace unos 40 años y deben su nombre a su alta movilidad electroforética [20]. Las proteínas HMG regulan actividades relacionadas con el ADN como la transcripción, la replicación, la recombinación y la reparación [21]. Estas proteínas se dividen en tres grandes familias, HMGA, HMGB y HMGN, según sus motivos de unión al ADN (Figura 4.9) (AT-hook, HMG-box y dominio de unión nucleosomal, respectivamente [22]). Sus características principales pueden verse resumidas en la Tabla 4.2.

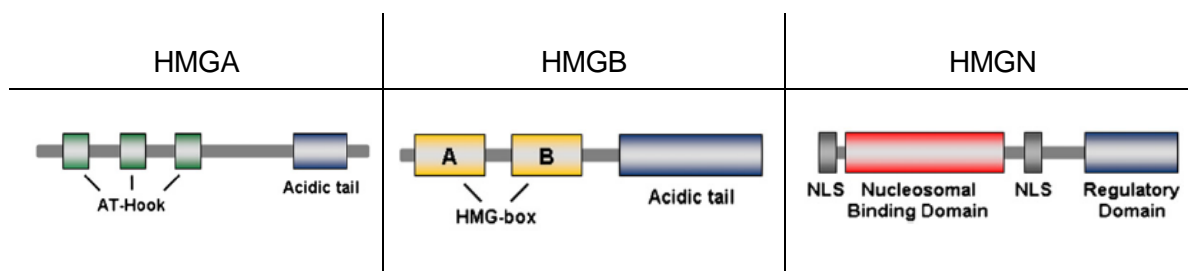


Figura 4.9: Motivos de unión de HMGA, HMGB y HMGN.

En verde, amarillo y rojo, respectivamente [23].

Tabla 4.2: Resumen de las características principales de las proteínas HMG [24].

Nombre antiguo	HMG-I/Y	HMG-1/2	HMG-14/17
Nombre actual	HMGA	HMGB	HMGN
Tipos	A1a, A1b, A1c, A2	B1, B2, B3, B4	N1, N2, N3a, N3b ,N4
Motivo de unión al ADN	AT-hook	HMG-box	Dominio de unión nucleosomal
Unión al ADN	Se une a regiones ricas en AT del surco estrecho del ADN.	Se une al surco estrecho del ADN, deformándolo localmente, con una especificidad de secuencia limitada o nula.	Se une al nucleosoma entre las vueltas de ADN y el octámero de histonas.
Función	Factores estructurales de transcripción que regulan la expresión de genes específicos.	Ayudan a la transcripción de diferentes genes mediante mecanismos múltiples. Afectan a procesos celulares y extracelulares.	Descompactan la cromatina, así mejora la accesibilidad de los factores de transcripción en la unión con la cromatina.
Nº aproximado de aminoácidos de la proteína	100-180	200	100
Nº aproximado de aminoácidos del motivo	9	75	30

Este proyecto se centra en el estudio de la proteína HMGB, en concreto de la HMGB1 de rata, que presenta la misma secuencia aminoacídica que la humana exceptuando dos residuos de la zona C terminal acídica.

La proteína HMGB1, de unos 25 kDa de masa molecular, contiene dos motivos de unión al ADN (box A y box B) y una larga zona C terminal acídica (Figura 4.10) compuesta por ácido aspártico y glutámico, cuya longitud varía entre especies (para células de mamífero es de 30 aminoácidos).

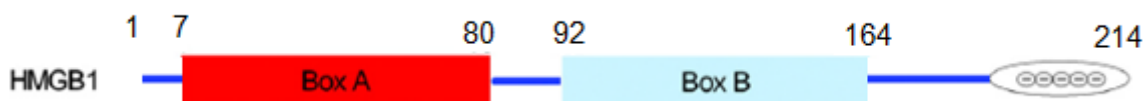


Figura 4.10: Esquema de la estructura de la proteína HMGB1 humana.

Se muestra la región del box A, box B y de la zona acídica terminal [25] [26].

Las estructuras de las box A y box B fueron determinadas inicialmente por espectroscopía RMN [25] [26]. Cada box contiene aproximadamente 75 aminoácidos y tienen un plegamiento característico en forma de L que consiste en tres hélices α con un ángulo de 80° entre los brazos (Figura 4.11). El brazo largo consiste en la cadena extendida N-terminal y la hélice III, mientras que el brazo corto está formado por las hélices I y II. Estas proteínas reconocen y se unen a una variedad de estructuras de ADN distorsionadas, de una manera dependiente de la conformación e independiente de la secuencia [27]. Ningún otro motivo de unión al ADN presenta esta forma [28].

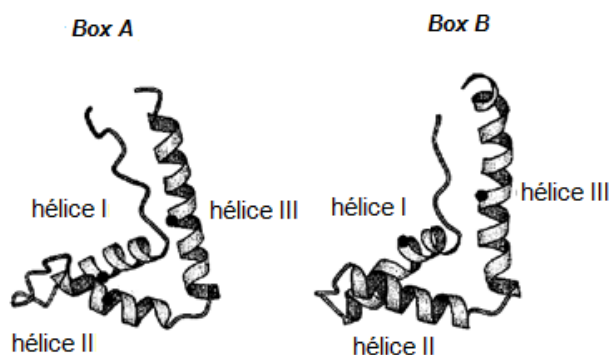


Figura 4.11: Estructura tridimensional de los box A y box B de la HMGB1.

Estructura resuelta mediante espectroscopía RMN [25] [26].

Todas las HMGBs están sujetas a una variedad de modificaciones post-traduccionales, tales como acetilación, fosforilación y metilación. Estas modificaciones pueden modular no sólo la función de la proteína, sino también su localización subcelular y su posterior secreción [29]. En la Figura 4.12 se muestra la secuencia de aminoácidos de los box A y B, así como las posiciones de las hélices α . Además se indican los aminoácidos que están sujetos a modificaciones post-traduccionales.

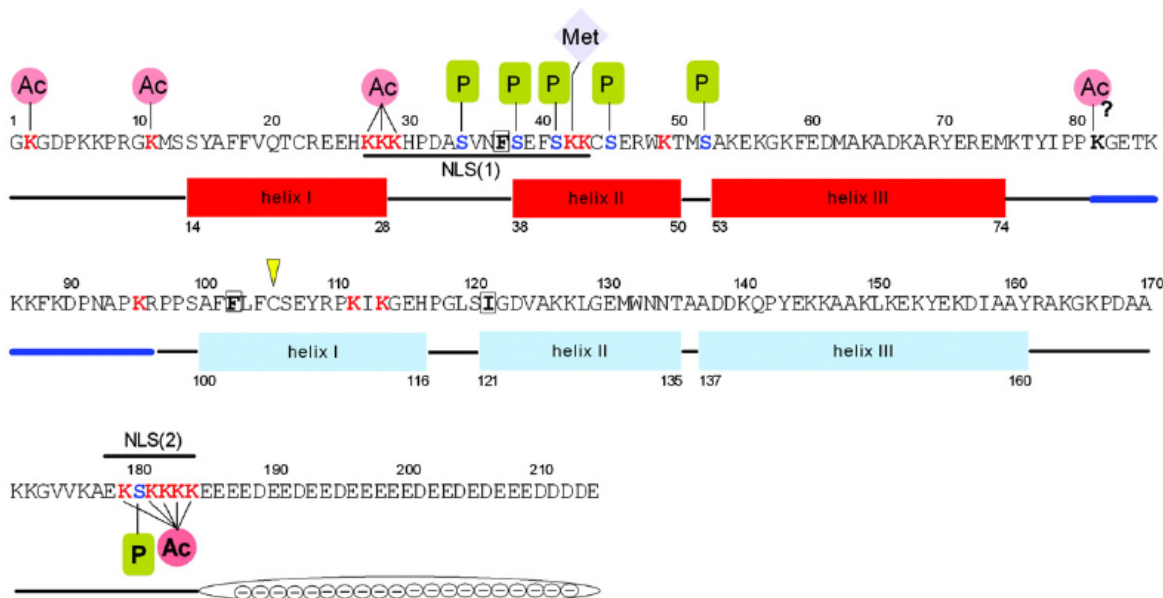


Figura 4.12: Estructura de la HMGB1 y sus modificaciones post-traduccionales [25] [26].

Se muestran la secuencia de los aminoácidos y las posiciones de las hélices α para cada box (box A en rojo y box B en azul) determinadas por espectroscopía de RMN. La zona ácida C-terminal se indica con un óvalo con cargas negativas. Los residuos de lisina que son objeto de modificaciones por acetilación están marcados con Ac y aquéllos que están implicados en la unión específica al ADN están marcados en rojo. La lisina 42 se modifica por metilación (Met). Los aminoácidos modificados por fosforilación están en azul y marcados con P.

Las proteínas HMGB tienen dos papeles diferentes, uno dentro del núcleo y otro extracelular. Dentro del núcleo pueden unirse al ADN, ya que reconocen una variedad de estructuras de ADN distorsionadas (cadena sencilla, uniones B-Z, cruciformes...) produciendo alteraciones estructurales, además de unirse a otras proteínas para facilitar procesos celulares. De esta manera participan en la regulación de la transcripción, recombinación y reparación del ADN. Las proteínas HMGB pueden fomentar la transcripción de numerosos genes por diferentes mecanismos: Uniéndose directamente al nucleosoma, facilitando la accesibilidad de complejos remodeladores o factores de transcripción (Figura 4.13), uniéndose al ADN promotor, doblándolo para incrementar la afinidad de unión de factores de transcripción (Figura 4.14: A-D-C), o finalmente, uniéndose a otras proteínas como factores de transcripción específicos, estabilizando la unión o bien promoviendo el reclutamiento de otras proteínas que también interactúan (Figura 4.14: A-B-C).

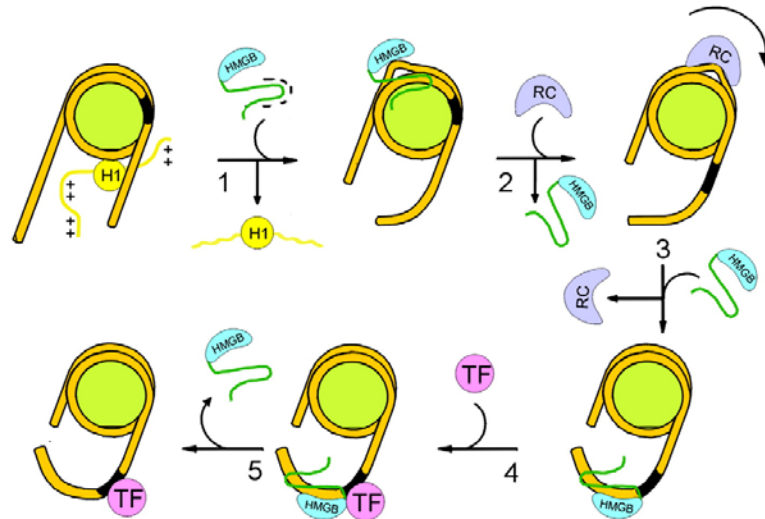


Figura 4.13: Transcripción de genes mediante la unión directa de HMGB al nucleosoma [30].

La HMGB desplaza la histona H1 en el nucleosoma, muy probablemente mediante la interacción de la zona ácida C-terminal de la HMGB, cargada negativamente, con las secuencias flanqueantes con carga positiva de la histona H1, debilitando la unión histona-ADN. La unión de la HMGB en el borde del nucleosoma provoca una flexión del ADN. Esta flexión representa un sitio de anclaje para el complejo remodelador (RC), cuya unión se ve reforzada por la HMGB. La región de secuencia específica (cuadro negro) se hace accesible para que el factor de transcripción (TF) se una. La HMGB puede facilitar la unión de TF al ADN.

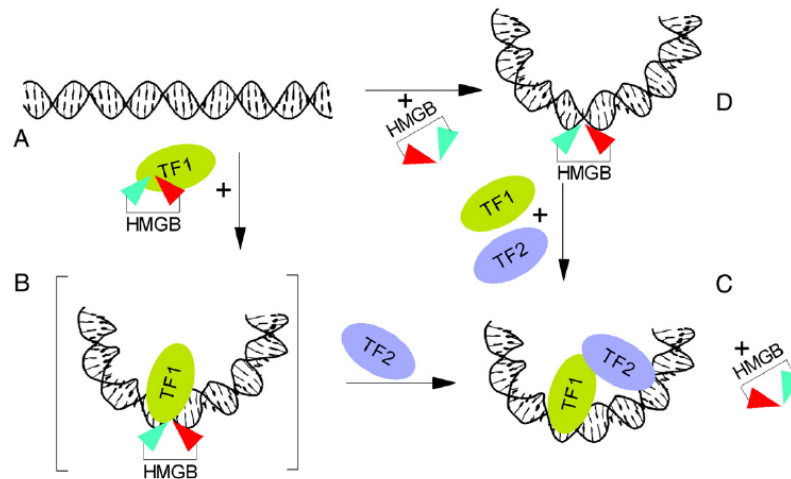


Figura 4.14: Diferentes mecanismos de transcripción de genes por mediación de la HMGB [30].

A-B-C: La HMGB interactúa con un factor de transcripción (TF1) y lo dirige a su unión específica con el ADN, el cual es doblado por la HMGB. En B se produce el complejo ternario ADN-HMGB-factor de transcripción. Otro factor de transcripción (TF2) es atraído hacia el complejo, seguido por la liberación de la HMGB. A-D-C: Como alternativa (D), el ADN es doblado por la HMGB, que permite la unión de los factores de transcripción al ADN sin interacciones directas con la HMGB.

Fuera del núcleo puede actuar como molécula de señal en la inflamación, en la diferenciación celular y en la metástasis de tumores. La sobreexpresión de la proteína HMGB1 se observa en los cánceres de mama, colon y gastrointestinales. Esto indica que podría ser que la HMGB1 estuviera implicada en la regulación de genes relacionados con el cáncer [31] [32]. La HMGB1 se libera en células necróticas y en células inflamatorias, uniéndose con alta afinidad a algunos receptores (RAGE, *receptor for advanced glycation end products*), promoviendo la inflamación [33].

Hasta ahora aún no se ha conseguido resolver la estructura de ningún complejo de ADN con los dos dominios HMG-box (A y B) de la proteína HMGB1, objetivo del presente proyecto. Únicamente se han conseguido resolver estructuras con uno de los dos dominios box, o de estructuras quiméricas. La Figura 4.15.A muestra una estructura obtenida mediante difracción de rayos X de la proteína HMGD de *Drosophila melanogaster* (entrada 1QRV en el *Protein Data Bank*). Esta proteína presenta un único dominio de unión al ADN con estructura similar al box B de las HMGB. La unión ADN-HMGD se caracteriza por enlaces van der Waals y enlaces de hidrógeno, produciendo una deformación fuerte y continua de la columna vertebral del ADN. El ángulo de doblado del ADN es de $111,1^\circ$ [34].

Por otra parte, la Figura 4.15.B corresponde a un complejo de ADN con una proteína quimérica, la SRY-box B, que contiene la proteína SRY y el box B de HMGB1 unidas por un *linker* (entrada 2GZK en el *Protein Data Bank*). Cada motivo induce una curvatura diferente al ADN, provocando un doblado global del ADN de unos $101,5^\circ$ [34].

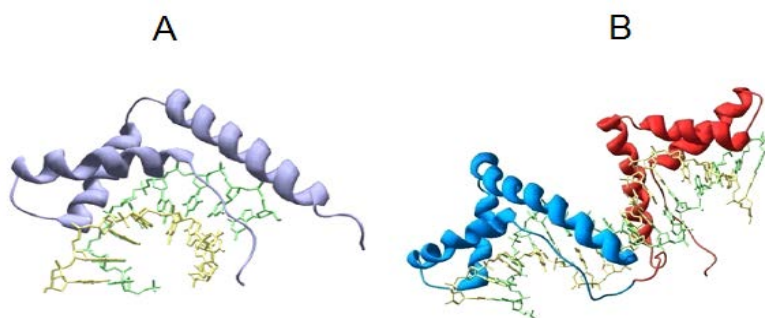


Figura 4.15: Interacciones proteína-ADN de las proteínas HMGD (A) y quimera SRY-box B (B).

La estructura A está resuelta mediante difracción de rayos X, mientras que la estructura B mediante RMN [34].

Recientemente se ha conseguido resolver en el grupo MACROM la estructura de un complejo del dominio box A de la HMGB1 unido al oligonucleótido ATATCGATAT a una resolución de 2 Å. En esta estructura, dos dominios box A se unen al ADN provocando un ángulo de doblado de 85° , la mayor distorsión en un único paso de la que se tiene constancia para un complejo del dominio HMG-box [18].

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Para comprender el mecanismo de acción de las proteínas HMGB1, es necesario determinar la estructura tridimensional de los complejos de estas proteínas con el ADN. Con esta finalidad, el objetivo de este proyecto es el de obtener cristales de la proteína HMGB1 con distintos oligonucleótidos.

La proteína HMGB1 se obtendrá a partir de su expresión en un cultivo bacteriano de *Escherichia coli* utilizando la tecnología del ADN recombinante. Posteriormente se purificará la proteína hasta obtener una proteína con una alta pureza apta para cristalografía.

Una vez obtenida una muestra de proteína muy pura, a partir de complejos ADN-proteína se obtendrán cristales empleando la técnica de difusión de vapor en gota colgante. Los cristales de calidad adecuada se difractarán con rayos X en las instalaciones de sincrotrón ALBA. Finalmente, se analizarán los datos obtenidos de la difracción y se tratará de resolver la estructura molecular por el método de reemplazamiento molecular y posterior refinamiento de la estructura encontrada.

En la Figura 5.1 se muestra el esquema simplificado de este procedimiento y en los siguientes apartados se desarrolla con más detalle.

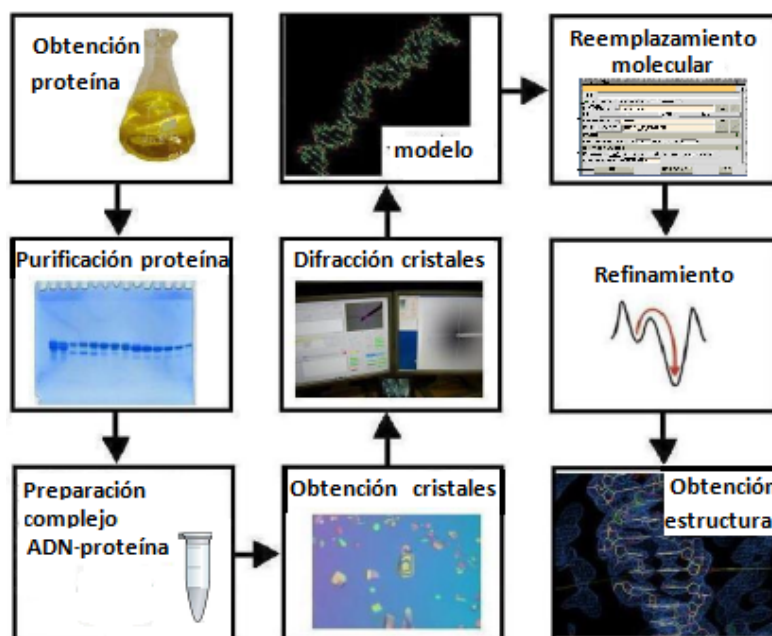


Figura 5.1: Esquema simplificado del procedimiento seguido hasta la resolución de la estructura de los complejos proteína-ADN.

Adaptado de [35].

5.1. Obtención de la proteína HMGB1 en *Escherichia coli*

Para obtener la proteína de interés se empleará la técnica del ADN recombinante, que permite la introducción de material genético en una célula de tal forma que ésta sea capaz de replicar y expresar este nuevo material genético. En este caso, el material genético introducido contiene un gen determinado que hará que las células transformadas (aquellas que incorporen el material genético correctamente) sean capaces de sintetizar la proteína deseada, en este caso la HMGB1. Concretamente se sintetizará la forma HMGB1(Δ 7-164), que contiene los dos box A y B.

La introducción del material genético se consigue a través de un vector de expresión o plásmido en una célula huésped. Este plásmido es una molécula de ADN circular, pequeña, estable, fácil de manipular y aislar y tiene la capacidad de replicarse independientemente de que la célula esté en fase de replicación (es independiente del cromosoma bacteriano). Como se ha dicho anteriormente, contiene el gen de la proteína de interés que se quiere sintetizar. Se utilizarán los vectores pGEX (*GST Gene Fusion System*). El sistema de fusión del gen de la Glutathion S-Transferasa (GST) permite la expresión de la proteína de interés fusionada con la proteína GST (a esta unión se le denomina proteína de fusión), que como se explicará más adelante (apartado 5.2.1), facilitará la purificación.

Es importante que el plásmido contenga además un marcador de selección, es decir, un gen que confiera una característica reconocible a la bacteria que la posea (como puede ser la resistencia a un antibiótico) para poder identificar y cultivar sólo aquellas células que hayan adquirido el plásmido, ya que el proceso de transformación de las células no es 100% efectivo. En este proyecto se ha usado como marcador de selección la resistencia al antibiótico ampicilina (conferida por la presencia del gen Amp^r en el plásmido (Figura 5.2)) debido a que la cepa utilizada es sensible a este antibiótico.

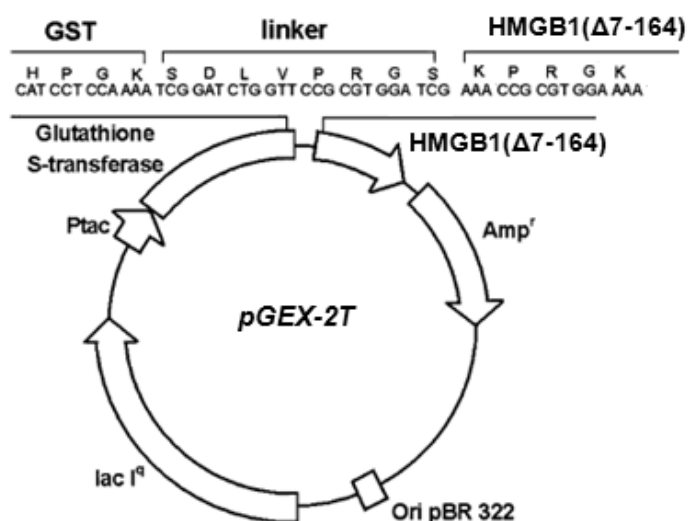


Figura 5.2: Esquema del plásmido pGEX-2T.

Contiene la secuencia que expresa la proteína de fusión GST-HMGB1(Δ 7-164) y el gen Amp^r que conferirá a la bacteria resistencia al antibiótico ampicilina. Además contiene el gen $lacI^q$ que codifica la proteína represora que se une al operador del promotor tac , previniendo la expresión de la proteína de fusión hasta la inducción por IPTG, manteniendo así un estricto control sobre la expresión de la proteína (ver anexo A.1). Dicho plásmido ha sido proporcionado por el laboratorio de la Dra. M.E.A. Churchill (*Department of Pharmacology, University of Colorado*) [36].

La célula huésped seleccionada ha de cumplir ciertos requisitos: Ha tener una elevada velocidad de crecimiento utilizando pocos nutrientes y ha de ser competente, es decir, ser capaz de incorporar el plásmido y mantenerlo estable durante la replicación. También ha de ser capaz de expresar correctamente la proteína durante la traducción. En este proyecto se ha utilizado la cepa Rosetta (DE3) pLysS de *Escherichia coli*, una de las más comunes para este fin. Esta cepa es resistente al antibiótico cloranfenicol pero es sensible a la ampicilina.

El plásmido se introduce en la célula competente con ayuda de un proceso físico o químico (proceso de transformación (Figura 5.3); se explica el protocolo en el apartado 5.1.1).

A partir de una colonia de células transformadas se inicia un cultivo en medio líquido. Cuando se considere que se tiene el número de células adecuado, se lleva a cabo la inducción de la expresión de la proteína en la célula huésped. Para ello se añade al medio IPTG (isopropil- β -D-tiogalactósido) (Figura 5.4), que es un análogo sintético de la lactosa no metabolizable (anexo A.1). Finalmente este cultivo se procesa para recuperar la proteína producida (ver apartados 5.1.2 y 5.2).

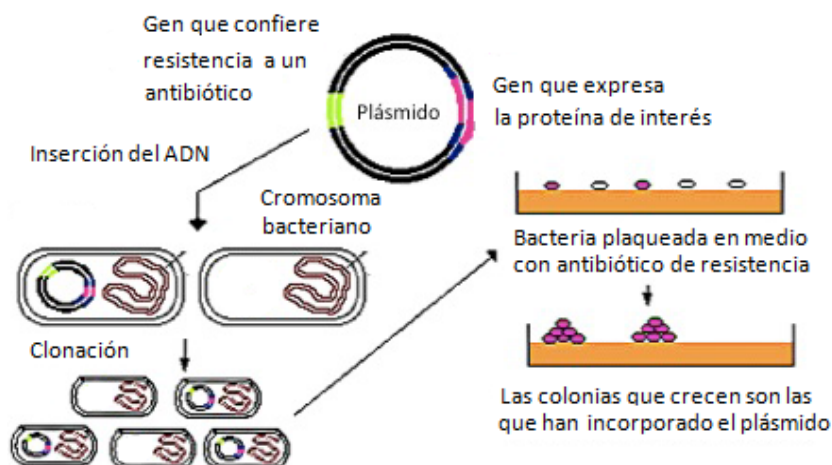


Figura 5.3: Esquema del proceso de transformación y selección de las células transformadas.
 El plásmido contiene *Amp^r*, un gen que confiere a la bacteria resistencia al antibiótico ampicilina, lo cual va a permitir seleccionar colonias de células transformadas al hacerlas crecer en un medio con ampicilina. Adaptado de [37].

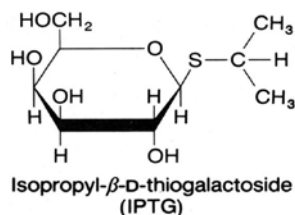


Figura 5.4: Fórmula química del IPTG.

<http://info.agscientific.com/blog/bid/96826/14-need-to-know-IPTG-faqs-and-protocols>. [Mar-2015]

5.1.1. Transformación, selección y expresión

A continuación se detalla el procedimiento experimental seguido para la transformación, selección, expresión de la proteína y su recuperación a partir del cultivo de *Escherichia coli*. Es muy importante que durante todo el protocolo se trabaje en condiciones de asepsia (tanto el material como las soluciones han de estar autoclavadas y hay que trabajar siempre cerca de la llama). El protocolo seguido para que las células sean competentes se detalla en el anexo A.2. La composición del medio de cultivo utilizado (LB) se puede ver en el anexo A.3.

Día 1: Transformación:

1. Se descongelan en hielo las células competentes de la cepa de *Escherichia coli* Rosetta(DE3)pLysS.

2. Se preparan dos tubos:
 - Control negativo (-): 100 μ L de células competentes.
 - Transformadas (+): 100 μ L de células competentes + 0,5 μ L de plásmido. (Se utilizó el plásmido de la Figura 5.2 a 83 ng/ μ L).
3. Dejar los tubos entre 10 y 20 min en hielo.
4. Choque térmico: Calentar los tubos durante 5 min a 37°C en baño de agua.
5. Dejar 2 min en hielo.

Observación: Con estas variaciones de temperatura tan bruscas se consigue facilitar la entrada del plásmido a las células competentes.

6. Agregar 1 mL de LB sin antibiótico e incubar 1 hora a 37°C en baño de agua, así las células se recuperan del choque térmico.
7. Centrifugar a 4.000 rpm en la centrífuga durante 2 min (aproximadamente 1.000 g). Las bacterias quedan depositadas en el fondo.
8. Eliminar el sobrenadante hasta dejar aproximadamente 100 μ L.
9. Resuspender las bacterias y sembrarlas sobre placas de agar con LB + antibiótico al cual tiene resistencia la cepa (cloranfenicol, Cam) más antibiótico al cual aporta resistencia el plásmido (ampicilina, Amp). Sus concentraciones son de 34 μ g/ μ L Cam y 50 μ g/ μ L Amp. Estas placas son cultivo en medio sólido.
10. Invertir la placa y colocarla en la estufa a 37°C O.N.

Estoc congelado de células transformadas: Puede interesar guardar un estoc de células ya transformadas para que, en otra ocasión en la que se desee expresar la misma proteína, se pueda comenzar el proceso en el momento del paso a medio líquido (Día 2). Para obtenerlo:

1. Picar una única colonia de bacterias transformadas sobre un tubo con 3 ml de LB + 34 μ g/ μ L Cam y 50 μ g/ μ L Amp.
2. Incubar a 37°C y agitación 250 rpm durante unas 6 horas (o hasta observar turbidez).
3. Congelar el cultivo bacteriano con glicerol (0,9 mL de cultivo + 0,3 mL de glicerol al 60% autoclavado).
4. Guardar a -80°C.

Día 2: Cultivo en medio líquido:

1. De la placa cultivada con células transformadas, picar una sola colonia en un tubo con 3 mL de LB + 34 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Cam y 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Amp.

Observación: Se debería observar que en la placa control no ha crecido ninguna célula, ya que las células no transformadas no son resistentes a la ampicilina. En caso de que se observaran colonias de bacterias, se debería repetir el experimento ya que no se puede asegurar que las colonias que han crecido en la placa de transformadas lo sean realmente.

Observación 2: Como alternativa, se puede iniciar la expresión de la proteína a partir del cultivo de bacterias transformadas y congeladas con glicerol. Para ello se rasca un poco de la superficie del estoc congelado con una punta de pipeta blanca estéril o con el asa de Kolle y se inocula sobre el tubo con 3 mL de LB + 34 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Cam y 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Amp.

2. Incubar a 37°C y con agitación 250 rpm durante unas 6 horas, hasta observar que el tubo se enturbie.
3. Inocular 3 mL de cultivo sobre 150 mL de LB + 34 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Cam y 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Amp, en un matraz de 500 mL.
4. Incubar a 37°C y con agitación 250 rpm O.N.

Día 3: Inducción de la expresión:

1. Inocular el volumen necesario de cultivo O.N. (unos 40 mL) en 1 L de LB atemperado + 34 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Cam y 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Amp (en un matraz Erlenmeyer de 3 L) para obtener una $\text{DO}_{600} = 0,1 - 0,2$.
2. Leer en el espectrofotómetro para ver que tenemos la DO_{600} deseada.
3. Incubar a 37°C y agitación 250 rpm hasta alcanzar una $\text{DO}_{600} = 0,8$.

Observación: A medida que las células crecen, el medio se va enturbiando. De vez en cuando se pipetea un pequeño volumen del cultivo (1 mL) en condiciones asépticas, para medir la absorbancia, hasta que el valor de DO_{600} sea de 0,8. Como referencia, se considera que en los primeros 30 minutos las células no crecen, y a partir de ahí, cada 30 minutos las células se van duplicando.

4. Añadir 0,5 mL de IPTG 1 M (concentración final 0,5 mM IPTG).

5. Incubar a 37°C y agitación 250 rpm durante 3 horas. Se irán tomando alícuotas para electroforesis como se explica más adelante.
6. Centrifugar a 4.000 rpm durante 10 min a 4°C (rotor SLA 3.000, Sorvall) para sedimentar las bacterias.
7. Descartar el sobrenadante (la proteína está en el interior de la célula).
8. Congelar el sedimento rápidamente en nitrógeno líquido y guardarlo en un tubo Falcon de 50 mL a -80°C hasta su procesado.

Tal y como se dijo en el punto 5, se tomarán alícuotas del cultivo tras la inducción de la proteína con IPTG (a 0 h, 1,5 h y 3 h después de la inducción) para medir la absorbancia y realizar controles electroforéticos del proceso en geles SDS-poliacrilamida (ver apartado 5.2.4). Para cada muestra se procederá de la siguiente manera:

- Separar 1 mL para medir la DO.
- De este volumen, separar 50 µL para electroforesis.
 - Centrifugar los 50 µL a 4.000 rpm durante 5 minutos en la microcentrífuga.
 - Descartar el sobrenadante.
 - Resuspender el sedimento en 15 µL de tampón de muestras para electroforesis.
- Guardar las muestras a -20°C hasta la realización de la electroforesis.

5.1.2. Tratamiento del sedimento bacteriano

Debido a que la proteína de interés es intracelular, se debe romper la célula para que libere su contenido. La ruptura celular se llevará a cabo mediante un sonicador, un aparato que posee una punta que se sumerge en la solución a homogeneizar y vibra a frecuencias ultrasónicas. Estas vibraciones de alta frecuencia causan cavitación (formación de pequeñas burbujas en el medio líquido) las cuales colapsan liberando su energía mecánica en forma de ondas de choque equivalente a miles de atmósferas de presión, rompiendo las células presentes en la suspensión. La proteína permanecerá en solución, de modo que para separarla de los restos insolubles, se centrifugará. El protocolo seguido es el siguiente:

1. Pasar el sedimento bacteriano, todavía congelado, a dos tubos Falcon siliconados de 50 mL (uno por litro).

2. Resuspender cada sedimento bacteriano de 1 L de cultivo en 25 mL de la solución de equilibrado de la columna de afinidad (ver Tabla 5.1) con inhibidores de proteasas (1/2 comprimido de *cOplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets*, Roche) para evitar que las proteasas de la célula ataquen la proteína de interés, y una punta de espátula de DNAsa para fragmentar las moléculas de ADN en caso de que no se llegase a conseguir al sonicar.
3. Sonicar el sedimento resuspendido durante 8 ciclos de 30 segundos al 45% de potencia máxima del equipo (Bandelin SONOPULS HD2200). Las muestras han de mantenerse en hielo durante la sonicación para evitar la desnaturalización de las proteínas provocada por el sobrecalentamiento.
4. Centrifugar a 12.000 rpm durante 45 minutos a 4°C (rotor SS34, Sorvall).
5. Descartar el sedimento. El sobrenadante ya está preparado para cargar en la columna de afinidad.

5.2. Purificación de la proteína HMGB1

La cromatografía es un proceso en el cual los componentes de una mezcla, disueltos en una fase móvil, se desplazan con diferentes velocidades a través de una fase estacionaria. Esta diferencia de velocidad es lo que va a permitir su separación. Las características de la matriz determinarán el tipo de cromatografía, y por tanto, la técnica de separación empleada. Es importante seleccionar una secuencia de cromatografías adecuada, aprovechando las propiedades de la muestra a concentrar y los contaminantes a eliminar. Una buena determinación de la secuencia permitirá reducir pasos en la etapa de purificación.

Una vez realizado el tratamiento del sedimento bacteriano descrito en el apartado anterior, se tiene una muestra que contiene la proteína de interés mezclada con otras proteínas solubles de origen bacteriano. Para conseguir el grado de pureza requerido para cristalizar la proteína, se llevará a cabo en primer lugar una cromatografía de afinidad GST, aprovechando la especificidad de unión a glutatión de las colas GST de la proteína de fusión. A continuación se realizará una cromatografía de intercambio catiónico aprovechando la carga positiva de las proteínas HMGB1, seguido de una cromatografía de exclusión molecular para separar la proteína de aquellas que tengan diferente tamaño.

5.2.1. Cromatografía de afinidad GST

La cromatografía de afinidad permite la separación de mezclas proteicas por su afinidad o capacidad de unión a un determinado ligando. En este caso, las proteínas que se retienen en la columna son aquellas que se unen específicamente a un ligando que previamente se ha unido covalentemente a la matriz de la columna.

Las proteínas con colas GST (Glutation S-Transferasa) se pueden purificar fácilmente utilizando una columna de afinidad cuya matriz está compuesta de sefarosa con la molécula de glutatión inmovilizada. Al cargar en la columna la muestra obtenida después del tratamiento del sedimento bacteriano, la cola GST de la proteína de fusión GST-HMGB1 se une al glutatión debido a su alta afinidad por este compuesto. Conviene resaltar que este paso no se hace en flujo continuo sino en semi-batch, es decir, se mezclan durante un tiempo adecuado y con agitación suave la muestra proteica con la matriz de la columna para facilitar la unión y, pasado este tiempo, la elución se hace por gravedad. Tras un lavado para acabar de eliminar las impurezas que no se unen a la matriz, se pasa a eluir la proteína.

La proteína de interés, que ha quedado retenida en la columna gracias a poseer la cola GST, se eluye o libera mediante el empleo de una solución que contiene un compuesto que rompe la interacción entre el ligando y la proteína. En este caso se cortará la cola GST mediante una proteasa que corta específicamente en el lugar deseado. La proteasa a utilizar es la enzima trombina (*GE Healthcare*) que corta específicamente la secuencia aminoacídica LVPR-GS, situada entre la cola de glutatión S-transferasa y el fragmento de HMGB1 (Figura 5.2). Este paso también se lleva a cabo en semi-batch, con el fin de darle tiempo a la trombina para que corte todas las colas GST. La proteína eluida (ya sin la cola GST) contendrá como impureza la enzima trombina añadida, no obstante ésta será separada en la siguiente cromatografía. Finalmente se regenerará la columna de Glutatión Sefarosa, es decir, se restablecen sus condiciones iniciales para poder utilizarla en otra ocasión. Para ello se desplazarán las colas GST unidas en la matriz de la columna añadiendo cloruro de guanidina. La Figura 5.5 muestra de forma esquemática los pasos seguidos en esta cromatografía y en la Tabla 5.1 se describen las soluciones utilizadas.

La matriz se ha empaquetado dentro de una columna de vidrio de capacidad 50 mL (Figura 5.6), que en su extremo inferior dispone de un filtro permeable capaz de retener la matriz pero que permite el flujo de la fase móvil. El volumen a empaquetar es de 6,5 mL, un volumen adecuado para tratar la muestra proveniente de la expresión de las células en dos litros de cultivo.

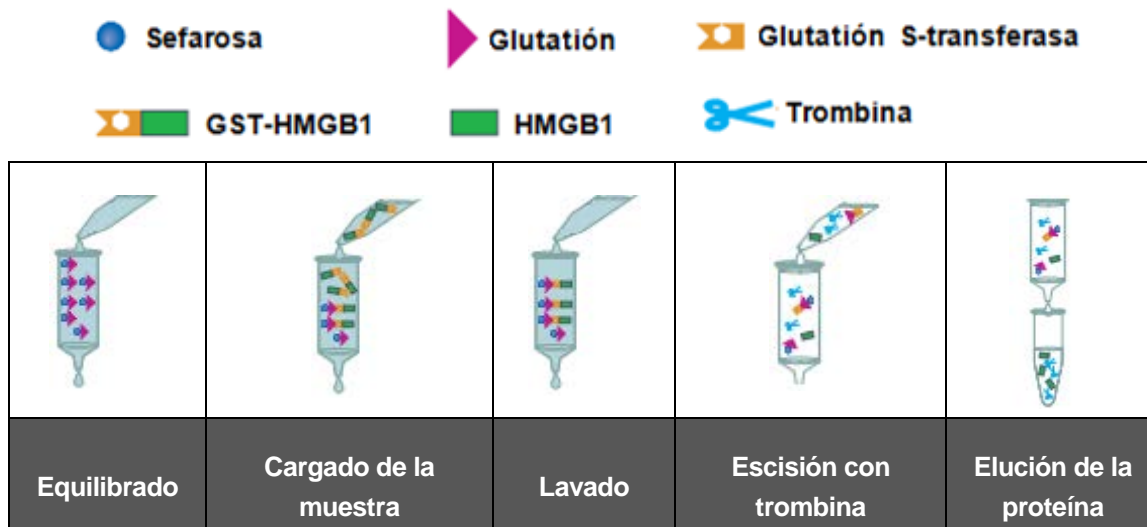


Figura 5.5: Esquema de la purificación de la proteína de fusión GST-HMGB1 utilizando una columna de glutación sefarosa.

Adaptado de GST *Gene Fusion Handbook* (GE Healthcare)



Figura 5.6: Columna de afinidad Glutación Sefarosa utilizada en el laboratorio.

Tabla 5.1: Características de la columna de cromatografía de afinidad Glutación Sefarosa.

Columna de afinidad	
Columna	Glutación Sefarosa 4B (GE Healthcare). Volumen de resina= 6,5 mL (para dos litros de cultivo)
Soluciones	Equilibrado: 500 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 mM DTT, 20 mM Tris pH=7,9, 10% glicerol.
	Lavado: 1 M NaCl, 10 mM EDTA, 1 mM DTT, 20 mM Tris pH=7,9.
	Tampón trombina: 100 mM NaCl, 2,5 mM CaCl ₂ , 1 mM DTT, 20 mM Tris pH=7,9.
	Elución: 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM Tris pH=7,9.
	Regeneración: 6 M cloruro de guanidina.

El protocolo seguido (para dos litros de cultivo) es el siguiente:

1. Equilibrar la matriz de Glutación Sefarosa de 6,5 mL haciendo pasar tres veces 50 mL de la solución de equilibrado.
2. Incubar el sobrenadante tras la sonicación sobre la matriz durante 2 horas a 4°C con agitación orbital.
3. Eluir el *flow through* por gravedad (FT).
4. Lavar con 5 volúmenes de la solución de lavado (pasar los volúmenes de la columna de uno en uno). Guardar el eluido (W).
5. Lavar con 3 volúmenes de la solución tampón trombina. Guardar el eluido (ThW).
6. Cortar la cola GST con 235 U de trombina (*GE Healthcare*) en 5 mL de la solución tampón trombina. Dejar incubando con agitación orbital suave O.N. a 4°C.
7. Añadir EDTA 0,5 M hasta llegar a una concentración final de 10 mM para terminar la reacción (20 µL/mL de la solución tampón trombina añadida en el paso 6).
8. Eluir el resultado de la escisión por gravedad (FTc).
9. Eluir la proteína con 3 volúmenes de la solución de elución y coleccionar en Falcons diferentes cada lavado (EIW1, EIW2, EIW3).
10. Tomar alícuotas de todas las muestras para analizarlas electroforéticamente.
11. Pasar 3 volúmenes de agua a la columna.

Observación: Aún no se regenera la columna hasta esperar a ver resultados de la electroforesis. De momento se guarda la columna a 4°C.

12. Pipetear 2 μ L de la matriz de la columna (beads) para analizar electroforéticamente.
13. Si los resultados de la electroforesis son correctos, regenerar la matriz de la columna pasando 3 volúmenes de 6 M de cloruro de guanidina y 3 volúmenes de agua. Si la columna no se va a usar en un tiempo, pasar también 3 volúmenes de etanol y conservar a 4°C.

La electroforesis se lleva a cabo para asegurar que el proceso de purificación se ha realizado correctamente. Una vez confirmado, se juntarán las fracciones que contengan la proteína de interés (FTc, EIW1, EIW2 y EIW3).

5.2.2. Cromatografía de intercambio catiónico

La muestra obtenida después de la columna de afinidad es bastante pura. Aun así todavía hace falta separar la proteína de la enzima trombina y de otras impurezas que no se han conseguido eliminar en el paso anterior. Por eso a continuación se utilizará una columna de intercambio iónico. En esta cromatografía, la fase estacionaria contiene grupos funcionales ionizables que interactúan electrostáticamente con iones de signo contrario presentes en la fase móvil. En función de la carga de la fase estacionaria, existen la cromatografía de intercambio aniónico y catiónico. La cromatografía de intercambio aniónico retiene aniones ya que la fase estacionaria contiene grupos funcionales cargados positivamente. En cambio la cromatografía de intercambio catiónico retiene cationes ya que los grupos funcionales de la fase estacionaria están cargados negativamente (Figura 5.7.A). En este caso, la proteína HMGB1 tiene carga neta positiva, de modo que se ha utilizado una cromatografía de intercambio catiónico. Esta cromatografía se desarrolla en tres etapas bien diferenciadas:

- Equilibrado de la fase estacionaria: En esta etapa, los grupos con carga de la fase estacionaria están unidos a los contraiones (cationes en este caso). El contraión usado es el sodio.
- Aplicación de la muestra y lavado: La muestra debe estar en la misma disolución empleada para equilibrar la columna. Se debe centrifugar la muestra antes de cargarla en la columna para eliminar posibles restos insolubles que podrían obstruir la columna. La proteína HMGB1, al tener carga neta positiva, desplazará a los contraiones y se unirá a la fase estacionaria de la columna, mientras que las proteínas con la misma carga que la matriz o carga neutra no se unirán y por tanto son eluidas durante el lavado.

- Elución de las proteínas unidas a la matriz: Mediante un gradiente de concentración ascendente, el contraíón desplaza en primer lugar a las proteínas menos cargadas y finalmente a las más cargadas debido a la competencia dada por los contraíones.

A continuación, se debe regenerar la columna si se desea volver a utilizarla. Para ello, se pasan al menos 10 volúmenes de la solución de equilibrado por volumen empaquetado de columna.

Se utilizará una columna HiTrap SP FF (*GE Healthcare*) de 5 mL de volumen de resina empaquetada (Figura 5.7.B). Esta columna se adquiere ya empaquetada, y contiene como matriz sefarosa con el grupo sulfopropil (SP) como intercambiador catiónico fuerte.



Figura 5.7: Columna de intercambio catiónico.

A: Dibujo esquemático del principio de separación de una columna de intercambio catiónico. Las moléculas con carga neta positiva (azul) quedan retenidas en la matriz de la columna de carga negativa (gris), mientras que las moléculas neutras (amarillas) o de carga neta negativa (rosa) no se unen y por lo tanto eluyen. <http://elblogdeadepe.blogspot.com.es/p/resumen-analisis-bioquimico-fundamentos.html> [Abr-15].

B: Columna de intercambio catiónico HiTrap SP FF (*GE Healthcare*)
https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Images/ProductImages/Files/USMM-86MKE5-1331038597998.jpg [Abr-15]

Esta cromatografía se ha llevado a cabo en un equipo de cromatografía de media presión FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) ÄKTA Purifier 10 (*GE Healthcare*). Este equipo permite el cargado automático de la muestra a la columna, la dosificación de las soluciones a la columna, recogida de las fracciones mediante un colector de fracciones automático programado para recoger un volumen determinado en cada tubo y lectura de las absorbancias a tres longitudes de onda de forma simultánea durante la cromatografía. Para evitar la entrada de aire o partículas es esencial que todas las soluciones se filtren (0,2 μm) y se desgasifiquen antes de usar. La carga de la muestra y el volumen dependen de la columna a utilizar. Con motivo de la naturaleza biológica de las muestras y las características de las columnas, la cromatografía se llevará a cabo a 4°C.

El esquema de su funcionamiento se puede ver en la Figura 5.8 y en la Figura 5.9 se muestra una imagen del equipo. Las soluciones utilizadas en esta columna se indican en la Tabla 5.2.

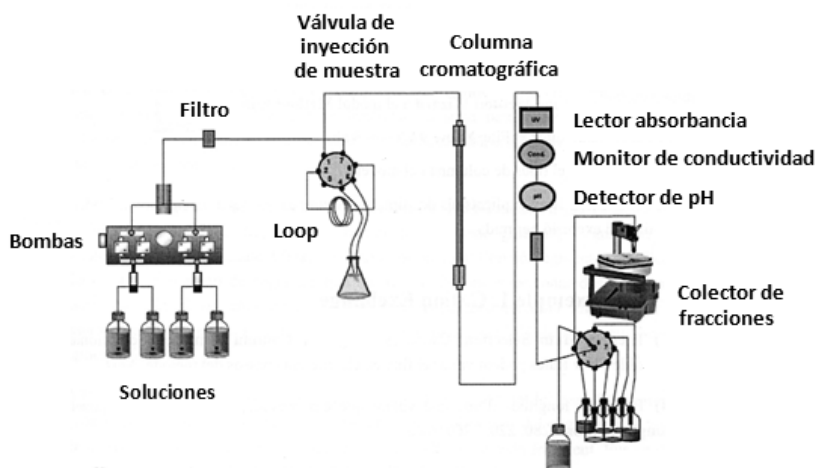


Figura 5.8: Esquema del sistema FPLC ÄKTA Purifier 10.

Las soluciones (previamente filtradas y desgasificadas) están conectadas a las bombas que las impulsarán a la columna cromatográfica. La muestra se carga utilizando una jeringa en la válvula de inyección de muestra y se carga a la columna cromatográfica correspondiente. Se ha de usar un loop de volumen apropiado al volumen de la muestra. A la salida de la columna se pueden medir la absorbancia, conductividad y pH. Las fracciones se pueden recoger automáticamente gracias al colector de fracciones.



Figura 5.9: Equipo ÄKTA Purifier (izquierda) y colector de fracciones (derecha).

Disponible en: www.gelifesciences.com [Abr-2015]

Tabla 5.2: Características de la columna de cromatografía de intercambio catiónico.

Columna de intercambio catiónico	
Columna	HiTrap SP FF (GE Healthcare). Volumen de resina= 5 mL
Soluciones	Equilibrado: 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM Tris pH=7,9. Elución: 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM Tris pH=7,9.

A continuación se describen los detalles del procedimiento.

Preparación de la columna: Se lavan los tubos del equipo con agua y después con las soluciones de equilibrado y elución. Se conecta la columna y se equilibra con 1 volumen de la solución de equilibrado, seguido de 5 volúmenes de la solución de elución y finalmente 10 volúmenes de la solución de equilibrado (ver composiciones en Tabla 5.2).

Preparación de la muestra: La muestra se centrifuga a 12.000 rpm durante 10 minutos (rotor SS34, Sorvall) para eliminar restos insolubles que puedan obstruir la columna. El sobrenadante se recoge en un Falcon de 50 mL y representa la muestra lista para cargar en la columna. La muestra contiene la proteína disuelta en 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 mM DTT y 10 mM Tris pH=7,9.

Carga de la muestra: En primer lugar se ha de escoger el loop en el que se inyectará la muestra (Figura 5.8). Su tamaño dependerá del volumen de la muestra. En nuestro caso se ha usado un loop de 10 mL. Este loop se lava primero con agua y después con la solución de equilibrado (aproximadamente con dos volúmenes del tamaño del loop). Si la muestra es de un volumen superior al del loop, se cargará a la columna mediante varias inyecciones. La bomba peristáltica introducirá cada inyección de muestra a la columna impulsando unos 15 mL de la solución de equilibrado a un flujo constante de 2 mL/min. Esta columna sólo puede aguantar una presión máxima de 0,3 MPa y, en caso de superarse, se detiene automáticamente el sistema para no dañar la columna, debiendo bajar el flujo para continuar con la cromatografía. Una vez cargada la muestra se pone en marcha el sistema de recolección de muestras. Se programa el equipo para recoger fracciones de 2 mL.

Elución de las fracciones: Una vez cargada la muestra total sobre la columna, se programa en el equipo cromatográfico el gradiente utilizado para la elución. El contraión a utilizar es el sodio y las fracciones se van a eluir con concentraciones crecientes de NaCl. La elución se produce con un gradiente continuo de 90 mL (unos 18,8 volúmenes respecto al volumen de la columna) partiendo de 100 mM de NaCl (solución de equilibrado) hasta 1 M de NaCl (solución de elución) (Tabla 5.2). Tras finalizar la cromatografía, se lava la columna con 5 volúmenes de agua y 10 volúmenes de etanol a un flujo de 1 mL/min y se guarda a 4°C.

Lectura de absorbancias: Debido a que el tiempo de retención de una proteína no es un parámetro exacto y debido a que toda su elución no se produce en una sola fracción sino en forma de distribución normal, se debe medir la absorbancia y elaborar un cromatograma para conocer qué fracciones contienen proteína. Como se dijo antes, este equipo permite medir simultáneamente la absorbancia a tres longitudes de onda diferentes. Estas longitudes van a ser 220 nm (para la detección de enlace peptídico), 260 nm (para la detección de ADN) y 280 nm (para la detección de proteínas con grupos aromáticos). Como la proteína HMGB1 presenta grupos aromáticos, a medida que el gradiente de concentración va aumentando, se verá en el cromatograma un pico de absorbancia a 280 nm. Se guardan

estas fracciones y se toma una muestra de cada una de ellas para electroforesis. En función de los resultados del análisis electroforético, se juntan y concentran las fracciones con mayor pureza.

5.2.3. Cromatografía de exclusión molecular

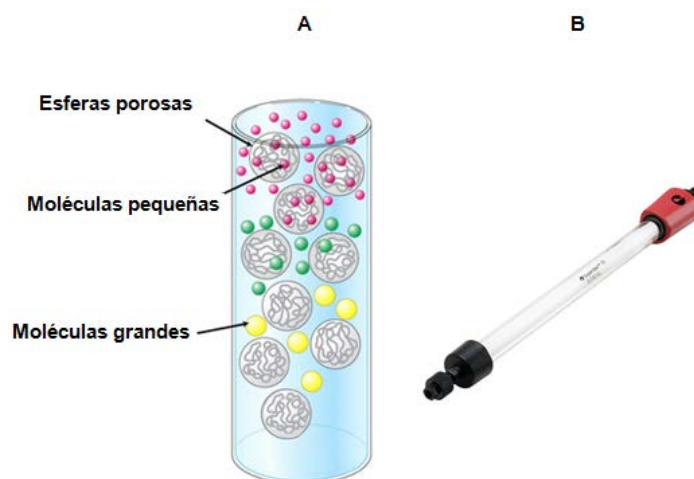
A continuación se realizará una columna de exclusión molecular, para terminar de purificar la muestra. Esta cromatografía (también llamada filtración en gel) permite separar diferentes moléculas según su masa molecular. En esta técnica la fase estacionaria es un gel cuya matriz consta de un gran número de esferas porosas microscópicas de polímeros altamente hidrofílicos como polisacáridos o poliacrilamidas. Estos poros permiten la entrada de las moléculas pequeñas, retrasándolas, de modo que las moléculas grandes, que no pueden entrar en estos poros, pasan a través de la columna más fácilmente y eluyen antes que las pequeñas, al hacer menos recorrido (Figura 5.10.A). Esta técnica se suele utilizar muy a menudo como etapa final de purificación, a modo de afinamiento.

A diferencia de las cromatografías anteriores, en ésta la proteína no se une a la matriz de la columna, de modo que la composición de la solución no afecta directamente a la resolución (grado de separación entre picos del cromatograma). Por esto, tanto la solución de equilibrado como la de elución será la misma. La resolución de la cromatografía, y por tanto la buena separación entre la proteína y otras impurezas depende de numerosos factores como el volumen de la muestra, relación entre el volumen de la muestra y el de la columna, dimensiones de la columna, tamaño de las micropartículas y su distribución y densidad, tamaño de los poros, el flujo y la viscosidad de la muestra.

Se utilizará la columna HiLoad Superdex 75 10/300 GL (*GE Healthcare*) con 24 mL de columna ya empaquetada, específica para purificar proteínas con masa molecular entre 3.000 y 70.000 Da (Figura 5.10.B). Esta columna es adecuada para la purificación de HMGB1(Δ 7-164), ya que ésta tiene una masa molecular de 18.484 Da. La matriz contiene agarosa y dextrano entrecruzado. Para esta columna se recomienda cargar un volumen de muestra entre 25-500 μ L y una concentración de proteína en la muestra inferior a 10 mg, para optimizar la resolución. Por eso es necesario concentrar las muestras eluidas de la cromatografía de intercambio catiónico antes de realizar la cromatografía de exclusión molecular. Esta cromatografía también se llevará a cabo utilizando el sistema ÄKTA Purifier 10 (*GE Healthcare*) y se utilizará la solución que se muestra en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3: Características de la columna de cromatografía de exclusión molecular.

Columna de exclusión molecular (Gel filtración)	
Columna	HiLoad Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare). Volumen de resina= 24 mL
Soluciones	Equilibrado y elución: 150 mM NaCl, 50 mM HEPES pH=7,4, 1 mM DTT.

**Figura 5.10: Columna de exclusión molecular.**

A: Dibujo esquemático del principio de separación de una columna de exclusión molecular. Se ve el comportamiento de las moléculas de diferentes tamaños en la matriz.

B: Columna de exclusión molecular HiLoad Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare).

<http://www3.gehealthcare.cn/~media/images/china%20image/life%20science%20china/level%207/pre%20superdex%20hiload.png?w=646> [Abr-2015]

A continuación se describen los detalles del procedimiento.

Preparación de la columna: Se lavan los tubos del equipo con agua y después con la solución de equilibrado y elución. Se conecta la columna, se lava con 2 volúmenes de agua y se equilibra con 2 volúmenes de solución de equilibrado y elución.

Preparación de la muestra: La muestra se ha de concentrar considerando que el volumen de la muestra ha de ser entre 25-500 μ L y una cantidad de proteína en la muestra inferior a 10 mg. A continuación se centrifuga a 12.000 rpm durante 10 minutos en la microcentrífuga para eliminar restos insolubles que puedan obstruir la columna. El sobrenadante obtenido ya se puede cargar en la columna.

Carga de la muestra: Se utilizará el loop de 500 μ L. Para cada run sólo será necesaria una inyección de la muestra. La presión máxima que puede soportar la columna es 1,8 MPa. Se recomienda utilizar un flujo de 0,5-1 mL/min.

Elución de las fracciones: Para llevar a cabo esta cromatografía, una vez cargada la muestra se hacen pasar aproximadamente 1,5 volúmenes de la solución de equilibrado y elución por volumen de columna empaquetada. Las fracciones eluidas en este caso serán de 0,5 mL. Tras finalizar la cromatografía, se lava la columna con 2 volúmenes de agua y 2 volúmenes de etanol a un flujo de 0,5 mL/min y se conserva a temperatura ambiente.

Lecturas de absorbancias: Como en la cromatografía de intercambio catiónico, se medirán las absorbancias a 220, 260 y 280 nm y se analizarán electroforéticamente las fracciones que presenten picos de absorbancia a 280 nm. Las fracciones más puras se juntarán y concentrarán.

5.2.4. Análisis electroforético de las fracciones en geles SDS-PAGE

La electroforesis es una técnica que nos permite separar e identificar moléculas (comúnmente proteínas o ácidos nucleicos) basándose en la migración diferencial de moléculas cargadas bajo la acción de un campo eléctrico. Así, se analiza la presencia y pureza de las muestras en cada etapa de purificación. La velocidad de migración de las moléculas depende de su carga, tamaño y forma, así como de la fuerza del campo eléctrico y de la porosidad del soporte. A medida que se va realizando la electroforesis, la muestra (cargada en la parte superior del gel) se va desplazando según su carga a la parte inferior, impulsada por el campo eléctrico. Los elementos necesarios para llevar a cabo una separación electroforética son:

- Una fuente de tensión, que proporciona un campo eléctrico mediante dos electrodos (cátodo y ánodo) entre los que produce una diferencia de potencial. Cuanto mayor sea la tensión, mayor es la velocidad de migración de las moléculas.
- Una cubeta electroforética, que contiene los electrodos en los lados opuestos.
- Un soporte electroforético (en este caso un gel de poliacrilamida).
- Tampón de electroforesis.

El gel de poliacrilamida (PAGE, *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) es una malla entrecruzada de largas cadenas de monómeros de acrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) con N-N-metilenbisacrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$). El primer compuesto es el monómero, es decir, es la unidad básica para la formación de largas cadenas de poliacrilamida, mientras que el segundo compuesto tiene la función de controlar el entrecruzamiento de las cadenas de poliacrilamida mediante su unión de forma covalente. Cuanto mayor sea la concentración de acrilamida, más denso es el entramado y por lo tanto ofrece más resistencia al paso de moléculas, por lo tanto, migrarán con más dificultad.

La reacción de polimerización está catalizada por persulfato amónico (PSA) y N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED). El TEMED cataliza la formación de radicales libres del PSA. Debido a la acción de iones persulfato, se producen radicales libres de oxígeno, que forman los radicales libres del monómero, produciéndose la reacción de polimerización (Figura 5.11).

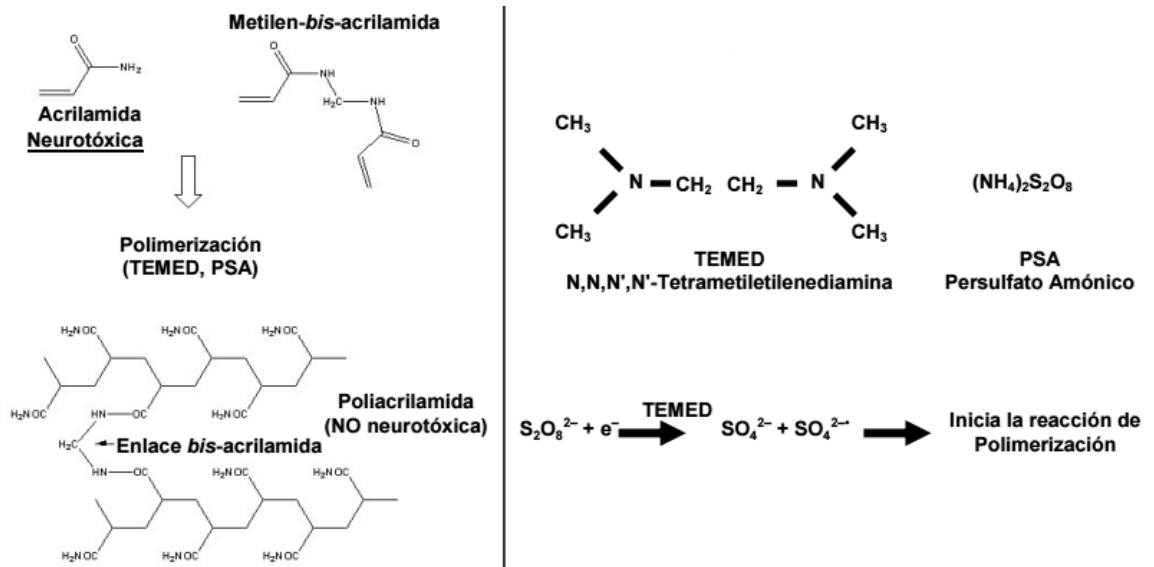


Figura 5.11: Reacción de polimerización de la acrilamida

<http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/16%20ELECTROFORESIS%20GELES%20PAA.pdf>
[Abr-2015]

Los geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) se realizarán utilizando el protocolo de sistema discontinuo introducido por Laemmli [38]. Este tipo de geles se preparan de forma discontinua en dos partes (Figura 5.12):

- Parte apiladora (stacking gel). Es la parte superior del gel y contiene una baja concentración de acrilamida, por lo tanto no ofrece mucha resistencia al paso de moléculas. En esta zona las proteínas se concentran.
- Parte separadora (resolving o running gel). Esta parte del gel contiene mayor concentración de acrilamida, por lo tanto ofrece más resistencia al paso de moléculas. Aquí es donde realmente se produce la separación de las moléculas en función de su masa molecular.

El SDS (dodecil sulfato de sodio) es un detergente aniónico que desnaturaliza las proteínas y las recubre, confiriéndoles carga neta negativa proporcional a su masa (Figura 5.13). De esta manera, todas las proteínas migrarán hacia el polo positivo (situado en la parte inferior del gel) a una velocidad inversamente proporcional a su tamaño. Se une una molécula de SDS cada dos aminoácidos de una proteína (es decir, hay aproximadamente 1,4 g de SDS por gramo de proteína). La unión SDS-proteína es crítica para conseguir una buena migración electroforética.

- Montaje y preparación de los geles SDS-PAGE:

En primer lugar se prepara el molde, que es donde polimerizará el gel. Para ello, se utilizan dos vidrios entre los cuales se colocan unos separadores de grosor variable (normalmente de 0,75 mm o 1,5 mm) que determinarán el grosor del gel. Para evitar pérdidas, se sellan los laterales y la parte inferior con una goma. El conjunto se mantiene unido mediante pinzas.

Una vez preparado el molde, se comprueba que no haya pérdidas añadiéndole agua. Tras comprobarlo, se retira el agua, se seca con papel de filtro y se comienza a preparar el gel. Primero se prepara la parte inferior del gel, el gel separador (Tabla 5.4) y se añade en el molde hasta una altura de 0,5 cm por debajo del nivel del peine. Rápidamente se ha de adicionar una fina capa de isopropanol para evitar el contacto con el oxígeno ya que ralentiza la polimerización y para conseguir que quede una interfase plana. Una vez polimerizado, se retira el isopropanol, se lava con agua y se seca con papel de filtro.

A continuación se prepara la parte superior (el gel apilador) (Tabla 5.4), se vierte en el molde y se coloca rápidamente el peine, del mismo grosor que los separadores, y con un número y tamaño de dientes que determinará el número y volumen de las muestras que se podrán cargar en el gel.

Una vez acabada la polimerización, se llena la parte inferior de la cubeta de electroforesis con tampón de cubeta (Tabla 5.5). Se retiran tanto las pinzas como la goma y se fija el gel en la cubeta. Es importante colocarlo de tal forma que en la parte inferior no se formen burbujas. A continuación se añade tampón de cubeta en la parte superior y se retira el peine, obteniendo los pozos donde se depositarán las muestras a analizar. La Figura 5.12 muestra un ejemplo típico de montaje del gel para electroforesis.

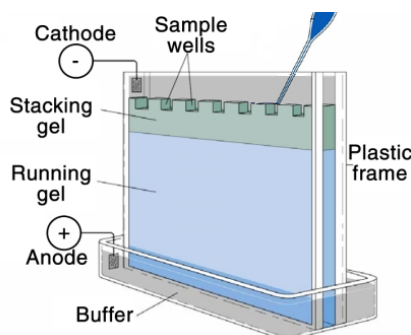


Figura 5.12: Montaje típico gel de poliacrilamida-SDS.

En primer lugar se prepara la parte separadora y una vez que gelifique, se prepara la parte apiladora. Como el SDS recubre a las proteínas con carga negativa, el ánodo debe colocarse en la parte inferior.

Adaptado de http://www.sapd.es/revista/article.php?file=vol33_n3/03. [Abr-2015]

- Preparación de la muestra:

La muestra se disuelve en tampón de muestras (Tabla 5.6), el cual contiene azul de bromofenol, un colorante que permite poder visualizar la migración. También contiene β -mercaptoetanol, un agente reductor que deshace los enlaces disulfuro que forman las cisteínas de la proteína (Figura 5.13), y glicerol para dar densidad a la mezcla. Para facilitar el desplegamiento de la proteína y la unión de SDS con las proteínas, es necesario hervir la muestra durante 6 minutos antes de cargarla en el gel. La cantidad de proteína cargada ha de ser del orden de 1-20 μ g, para poder detectarla. La muestra se carga en los pozos del gel mediante una jeringa Hamilton. Para que las muestras corran a través del gel, se aplica un campo eléctrico constante entre 100 y 130 V. Cuando se observa que la banda de colorante (frente de migración) se encuentra a 1 cm aproximadamente del final del gel, se puede finalizar la electroforesis.

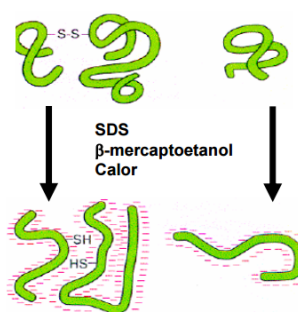


Figura 5.13: El tratamiento de las muestras con agentes desnaturalizantes (SDS) provoca la desnaturalización de las proteínas, pérdida de estructura secundaria y la disociación de las subunidades. Las proteínas quedan cargadas negativamente y migran del polo negativo al positivo durante la electroforesis. <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/16%20ELECTROFORESIS%20GELES%20PAA.pdf> [Abr-2015]

Tabla 5.4: Composición de los geles de poliacrilamida-SDS.

Gel poliacrilamida-SDS		
Reactivos	Separador (10 ml) (15% Acrilamida, 0,4% Bisacrilamida, 0,375 M Tris, 0,1% SDS)	Apilador (3ml) (6% Acrilamida, 0,16% Bisacrilamida, 0,125 M Tris, 0,1% SDS)
Solución A	5 mL	0.6 mL
Solución B	2,5 mL	-
Solución C	100 µL	30 µL
Solución D	-	0,75 mL
H ₂ O	2,3 mL	1,59 mL
TEMED	4,5 µL	3 µL
PSA 10%	75 µL	30 µL
Solución A: Acrilamida 30%, bisacrilamida 0,8%. Solución B: 1,5 M Tris-HCl, pH=8,8. Solución C: 10% SDS. Solución D: 0,5 M Tris-HCl pH=6,8.		

Tabla 5.5: Composición del tampón de cubeta para electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.

Tampón de cubeta para el gel de poliacrilamida-SDS		
Reactivo	5x (1 litro)	Concentración 1x
Tris	30 g	0,01 M
Glicina	144 g	0,075 M
SDS	5 g	0,02 %

Tabla 5.6: Composición del tampón de muestras para electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.

Tampón de muestras para geles de poliacrilamida-SDS		
Reactivo	4x (10 ml)	Concentración 1x
Tris 2M pH=6,8	1,25 mL	62 mM
Glicerol	4 mL	10%
SDS	0,8 g	2%
2-mercaptoetanol	2 mL	5%
Azul de bromofenol	Punta de espátula	Concentración correspondiente

- Detección de las proteínas:

Para poder visualizar las proteínas separadas en el gel, éstas se tienen que teñir. Una vez finalizada la electroforesis, se retira el gel de la cubeta y se separa del molde. El gel se tiñe sumergiéndolo en una solución colorante que contiene azul de Coomassie, isopropanol y ácido acético (Tabla 5.7). Esta solución fija las proteínas en el gel y permite su tinción.

La tinción se lleva a cabo durante una hora aproximadamente con agitación orbital. Pasado este tiempo, todo el gel queda impregnado de un azul intenso, de modo que hace falta desteñirlo para eliminar el exceso de colorante. El gel se sumerge en la solución desteñidora (Tabla 5.8) y se deja agitando durante toda la noche. Al día siguiente se obtiene un gel transparente con bandas azules, que corresponden a las bandas de proteína.

Tabla 5.7: Composición de la solución de tinción para geles de poliacrilamida-SDS.

Solución de tinción para geles de poliacrilamida-SDS		
Reactivos	Para 2 litros	Concentración
Isopropanol	500 mL	25%
Ácido acético	200 mL	10%
Azul de Coomassie	5 g	0,25%

Tabla 5.8: Composición de la solución desteñidora para geles de poliacrilamida-SDS.

Solución desteñidora para geles de poliacrilamida-SDS		
Reactivos	Para 2 litros	Concentración
Isopropanol	200 mL	10%
Ácido acético	200 mL	10%

Para ayudar a identificar la banda de la proteína de interés, es útil cargar también en el gel un marcador de masas moleculares (MWM, *molecular weight marker*) y comparar la movilidad electroforética de la muestra con la de las proteínas estándar del marcador. En concreto se utilizará el MW-SDS-6 DALTON MARK VI (Sigma) (Tabla 5.9).

Tabla 5.9: Proteínas que contiene el marcador de masas moleculares MW-SDS-6 DALTON MARK VI (Sigma) y sus valores aproximados de masas moleculares.

Proteína	Masa molecular aproximada
Lisozima	14.300
β -Lactoglobulina	18.400
Tripsinogeno	24.000
Pepsina ¹	34.700
Ovoalbúmina	45.000
Albúmina	66.000

¹ En geles SDS-PAGE realizados según el método de Laemmli, la proteína pepsina se comporta de forma anómala, migrando aproximadamente como la ovoalbúmina, de modo que la banda de 34.700 no se puede observar.

- Conservación del gel:

Por último, se puede conservar el gel secándolo. Para ello, se humedece una capa de papel de celofán y se cubre un vidrio con ella. A continuación se coloca el gel sobre el papel de celofán y se cubre con otro papel de celofán húmedo, procurando que no queden burbujas. Se sujeta con unas pinzas y se deja secar durante al menos un par de días.

5.2.5. Concentración de las fracciones

Este proceso de concentración se ha realizado en este proyecto por dos motivos: En primer lugar se concentran las muestras provenientes de la columna de intercambio catiónico para disminuir el volumen de las muestras a cargar en la columna de exclusión molecular, debido a especificaciones de esta columna. En segundo lugar, se concentra la muestra tras la última etapa de purificación cromatográfica para obtener muestras, además de puras, suficientemente concentradas para cristalización. En este último caso, los concentradores aparte de realizar la función de concentrar la muestra, permitirán cambiar la solución de la muestra, y así poder mantener las proteínas en un medio menos concentrado en sales.

Los dispositivos de concentración de muestras biológicas utilizados en este proyecto son los Vivaspin® (Figura 5.14), los cuales cuentan con un par de membranas verticales idénticas y operan mediante la centrifugación en rotores de ángulo fijo o basculante. El tamaño del poro de la membrana (MWCO, *Molecular Weight Cut Off*) es una característica específica del concentrador y se ha de elegir en función del tamaño de la proteína que se quiere concentrar. Así, la fuerza centrífuga impulsa a través de la membrana los solventes y los solutos de menor valor de masa molecular que el valor MWCO, pasando al depósito de filtrado (a este volumen se le llama filtrado) mientras que los solutos de mayor valor de masa molecular que el valor MWCO quedan retenidos por la membrana. La membrana vertical garantiza un bloqueo mínimo durante el proceso de filtración.

En este caso, la masa molecular de la proteína HMGB1(Δ 7-164) es de 18.484 Da. Según las instrucciones del concentrador, el MWCO ha de ser como máximo un 50% inferior a la masa molecular de la especie a concentrar, por ello se usará un MWCO de 5.000. Además, según los volúmenes de la muestra, se utilizaron dos tipos de Vivaspin®. En la Tabla 5.10 se muestran las principales especificaciones de los dos tipos de concentradores utilizados. Los Vivaspin®, como se dijo anteriormente, permiten además la posibilidad de realizar el proceso de diafiltración, permitiendo el cambio de solución de la muestra.



Figura 5.14: Concentradores Vivaspin®.

Izquierda: Vivaspin® de diferentes tamaños en función del volumen a tratar. El principio de funcionamiento en ambos es el mismo. Derecha: Esquema de las partes que componen un Vivaspin®.

http://www.4008100881.com/bbs/attachments/month_0911/0911291524c86e2aaf677316d5.png [May-2015]

Tabla 5.10: Características técnicas de los concentradores Vivaspin® utilizados en este proyecto.

Nombre comercial	Tipo	MWCO	Capacidad	Máxima fuerza centrífuga permitida (ángulo fijo)	Límite volumen final
Vivaspin®	20	5.000	20 mL	8.000 g	50 µL
Vivaspin®	4	5.000	4 mL	10.000 g	20 µL

Para el caso de las muestras provenientes de la columna de intercambio catiónico, sólo se concentrarán para disminuir el volumen hasta un valor adecuado para cargar en la columna de exclusión molecular. El protocolo seguido se detalla a continuación (Figura 5.15):

1. Hidratar la membrana del concentrador: Verter un volumen (la mitad de la capacidad del Vivaspin®) de la solución en la cual se encuentra la muestra proteica al depósito de muestras del concentrador y centrifugar a la velocidad especificada por el proveedor durante el tiempo necesario para que se filtre al menos la mitad del volumen inicial cargado.
2. Mientras tanto, centrifugar las muestras a 7.500 g durante 10 minutos a 4°C.
3. Una vez hidratada la membrana, vaciar el concentrador (tanto el depósito de muestra como el de filtrado).
4. Rápidamente (para evitar que se seque la membrana) verter la muestra a concentrar (previamente centrifugada en el paso 2) al depósito de muestras del Vivaspin®.
5. Centrifugar a una velocidad ligeramente inferior a la máxima especificada por el proveedor para el tipo de concentrador hasta filtrar el volumen necesario de muestra inicial para obtener el volumen deseado de muestra concentrada.
6. Recuperar la muestra concentrada pipeteando directamente del depósito de muestras el volumen restante.
7. Recuperar el filtrado. Rutinariamente éste se analiza para comprobar que no haya traspasado la proteína a través de la membrana.

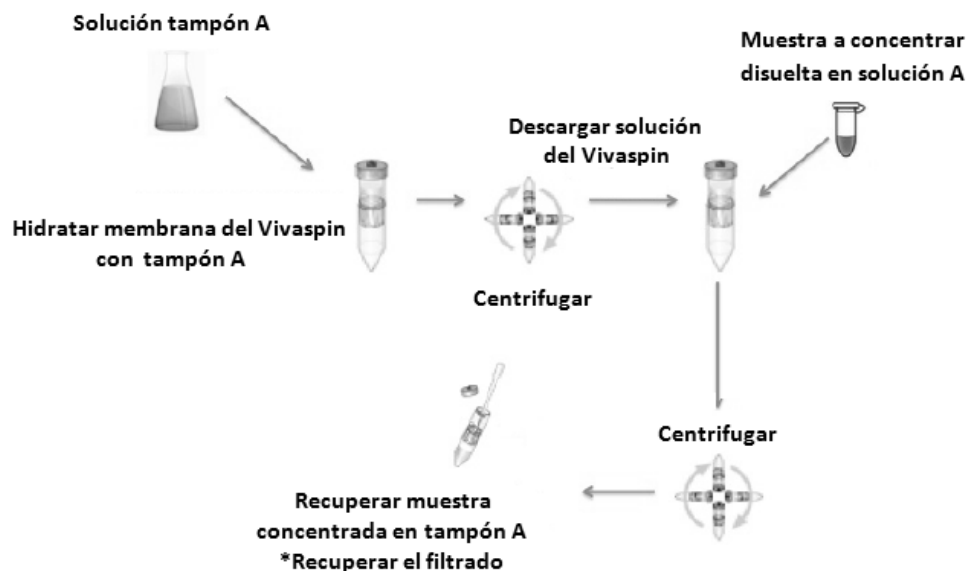


Figura 5.15: Resumen esquemático del proceso de concentración de la muestra.

Adaptado de [37].

Para el caso de la muestra obtenida después de la cromatografía de exclusión molecular, además de concentrar la muestra, se diafiltrará (cambio de solución en la que se encuentra la muestra). El procedimiento a seguir es el siguiente (Figura 5.16):

1. Repetir pasos 1-5 del protocolo anterior.
2. Realizar un lavado con la solución en la cual se desea que se encuentre la proteína concentrada: Añadir la solución al depósito de muestras del concentrador y centrifugar a una velocidad ligeramente inferior a la máxima especificada por el proveedor para el tipo de concentrador hasta filtrar la mayor parte del volumen vertido.
3. Repetir tres veces el paso 2, recuperando el filtrado en cada ciclo.
4. Recuperar la muestra concentrada pipeteando directamente del depósito de muestras el volumen restante.
5. Recuperar el filtrado y analizarlo junto a los anteriores filtrados, como en el protocolo anterior.

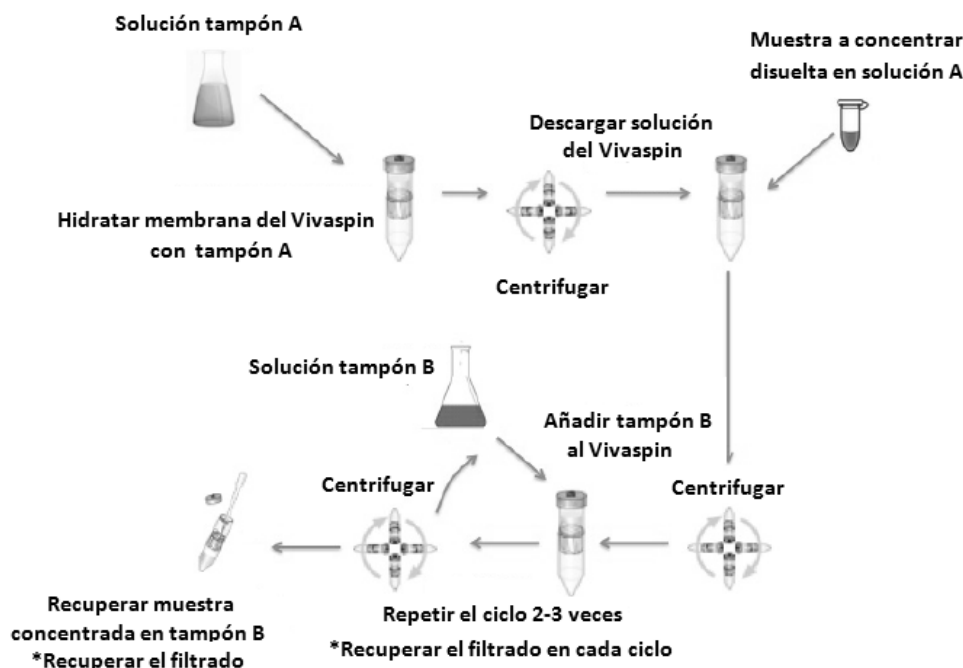


Figura 5.16: Resumen esquemático del proceso de concentración y diafiltración de la muestra.
Adaptado de [37].

Para conservar las muestras se optó por utilizar una solución con menos concentración de sal. Para los ensayos cristalográficos, se concentrarán las muestras como mínimo a 10 mg/mL en la solución 50 mM NaCl, 25 mM HEPES pH=7,4 y 1 mM DTT, se alicuotarán y, tras congelarlas con nitrógeno líquido, se conservarán las alícuotas a -80°C.

5.2.6. Determinación de la concentración de la proteína

Para determinar la concentración de la proteína se utilizó la ley de Lambert-Beer, que es una ecuación que relaciona la concentración de la muestra con la absorción de luz:

$$A = \epsilon \cdot C \cdot l$$

donde:

A= Absorbancia (adimensional).

ϵ = Coeficiente de extinción a la longitud de onda λ considerada, en este caso 280 nm ($\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$).

C = concentración de la muestra (M).

l = longitud del paso óptico de la cubeta que contiene la muestra (cm).

Conocido el coeficiente de extinción y la absorbancia de la muestra, se puede determinar su concentración. Para leer la absorbancia se utiliza un espectrofotómetro. Se introduce en una cubeta de cuarzo un volumen de 800 μL de la solución en la que se encuentra la muestra y se realiza el blanco. A continuación se lava bien la cubeta con H_2O miliQ y se añaden 800 μL de la muestra. Se lee la absorbancia a una longitud de onda adecuada y se determina la concentración mediante la ecuación de Lambert-Beer.

En este caso, la absorbancia se lee a una longitud de onda de 280 nm debido a que a esa longitud de onda los anillos aromáticos que contiene la proteína HMGB1($\Delta 7$ -164) presentan un pico máximo de absorción de luz. La longitud del paso óptico de la cubeta tiene un valor constante y conocido (1 cm). El coeficiente de extinción molar depende del compuesto y de la longitud de onda. En este caso, el valor de ϵ_{280} de HMGB1($\Delta 7$ -164) es $20.700 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ (estimado con la herramienta de cálculo de propiedades de proteínas *Peptide calculator*, *Northwestern University*).

El método descrito anteriormente se utiliza en el caso de disoluciones diluidas. Para el caso de disoluciones concentradas, se tendrá que diluir la muestra. En este caso se hace primero el blanco con 800 μL de la solución en la que se encuentran disueltas las proteínas y a continuación, se añade un volumen de 1 μL de la muestra concentrada en los 800 μL de solución, se homogeniza bien y se lee la absorbancia. Después se añade otro volumen de 1 μL de la muestra concentrada, se vuelve a homogenizar y a leer la absorbancia. Por último se calculan las concentraciones de ambas diluciones y se obtiene la media.

5.3. Estudio de la interacción ADN-proteína en geles EMSA

Los geles de retardo (EMSA, *Electrophoresis Mobility Shift Assay*) son un buen método para visualizar la formación de complejos entre un oligonucleótido con una proteína. Este método se basa en la disminución de la movilidad electroforética del complejo ADN-proteína en comparación con el ADN libre.

En estos geles se prueban diferentes relaciones entre ADN-proteína para observar la formación del complejo. Generalmente se pueden apreciar en el gel dos frentes (Figura 5.17): uno de alta movilidad (parte inferior), que corresponde a los fragmentos más negativos y de menor tamaño, es decir, los oligonucleótidos libres; y uno de menor movilidad, que se corresponde con el complejo ADN-proteína, el cual tiene mayor tamaño y menor carga negativa, retrasándose con respecto al otro frente (de ahí el nombre de gel de retardo).

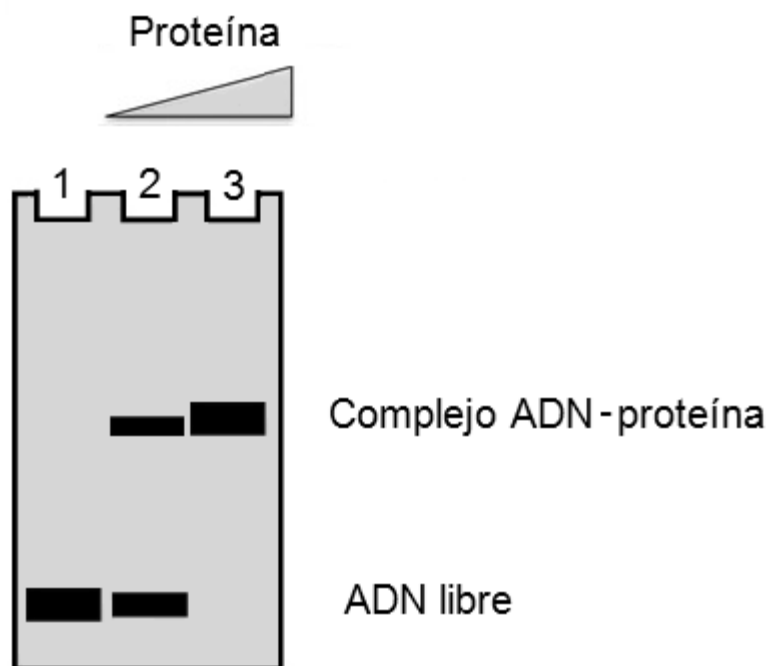


Figura 5.17: Esquema de un gel EMSA.

En este gel se cargan concentraciones crecientes de proteína y concentraciones constantes de ADN. Al aplicar un campo eléctrico, el ADN libre se desplaza más fácilmente que el complejo ADN-proteína ya que el complejo tiene mayor tamaño y menor carga. En este esquema, en el pozo 1 sólo se carga ADN, en el 2 se inicia la formación de complejo y en el 3 todo el ADN está complejado con la proteína.

En este proyecto se ha estudiado la interacción de la proteína HMGB1(Δ 7-164) con diferentes oligonucleótidos para verificar la formación de complejos. En cada pozo se carga la misma cantidad de oligonucleótido y cantidades crecientes de proteína. Como control, se carga un pozo con sólo oligonucleótido para marcar el frente de alta movilidad.

La composición del gel se muestra en la Tabla 5.11. La preparación del molde del gel se prepara según se describió en el apartado 5.2.4. Además, en este caso la electroforesis se ha de llevar a cabo a baja temperatura en la cámara fría y el montaje sobre hielo, para evitar que durante la electroforesis aumente la temperatura y se pudiera desnaturalizar el complejo.

Como tampón de cubeta se utilizará 0,3x TBE (0,027 M Tris-Borato y 0,6 mM EDTA) y como tampón de muestras se utilizará 5x TBE (Tabla 5.12). Para evitar posibles interacciones con otras sustancias que puedan afectar a la formación del complejo ADN-proteína, el tampón de muestras de los gels EMSA no contiene colorante de migración.

Tabla 5.11: Composición del gel de retardo (EMSA) (8% acrilamida) para un gel de tamaño 10 cm x 15 cm x 0,75 mm.

Gel de retardo (EMSA). Volumen final = 6 mL	
Reactivo	Cantidad
Solución A 30% Acrilamida / 0,8% Bisacrilamida	1,6 mL
5x TBE (ver Tabla 5.12)	0,4 mL
H ₂ O	3,915 mL
PSA Solución al 10%	30 µL
TEMED	6 µL

Tabla 5.12: Composición del tampón de cubeta de los gels de retardo (EMSA). Se prepara una dilución 0,3x a partir de un estoc a una concentración 5x.

Estoc 5x TBE pH=8	
Reactivo	Cantidad
Tris	54 g
Ácido bórico	27,5 g
EDTA	20 mL
H ₂ O	Hasta 1 L
Tampón de cubeta 0,3x TBE pH=8	
Reactivo	Cantidad
Estoc 5x TBE	66 mL
H ₂ O	Hasta 1 L

A las muestras se les añade glicerol al 50% para aportar densidad a la solución y facilitar el cargado de las muestras en el gel. Es necesario incubar las muestras preparadas durante al menos una hora a 4°C para permitir la formación del complejo ADN-proteína (en caso de que se forme). En la Tabla 5.13 se muestra un ejemplo de muestras preparadas para incubación y que después se cargarán en un gel EMSA. Como se puede observar, la concentración de proteína es creciente, mientras que la del ADN es constante (1 μM).

Tabla 5.13: Reacciones de incubación para un gel EMSA. La concentración de oligonucleótido, constante, es de 1 μM .

Ratio molar (proteína:ADN)	0:1	0,5:1	1:1	2:1	3:1	4:1	6:1
5 μM ADN en 0,3x TBE (μL)	2	2	2	2	2	2	2
10 μM proteína en 0,3x TBE (μL)	0	0,5	1	2	3	4	6
0,3x TBE (μL)	7,4	6,9	6,4	5,4	4,4	3,4	1,4
50% Glicerol (μL)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Volumen final	10 μL						

Antes de cargar las muestras en el gel, se ha de hacer un pre-run, que consiste en aplicar una diferencia de voltaje al gel (unos 75 V, más baja que la electroforesis) con tampón de cubeta, durante 30 minutos como mínimo, a 4°C y colocado el montaje sobre hielo. Esto nos va a permitir eliminar posibles trazas de persulfato de amonio y equilibrar el gel con tampón de cubeta. Una vez transcurrido este tiempo, se cargan las muestras en el gel y se inicia la electroforesis de las muestras a 125 V durante una hora, a 4°C y el montaje sobre hielo.

Para detectar el ADN se ha utilizado el teñidor *SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain* de la casa comercial *Invitrogen™* (5 μL de teñidor sobre 50 mL de solución 0.3x TBE). El gel se ha teñido durante 20 minutos a temperatura ambiente con agitación orbital suave. El SYBR Gold, a diferencia del bromuro de etidio (compuesto comúnmente utilizado para la tinción de ADN), no se une al ADN entre pares de bases consecutivos, sino que lo hace por el surco estrecho. El teñidor SYBR representa una alternativa como teñidor con respecto al bromuro de etidio, ya que es más sensible que éste y mucho menos dañino para la salud. Para observar el ADN teñido y registrar el resultado, se escanea el gel con la fuente de excitación TransUV (equipo Gel Doc XR, Biorad).

5.4. Estudios cristalográficos

Tal y como se ha comentado anteriormente, el objetivo de este proyecto es el estudio de la estructura tridimensional de complejos HMGB1-ADN. Para determinar la estructura a nivel atómico, una de las técnicas más empleadas es la difracción de rayos X (apartado 5.5.2). Para utilizar esta técnica, se requiere la obtención de cristales de calidad de la proteína y un oligonucleótido. Para ello, se deben realizar numerosos experimentos con el fin de encontrar aquellas condiciones óptimas de cristalización. En el siguiente apartado se explican los fundamentos para la obtención de cristales.

5.4.1. Fundamentos de la cristalización

La cristalización es el proceso mediante el cual las moléculas se ordenan en una disolución sobresaturada formando un retículo repetitivo denominado cristal. El límite de solubilidad de un soluto en un determinado disolvente marca el equilibrio entre la fase sólida y la fase disuelta. Si la concentración de soluto es menor, el sistema se encuentra en un estado insaturado donde sólo hay fase líquida y si, por el contrario, la disolución tiene más soluto del que puede aceptar, el sistema está en un estado sobresaturado y se llega al equilibrio mediante la precipitación del soluto.

El experimento de cristalización comienza con un soluto (complejo HMGB1-ADN) al que se le añade un precipitante, con la finalidad de reducir su solubilidad y controlar su precipitación. Si posteriormente se va concentrando paulatinamente al extraer el solvente del complejo y se van controlando las condiciones, se van generando núcleos de cristalización cuyo crecimiento puede dar lugar a cristales de tamaño adecuado para los experimentos de difracción.

El proceso de cristalización se puede ilustrar mediante un diagrama de fases (Figura 5.18) que indica qué estado (líquido, cristalino o sólido amorfo (precipitado)) es estable bajo una variedad de parámetros de cristalización. Algunos de estos parámetros de cristalización son pH, temperatura, sales y concentración de precipitante. Por lo tanto, los diagramas de fase son la base para el diseño de las condiciones de crecimiento de un cristal.

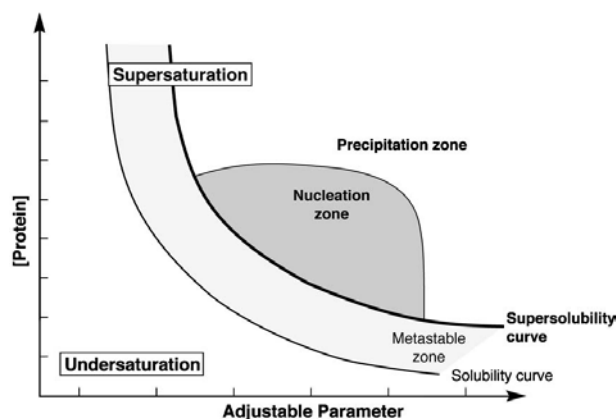


Figura 5.18: Esquema típico de un diagrama de fase de cristalización de proteínas [39].

La Figura 5.18 muestra un ejemplo típico de un diagrama de fase de cristalización, donde se pueden ver cuatro áreas bien diferenciadas:

- Zona de precipitación: Zona de muy alta sobresaturación, donde el complejo precipitará.
- Zona de nucleación: Zona de sobresaturación moderada, donde tiene lugar la nucleación espontánea.
- Zona metaestable: Zona comprendida entre las curvas de solubilidad y supersolubilidad, donde los cristales son estables y pueden crecer, pero no ocurren nucleaciones. Esta zona se considera que posee las mejores condiciones para el crecimiento de grandes cristales bien ordenados.
- Zona insaturada: Zona comprendida por debajo de la curva de solubilidad, donde el soluto está completamente disuelto y no cristaliza.

La cristalización se desarrolla en dos fases: nucleación y crecimiento. La nucleación, que es un requisito previo para la cristalización, requiere condiciones diferentes a las del crecimiento. En un experimento ideal, una vez que el núcleo se ha formado (zona de nucleación), la concentración del soluto en la gota disminuye, de modo que el sistema evoluciona a un sistema metaestable donde se produce el crecimiento del cristal, sin la formación de nuevos núcleos. Sin embargo, en la realidad esto es difícil que ocurra, ya que es muy probable que se llegue a un estado de exceso de nucleación (zona de precipitación), dando lugar a numerosos cristales de baja calidad.

De modo que el objetivo es primero alcanzar la zona de nucleación donde se generan pocos núcleos de cristalización y posteriormente alcanzar la zona metaestable para que estos núcleos puedan crecer y formar cristales grandes, ya que en esta zona no se forman núcleos nuevos sino que las moléculas se agregan a núcleos existentes. La zona de nucleación se debe alcanzar de forma lenta, ya que si se consigue de forma rápida, se puede alcanzar la zona de precipitación y por tanto el complejo puede precipitar dando lugar a precipitados amorfos, los cuales no pueden ser estudiados por difracción de rayos X. El proceso de cristalización no es sencillo, ya que normalmente se necesita un número elevado de ensayos para conseguir un cristal suficientemente bueno como para poder ser estudiado. Se deben encontrar las condiciones favorables para la cristalización, y eso es muy laborioso ya que depende de muchos factores, como se verá a continuación.

5.4.2. Condiciones para la cristalización

Existe un gran número de parámetros que pueden influir en la formación de un cristal. Algunos de ellos se explican a continuación:

Requisitos de la muestra:

- Pureza de la muestra: Es imprescindible utilizar muestras muy puras debido a que las impurezas dificultan el crecimiento de los cristales y aportan irregularidades, disminuyendo la calidad de los mismos. La pureza de la proteína, obtenida mediante las técnicas cromatográficas explicadas anteriormente, se comprueba mediante análisis electroforético (ver apartado 5.2.4). La pureza de los oligonucleótidos viene garantizada por el proveedor que los suministra (Instituto Pasteur).
- Homogeneidad de la muestra: Se debe trabajar con muestras homogéneas para asegurar la formación de cristales con repeticiones unitarias iguales. La heterogeneidad puede ser intrínseca de la muestra o ser extrínseca (provocada durante su manipulación experimental). En este último caso, se debe evitar someter a las muestras a tratamientos bruscos.
- Estabilidad: Se debe garantizar la estabilidad de las muestras durante los ensayos cristalográficos. Para ello, se debe trabajar a bajas temperaturas y en condiciones de máxima limpieza para evitar contaminaciones. Además, para una buena conservación, es recomendable que las muestras de oligonucleótidos se encuentren disueltas en 25 mM del tampón cacodilato de sodio ya que este compuesto contiene arsénico, lo cual dificulta la degradación de la muestra por bacterias (Figura 5.19).

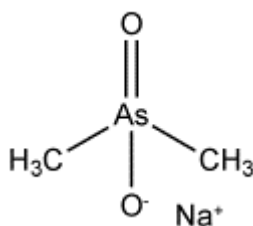


Figura 5.19: Fórmula química cacodilato de sodio.

- Concentración de las muestras: Para llegar a la zona de nucleación, tanto la proteína como el oligonucleótido deben encontrarse a una elevada concentración. También es importante la relación o proporción molar entre la proteína y el oligonucleótido.

Factores que afectan a la solubilidad del complejo:

Para alcanzar la zona de sobresaturación en la muestra, se ha de ir aumentando lentamente la concentración del complejo proteína-ADN mediante la eliminación de agua e ir introduciendo cambios que disminuyan su solubilidad. Los factores manipulados normalmente son:

- Eliminación de agua por evaporación.
- Variación del pH.
- Variación de la temperatura.
- Cambios en la fuerza iónica.
- Disolventes orgánicos:
 - Volátiles, como el isopropanol.
 - Poco volátiles, como el metilpentanodiol (MPD).
 - No volátiles, como el el polietilenglicol (PEG), el cual se puede encontrar con diversos pesos moleculares (de 400 a 20.000 Da).
- Ligandos específicos.

Tanto los disolventes orgánicos como los precipitantes poliméricos disminuyen la solubilidad proteica ya que bajan la constante dieléctrica de la solución.

5.4.3. Metodología de cristalización

La técnica de cristalización por difusión de vapor se basa en la variación de la concentración de proteína y ADN en la gota mediante la difusión de especies volátiles en un sistema cerrado. En este caso se ha utilizado concretamente la difusión de vapor en gota colgante (Figura 5.20). Este sistema consiste en una cámara formada por un pozo (parte inferior) y una tapa (parte superior) que cierra la cámara de forma semihermética [39]. El pozo contiene una solución de precipitante (unos 800 μl) a una concentración determinada, mientras que en la tapa se encuentra suspendida una gota de mucho menor volumen que el pozo (su tamaño oscila entre los 4 μl y los 10 μl) y que contiene las moléculas a cristalizar y la solución de cristalización. Esta solución contiene, entre otros componentes, la solución precipitante, pero en menor concentración que el pozo, es decir, su presión de vapor es superior a la de la solución de precipitante en el pozo.



Figura 5.20: Esquema de cristalización por difusión de vapor en gota colgante.

Adaptado de <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e5/CrystalDrops.svg>. [May-2015]

Como este sistema se halla en desequilibrio químico, el sistema irá evolucionando hasta alcanzar el equilibrio. Es primordial que el equilibrio se vaya alcanzando poco a poco, como se comentó anteriormente, con el fin de obtener cristales de alta calidad. Por simplicidad, generalmente se asume que sólo se intercambia agua entre la gota y el pozo [40] debido a que los precipitantes son menos volátiles que el agua, sin embargo, cualquier especie volátil puede evaporarse e intercambiarse entre la gota y el pozo.

Teniendo en cuenta esta simplificación, durante el experimento el agua de la gota se va evaporando. De esta manera, la concentración proteica de la gota aumenta, junto con la concentración de otros compuestos. El resultado final de este proceso es el equilibrio químico entre la gota y el pozo. Cuando finalmente se alcanza el equilibrio, o se está cerca de él, la gota manifestará diferentes tipos y grados de comportamientos de fase.

Cuando la concentración del pozo es fija, se deja equilibrar el sistema, pudiendo obtener cristales o no. Sin embargo, si la concentración del pozo se puede variar, se controla mejor la aparición y el crecimiento de cristales. En este caso se han utilizado cápsulas individuales (Figura 5.21), en las cuales la gota se coloca suspendida en la tapa y la solución precipitante en el pozo. El sistema se puede cerrar con más seguridad sellando la unión con Parafilm, de forma reversible.



Figura 5.21: Cápsulas ETS Cauver.

- Procedimiento

El procedimiento seguido en este proyecto para llevar a cabo el método de difusión de vapor en gota colgante es el siguiente: Primero se pipetea la solución precipitante en el pozo y después se pipetea los componentes de la gota sobre la parte interna de la cápsula (Figura 5.21). La gota está compuesta de solución de cristalización, complejo ADN-proteína y agua. Como la gota se adhiere a la tapa, la tapa se puede invertir y cerrar la cápsula de forma semihérmica, quedando la gota colgando sobre el pozo.

Se utilizarán como soluciones de cristalización tanto disoluciones comerciales (Natrix-HR2-116, Hampton Research) (ver Anexo A.4) como soluciones adaptadas, es decir, preparadas en el laboratorio.

El complejo proteína-ADN se prepara previamente (la cantidad dependerá del número de gotas que se vayan a preparar en el ensayo y de las concentraciones que se desea que haya en la gota). Una vez calculado, se prepara el complejo ADN-proteína y se mantiene en hielo durante al menos una hora para que interaccionen entre sí. Transcurrido este tiempo, se colocan 2 μL de solución de cristalización (normalmente a pH entre 6-7,5) en la parte interior de la tapa y, en esa misma gota se añaden 2 μL del complejo, obteniendo una gota final de 4 μL . En el pozo se colocará el precipitante (bien PEG o MPD). Inicialmente se empezará con concentraciones de precipitante en el pozo bajas (20%) y se irán aumentando progresivamente a medida que se vayan alcanzando los equilibrios. Estos pasos se han de aplicar a todas las gotas preparadas en el ensayo. Todos los experimentos se han llevado a cabo en una cámara fría a 4°C, para que no se degrade el complejo.

Estas cápsulas se inspeccionarán periódicamente (2 o 3 veces por semana) utilizando un microscopio con luz polarizada y, en función de su evolución, se irá o no aumentando la concentración del precipitante en el pozo. En el caso de obtener precipitados amorfos, se debe repetir la gota con una concentración en el pozo inferior. Si la gota es clara, se va aumentando la concentración entre un 3-5% hasta ver turbidez. A medida que se van obteniendo núcleos de cristalización, se aumenta la concentración sólo entre 0.5-1%. En este caso, generalmente se pipetea la cantidad adecuada de un estoc de precipitante al 70% y se añade en el pozo para así aumentar levemente la concentración.

5.4.4. Proceso de obtención de cristales

En general, la estrategia para la obtención de cristales consiste en tres pasos:

1. **Planificación matricial o screening:** Consiste en probar un amplio abanico de condiciones iniciales con el fin de observar preferencias de cristalización. Siguiendo matrices de dos dimensiones se intentan estudiar dos variables al mismo tiempo (ej. pH y relación molar). Evidentemente, cuantos más ensayos se lleven a cabo, mayor es la probabilidad de encontrar las condiciones adecuadas.
2. **Optimización:** Aquellas condiciones en las que se hayan observado precipitados cristalinos de mayor tamaño y baja nucleación son seleccionadas para la optimización. En algunos casos ésta se puede llevar a cabo replicando gotas o haciendo otras nuevas variando alguno de sus parámetros (ej. pH o cantidad de sales).
3. **Congelación:** Se dice que un cristal es bueno cuando es uniforme, presenta alta birrefringencia, tiene una geometría bien definida sin imperfecciones superficiales y tiene un tamaño adecuado. Si cumple con estas características físicas, el cristal se ha de extraer de la gota y conservar en nitrógeno líquido. La extracción de cristales es sumamente delicada debido a la fragilidad de los mismos. A este proceso se le denomina pesca y congelación de cristales (Figura 5.22).



Figura 5.22: Proceso de pesca de cristales en la cámara a 4°C.

El proceso de pesca se realiza con un pequeño loop (o lazo) de nylon de tamaño similar al cristal (existen diferentes tamaños de lazo para ajustarse a las características del cristal) (Figura 5.23.A). El loop está unido a una base (crio-pin), que se sumerge en un crio-vial (Figura 5.23.B) que contiene nitrógeno líquido para así congelar el cristal instantáneamente y conservarlo hasta su difracción. El cristal queda retenido dentro del lazo de nylon debido a tensiones superficiales del disolvente.

Estos crio-viales se colocan en una caña sumergida en nitrógeno líquido, la cual puede almacenar hasta cuatro viales (Figura 5.23.C). La caña se guarda en un bidón lleno de nitrógeno líquido hasta que se vaya a realizar la difracción de rayos X.

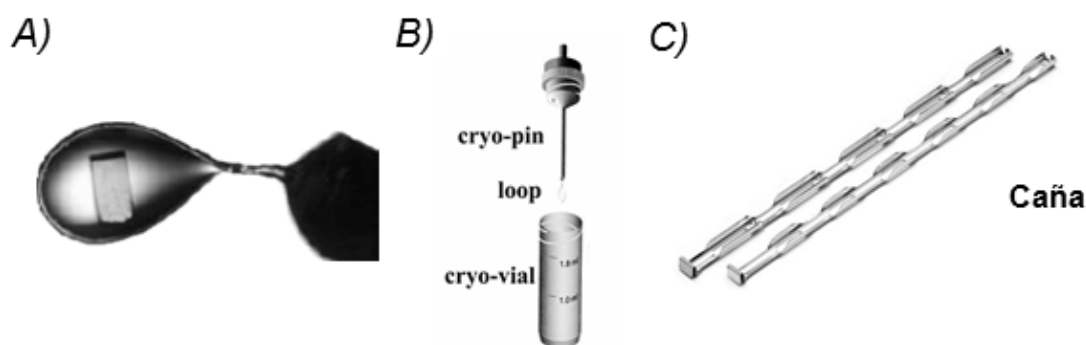


Figura 5.23: Dispositivos para la pesca y conservación de cristales.

A) Imagen de un cristal retenido en el loop adecuado a su tamaño

http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/parte_06.html. **B)** Loop y vial para la congelación de cristales.

C) Caña que permite guardar hasta 4 crio-viales <http://www.mtg-de.com/products/cryo-preservation/disposables-small-devices/accessories-for-cryo-storage.html>. [May-2015]

Un inconveniente de la congelación es la posible aparición de cristales de hielo que afectan a los espectros de difracción, ya que aparecen unos anillos típicos a resoluciones relativamente altas (3 Å). Al haber usado como precipitantes MPD y PEG, éstos actúan como crioprotectores, minimizando el riesgo de la aparición de cristales de hielo durante la congelación.

5.4.5. Análisis electroforético de los cristales

En algunos casos puede ser interesante analizar electroforéticamente un cristal, por ejemplo cuando la observación de los diagramas de difracción no permite asegurar si el cristal presenta contenido proteico. Para confirmar la presencia de proteína en el cristal se puede recurrir a un análisis electroforético en gel de SDS-PAGE, como se ha explicado en el apartado 5.2.4 con la única diferencia de usar una tinción con plata para la detección de la proteína.

- Preparación de las muestras:

En este caso, se disuelve el cristal en 4,5 μL de H_2O y 1,5 μL de tampón de muestras 4x (Tabla 5.8). Además, se preparan dos controles de la proteína (normalmente 50 y 100 ng). Una vez cargadas las muestras, la electroforesis se llevará a cabo en las mismas condiciones que las descritas en el apartado 5.2.4.

- Detección de la proteína:

La diferencia fundamental con el protocolo descrito en el apartado 5.2.4 es la tinción del gel para la detección de la proteína, ya que en este caso se utilizará tinción con plata en vez de tinción con azul de Coomassie.

La tinción con plata es una técnica muy utilizada para la tinción de proteínas en geles de poliacrilamida. Se basa en la reducción de los iones plata Ag^+ a plata metálica Ag^0 en las bandas de proteína [41]. Su principal ventaja es su alta sensibilidad en comparación a la tinción con azul de Coomassie. En este proyecto se ha utilizado el *Silverquest™ Silver Staining Kit* de la casa comercial Invitrogen™. Este kit permite detectar hasta 0,3 ng de proteína (es 30 veces más sensible que la tinción con azul de Coomassie), idóneo para la detección de proteína en cristales debido a las pequeñas cantidades de proteína con las que se trabaja.

El protocolo seguido se puede ver en la Tabla 5.14. Las disoluciones que aparecen en este protocolo se deben preparar al momento. Además es importante trabajar con agua ultra pura y evitar tocar el gel con las manos o con objetos metálicos. Si se requiere tocarlo, hay que hacerlo siempre con guantes y hay que enjuagarlos con agua desionizada. Siempre se debe trabajar con material limpio.

- Conservación del gel:

La conservación del gel se realiza de la misma forma que en el apartado 5.2.4.

Tabla 5.14: Protocolo para llevar a cabo la tinción con plata utilizando el Silverquest™ Silver Staining Kit (Invitrogen).

Tinción con plata				
Paso	Reactivos	Cantidad ² (mL)	Tiempo (min)	Descripción
Fijación	Etanol Ácido acético Agua	20 5 Hasta 50	20	Elimina los iones que pueden interferir y detergente del gel y evita la difusión de las proteínas fuera de la matriz del gel.
Lavado	Etanol Agua	15 Hasta 50	10	Elimina el exceso de fijador.
Sensibilización	Etanol Sensitizer ¹ Agua	15 5 Hasta 50	10	Aumenta la sensibilidad y el contraste en la tinción.
Primer lavado	Etanol Agua	15 Hasta 50	10	Elimina el exceso de sensibilizador (sensitizer).
Segundo lavado	Agua	50	10	Rehidrata el gel.
Teñido	Stainer ¹ Agua	0,5 Hasta 50	15	Une los iones de plata a la proteína y forma una imagen latente.
Lavado	Agua	50	1 ³	Elimina el exceso de teñidor (stainer).
Revelado	Developer ¹ Developer enhancer ¹ Agua	5 Una gota Hasta 50	4-8	Reduce los iones de plata a plata metálica en las bandas de proteína, pudiéndose visualizar.
Detención	Stopper ¹ (Añadir directamente a la solución de revelado)	5	10	Compleja cualquier plata libre para evitar una mayor reducción.
Lavado	Agua	50	10	Elimina el exceso de stopper.

¹ Soluciones proporcionadas por el kit.

² Cantidades utilizadas para teñir un gel de 10 cm x 15 cm x 0,75 mm de espesor.

³ Lavar el gel durante más de un min eliminaría los iones de plata del gel, reduciendo la sensibilidad.

5.5. Cristalografía de rayos X

Los rayos X son radiaciones electromagnéticas cuya longitud de onda es del orden de 10^{-10} m (1 Armstrong, Å). Los rayos X cuya longitud de onda sea alrededor de 1 Å son los que más interesan en cristalografía, debido a que esta longitud de onda es muy próxima a la distancia entre los átomos, y por lo tanto es capaz de interactuar con éstos para así obtener información sobre los mismos y poder resolver la estructura.

A continuación se muestran los pasos generales para resolver la estructura de un cristal y la de las moléculas, átomos o iones que contenga (Figura 5.24):

- Disponer de un cristal de calidad y de tamaño adecuados.
- Obtener el patrón de difracción con la longitud de onda adecuada.
- Evaluar el patrón de difracción para obtener los parámetros reticulares (celda elemental), simetría (grupo espacial) e intensidades de difracción.
- Construir un modelo estructural inicial y calcular la función de densidad electrónica.
- Completar el modelo obteniendo posiciones de los átomos restantes.
- Refinar el modelo ajustando todas las posiciones atómicas para conseguir que el patrón de difracción calculado con dichas posiciones sea lo más parecido posible al patrón de difracción experimental.
- Finalmente validar y representar el modelo total obtenido.

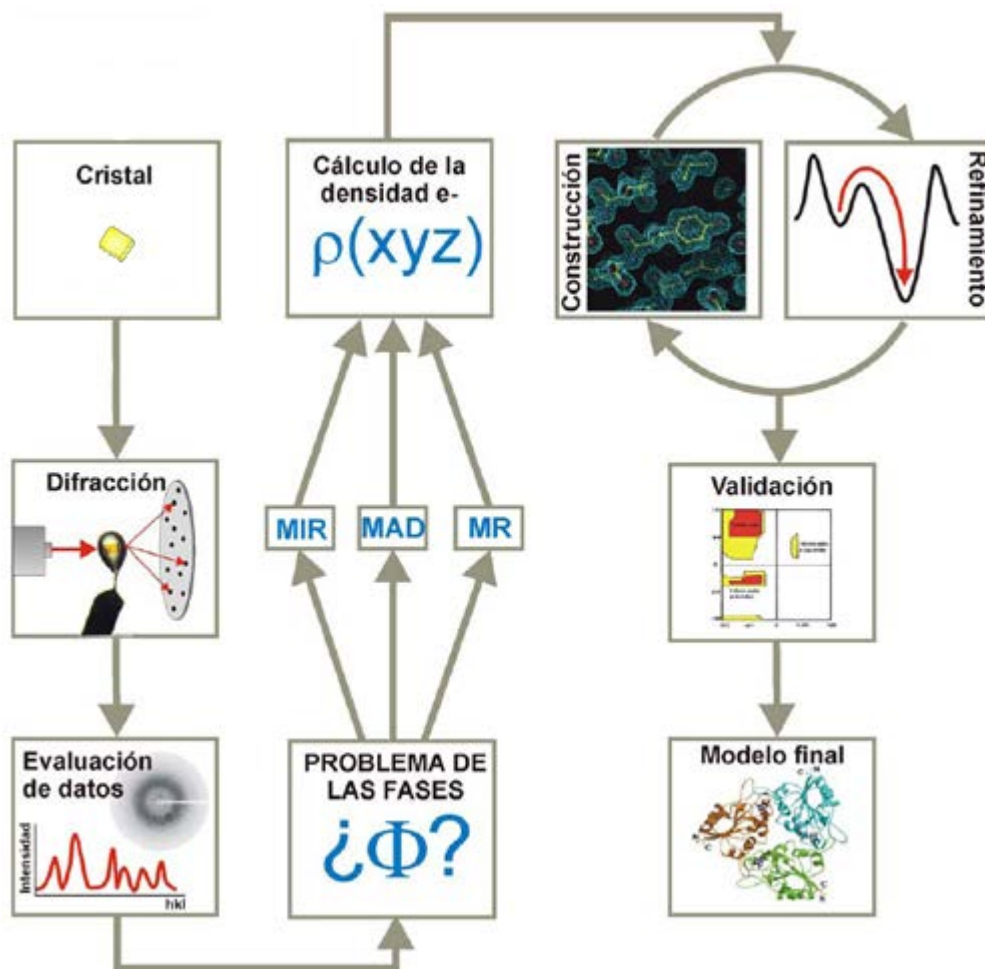


Figura 5.24: Esquema general que muestra el proceso de resolución de estructuras moleculares y cristalinas mediante la difracción de rayos X.

http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/parte_07.html. [May-2015]

Para entender bien estas etapas, se definen a continuación unos conceptos previos básicos en cristalografía, el proceso de difracción de rayos X y el tratamiento de los datos obtenidos.

5.5.1. Conceptos previos

Un cristal es un material sólido cuyos elementos constitutivos se repiten de manera ordenada y paralela y cuya distribución en el espacio muestra ciertas relaciones de simetría. La periodicidad se define como la distancia según la cual las unidades estructurales se repiten paralela e idénticamente a lo largo de una dirección dada.

La repetición periódica por la que se describe la estructura interna de los cristales viene representada por un conjunto de traslaciones en las tres direcciones del espacio, de tal forma que el cristal puede considerarse como un apilamiento, en tres dimensiones, de bloques idénticos. Cada bloque, de una forma y tamaño determinado (pero todos iguales), se denomina **celda unitaria** (Figura 5.25.b). Su tamaño viene determinado por la longitud de sus tres aristas (a , b , c), y la forma queda definida por el valor de los ángulos entre dichas aristas (α , β , γ).

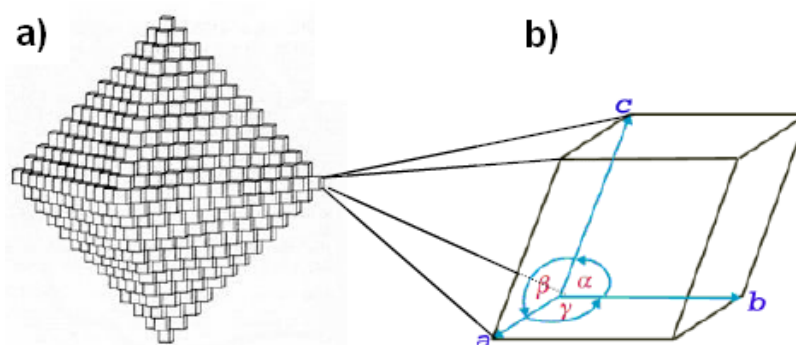


Figura 5.25: Cristal y celda unitaria.

La celda unitaria de un cristal (b) representa el volumen mínimo que se repite por traslación en las tres direcciones del espacio y queda definida por las aristas a , b , c , y los ángulos α , β y γ . El apilamiento de las celdas unitarias constituyen el cristal (a). Adaptado de http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/parte_03.html. [May-2015]

El contenido de la celda unitaria (átomos, moléculas o iones) recibe el nombre de **unidad asimétrica** o **motivo** (Figura 5.26.a). Como el volumen de la celda unitaria es constante, el motivo también es una constante del cristal. Este motivo es el conjunto mínimo de moléculas, átomos o iones, que conforma la unidad fundamental de la red, de tal forma que cualquier otra parte del cristal puede conseguirse a partir de ella mediante operaciones de simetría.

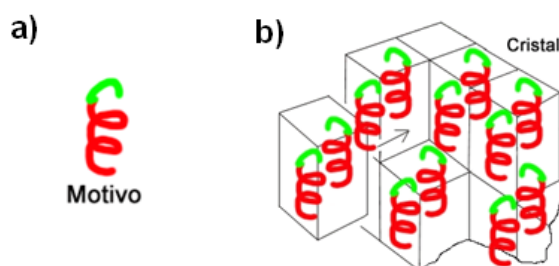


Figura 5.26: Unidad asimétrica o motivo.

A la izquierda se ve el motivo que representa una molécula (a). A la derecha se ve cómo la unidad asimétrica se repite a sí misma mediante elementos de simetría, en este caso eje helicoidal, reproduciendo la celda unitaria. La repetición de celdas unitarias, en las tres direcciones del espacio, genera el cristal (b). Adaptado de http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/parte_03.html. [May-2015]

Para generalizar el contenido del motivo, éste puede describirse por un punto que representa a todos y cada uno de los constituyentes del motivo. A este punto se le llama **punto reticular** (Figura 5.27). En función de los parámetros de las celdas, se conocen 7 tipos de celdas unitarias y 14 formas en las que los átomos se pueden acomodar en estas celdas unitarias, es decir, 14 redes tridimensionales, a las cuales se las conoce como redes de Bravais (ver anexo A.5), siendo primitivas (P) cuando todos los puntos reticulares son vértices, y no primitivas si algún punto está en las caras (C,F) y/o en el interior.

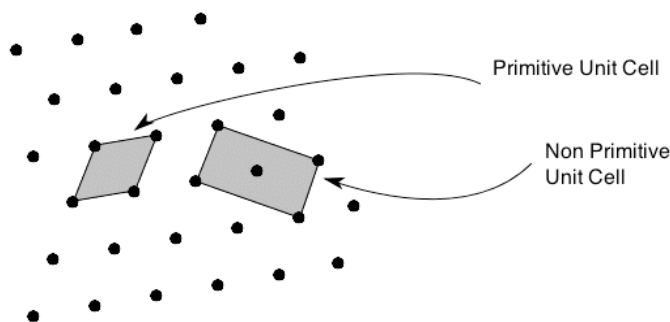


Figura 5.27: Celda primitiva y no primitiva.

Definición de varias celdas unitarias, para una misma red: Primitiva y no primitiva, según los puntos reticulares que las definan [42].

El **grupo espacial** es el conjunto de operaciones de simetría que se han de aplicar a la unidad asimétrica para generar la celda unitaria. Éstos vienen recogidos en las llamadas *International Tables for X-ray Crystallography* [43]. De los 230 grupos espaciales que existen, las macromoléculas sólo pueden tener 65 grupos, debido a que no tienen planos de simetría ni centros de inversión (no son quirales).

5.5.2. Difracción de rayos X

Cuando un haz de rayos X incide sobre una muestra, éste interacciona con los electrones de los átomos que la componen, haciéndolos vibrar a una frecuencia similar a la de la radiación incidente. De este modo, los electrones oscilantes se convierten en focos de nueva radiación X que se emite de forma esférica. A este fenómeno se le conoce como dispersión elástica.

Poco después del descubrimiento de la difracción de rayos X, Lawrence Bragg descubrió que la geometría del proceso es análoga a la reflexión de luz por un espejo plano: Si un rayo incidente forma un ángulo θ con el conjunto de planos, el haz difractado también forma un ángulo θ con los planos. Se deduce, por tanto, que el ángulo entre los rayos incidente y difractado es 2θ .

Debido a que hay muchos planos paralelos implicados en la dispersión de rayos X, las reflexiones que proceden de planos sucesivos interfieren entre sí, habiendo interferencia constructiva sólo cuando la diferencia de longitud de camino entre los rayos procedentes de planos sucesivos es igual a un número entero de longitudes de onda. A este fenómeno de difracción se le conoce como la ley de Bragg:

$$2 \cdot d \cdot \text{sen}\theta = n \cdot \lambda$$

siendo:

d = distancia entre planos de difracción.

θ = ángulo de incidencia de la difracción.

n = número entero.

λ = longitud de onda del rayo.

En la Figura 5.28 se muestran dos casos de reflexión de rayos X. En ambos la distancia interplanar es la misma, sin embargo el ángulo de incidencia varía. En el primer caso no se cumple la ley de Bragg, ya que los rayos difractados entre dos planos consecutivos están desfasados. Esto produce el fenómeno de interferencia destructiva entre todos los rayos dispersados, dando lugar a la cancelación de las ondas. Si, por el contrario, se tiene un ángulo θ que da lugar a una reflexión en la que los rayos reflejados no están desfasados, estas intensidades se suman, produciéndose el fenómeno de interferencia constructiva.

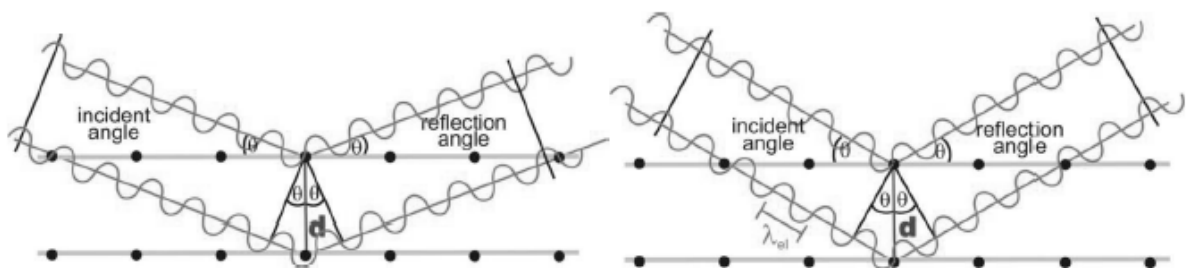


Figura 5.28: Ley de Bragg. Se representan, para una misma distancia interplanar, dos ángulos incidentes diferentes, uno que produce interferencia destructiva (izquierda) y el otro que produce interferencia constructiva (derecha) [42]

Por lo tanto, si una muestra está muy ordenada, como es el caso de un cristal, existen ciertas direcciones para las cuales los rayos X interfieren de forma constructiva, dando lugar a un haz que se puede medir mediante un detector de rayos X. Como la dirección determina si hay interferencia constructiva, se debe girar el cristal durante su difracción para que todos los planos virtuales estén en la posición en la cual se cumpla la ley de Bragg.

Los planos de Bragg son llamados planos reticulares, ya que pasan a través de puntos reticulares (en tres dimensiones son necesarios tres puntos que no estén en línea recta para definir un plano). Estos planos se agrupan en familias de planos paralelos cuya distancia d_{hkl} entre ellos es constante, es decir, son equidistantes. La orientación de los planos puede ser especificada mediante las intersecciones de los planos con los tres ejes de coordenadas (normalmente se utilizan los ejes en las direcciones de las aristas de la celda unitaria). Sin embargo, la orientación de los planos se especifica mediante sus índices, que son proporcionales a los recíprocos de las intersecciones (Figura 5.29). Los tres enteros que describen la orientación de un plano se llaman índices de Miller, y se usan para ellos los símbolos h, k, l .

Para calcularlos, considerando un plano cualquiera, se determina en qué punto corta cada eje cristalográfico, se invierten y se escriben entre paréntesis. En caso de que el número sea negativo, se escribe el índice con una barra horizontal encima, en lugar de con el signo negativo delante. Así, los parámetros hkl se calculan como:

$$h = \frac{a}{x} \quad k = \frac{b}{y} \quad l = \frac{c}{z}$$

donde:

- x, y, z : puntos donde el plano corta con los tres ejes del espacio.
- a, b, c : aristas de la celda unitaria.

Como resultado de la periodicidad de los cristales, los únicos planos que son importantes en los cristales son aquéllos para los cuales los índices son números racionales (cocientes de enteros), ya que los planos con intersecciones irracionales no constituyen conjuntos de planos idénticos, paralelos y equidistantes.

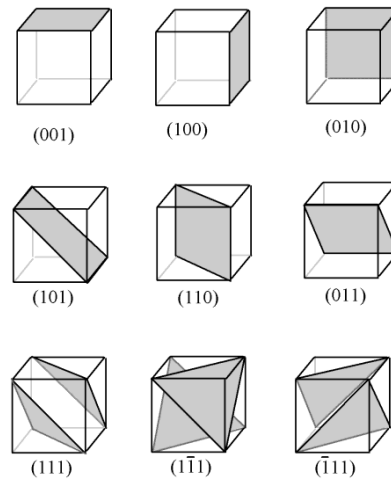


Figura 5.29: Ejemplos de índices de Miller y los planos que representan.

<http://nano-physics.pbworks.com/w/page/12296663/Group%202>. [May-2015]

Espacio recíproco y esfera de Ewald:

Para simplificar los cálculos geométricos de la ley de Bragg, se consideran los conceptos de espacio recíproco y de modelo de Ewald. Como se comentó anteriormente, los índices de Miller nos describen la orientación de los planos, y la ley de Bragg nos permite calcular la distancia de planos paralelos. Como es bastante difícil visualizar la orientación de estos planos (especialmente cuando los índices no son muy pequeños, y cuando el sistema de coordenadas definido por las aristas de la celda unitaria es oblicuo), se definirá un punto para cada familia de planos, ya que es más fácil visualizar la posición de un punto en el espacio.

Paul P. Ewald fue quien propuso este modelo, donde cada familia de planos de Bragg se sustituye por un punto geométrico, formando una red recíproca que equivale a la transformada de Fourier de la red cristalina original. Además, definió una esfera virtual de radio igual al inverso de la longitud de onda del rayo incidente (esfera de Ewald) cuya superficie está formada por todos aquellos puntos recíprocos donde se da la difracción. Las distancias medidas en el espacio recíproco tienen un valor inverso al del espacio real. La Figura 5.30.b, muestra cómo se puede utilizar este modelo para simplificar problemas en difracción de rayos X. Así, cuando un punto recíproco se sitúa sobre la superficie de la esfera de Ewald se satisface la ley de Bragg: los planos correspondientes a este punto están en una posición reflectante y su difracción se puede observar en el diagrama de difracción (Figura 5.31).

$$\text{sen } \angle PAO = \frac{OP}{AO} = \frac{1/d}{2/\lambda} = \frac{\lambda}{2d}$$

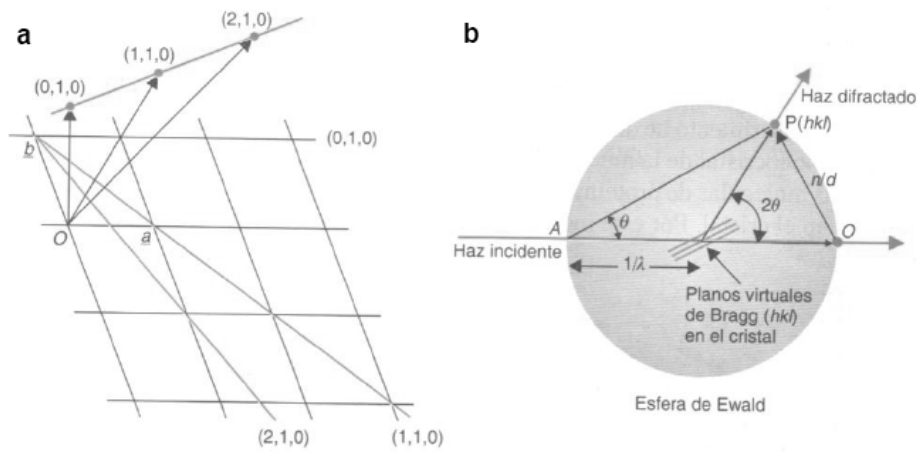


Figura 5.30: (a) Construcción de la red recíproca a partir de las familias de planos de Bragg. Cada una de las familias está representada por un sólo plano (línea azul), perpendicular al dibujo. Los puntos recíprocos (puntos rojos), están situados en la dirección perpendicular a su familia de planos y a una distancia del origen inversamente proporcional al espaciado d de cada familia. Estos puntos se identifican con los mismos índices de Miller que los planos. (b) Interpretación de la difracción según el modelo de Ewald. Cuando un punto recíproco $P(hkl)$ se sitúa sobre la superficie de la esfera de radio $1/\lambda$ se genera un haz difractado que emergiendo del centro de la esfera pasa por $P(hkl)$. El punto O es el origen del espacio recíproco. Se hace pasar un haz de rayos X, de longitud de onda λ , en la dirección AO . Ahora se dibuja una esfera de radio $1/\lambda$ centrada en la línea AO y que pase por el punto O . Manteniendo la esfera fija, se gira el cristal hasta que el punto P del retículo recíproco esté en la superficie de la esfera. La distancia OP es $1/d$, la distancia AO es $2/\lambda$ y APO es un triángulo rectángulo. (adaptada de Gómez-Moreno y Sancho, 2003, ver bibliografía complementaria)

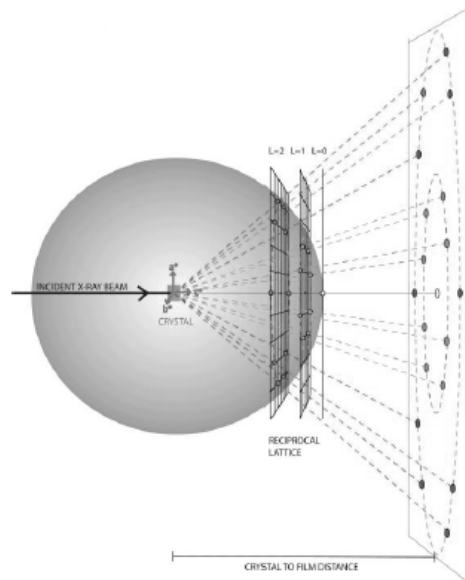


Figura 5.31: Representación de la esfera de Ewald y el patrón de difracción obtenido. [42]

Obtención de rayos X:

Como se ha dicho anteriormente, los rayos X que se utilizan para difractar muestras cristalinas son aquéllos cuya longitud de onda es 1 \AA , por ser de magnitud igual a las distancias interatómicas. Mediante el uso de monocromadores, la longitud de onda deseada se filtra del espectro total de rayos X (policromático) que se obtienen en tubos (laboratorios de cristalografía) o en sincrotrones, siendo éstas las más convencionales. Un colimador se encarga de que el haz que incida en el cristal sea completamente recto.

- Los tubos de rayos X son una tecnología más antigua, pero más accesible para pequeños laboratorios. Consiste en la generación de una alta diferencia de voltaje (unos 50 kV) entre un filamento incandescente por donde circula una corriente de bajo voltaje (5 A, 12 V) y una placa metálica (el ánodo, normalmente de Cu), provocando la migración de electrones libres hacia el ánodo. Los electrones de alta energía desplazan a los electrones próximos a los núcleos del metal puro, dejando una vacante que es suplida por electrones de capas superiores. De este modo, la diferencia de energía entre capas electrónicas se libera en forma de radiación X, la cual está formada por un conjunto de radiaciones de longitud de onda que depende del metal (para el caso del Cu es de $1,5418 \text{ \AA}$).
- Un sincrotrón es un acelerador de partículas en forma de anillos toroidales de gran extensión (del orden de kilómetros), donde se inyectan partículas cargadas eléctricamente (electrones o positrones) que circulan a velocidades próximas a la de la luz. El proceso comienza cuando un cañón emite las partículas cargadas en un primer acelerador lineal donde adquieren velocidad. De aquí las partículas pasan a un anillo (sincrotrón propulsor) más pequeño que el exterior, donde giran varias veces hasta alcanzar la velocidad máxima. El movimiento de las partículas es posible gracias a campos magnéticos creados por grandes imanes. Una vez han llegado a la velocidad punta, pasan a un segundo anillo exterior (anillo de almacenaje) donde circulan a velocidad constante por canales rectilíneos discontinuos para adaptarse a la curvatura del anillo. Cuando las partículas cambian de dirección para pasar de un canal a otro, se emite la radiación sincrotrónica, de gran contenido energético. Es esta radiación la que aprovechan las diferentes líneas de investigación situadas tangencialmente al anillo (*beamlines*).

La radiación de sincrotrón posee una serie de ventajas con respecto a la generada en los tubos de rayos X. La radiación de sincrotrón cubre un amplio rango de energías o longitudes de onda que abarca desde el infrarrojo hasta los rayos X. Su intensidad es mayor que la producida en los tubos ordinarios, que se traduce en una disminución del tiempo de realización de los experimentos, y además es sintonizable, es decir, se puede escoger de un continuo de valores de longitud de onda, la que más se acomode a las necesidades, ya que

cuanto más rápido se muevan los electrones, más corta es la longitud de onda de la radiación (a diferencia de los tubos ordinarios de rayos X, los cuales sólo trabajan a longitudes de onda fijas). El futuro de la radiación para la difracción está enfocado hacia la nueva tecnología XFEL (*X-ray Free-Electron Laser*), que permitirá el análisis de cristales con rayos X en femtosegundos, reduciendo aún más la exposición de las macromoléculas de estudio a radiaciones perjudiciales para su estructura.

En este proyecto se utilizó la plataforma cristalográfica del sincrotrón ALBA (Figura 5.32), concretamente la línea BL-13 XALOC, dedicada a la investigación de estructuras de macromoléculas.



Figura 5.32: Sincrotrón ALBA.

Vista aérea del sincrotrón ALBA (Cerdanyola del Vallès, Barcelona) (izquierda). Esquema general de un sincrotrón con el acelerador interior de partículas y anillo de almacenamiento (derecha).

<http://www.pcb.ub.edu/portal/entitats>.

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/6/60/Sch%C3%A9ma_de_principe_du_synchrotron.jpg/400px-Sch%C3%A9ma_de_principe_du_synchrotron.jpg [May-2015]

Procedimiento:

Para difractar el cristal, se utiliza un goniómetro Kappa (Figura 5.33), un instrumento que permite situar el cristal en varias orientaciones espaciales y así poder recoger las reflexiones en casi todos los planos posibles. El cristal, conservado en nitrógeno líquido, se coloca en el goniómetro. Para ello, se sujeta la base del loop (el cryo-pin) con la ayuda de una varilla magnética, mientras se retira la tapa. A continuación, se coge el cristal con el criotrón (un tipo de pinza que ayuda a mantener el cristal congelado) y se coloca cuidadosamente en el goniómetro. Se debe disponer de un flujo de nitrógeno líquido durante todo el proceso para evitar la degradación de la muestra debida a la elevada temperatura de los rayos X que se le hacen incidir al cristal. Se ha de centrar el goniómetro para que el rayo incida sobre el cristal a lo largo de los 360° de giro.

Este proceso está automatizado. Se utiliza un “brazo robot” para colocar las muestras delante del rayo. Sin embargo necesita soportes especiales y alguna vez el robot falla (lo que conlleva la pérdida del cristal).

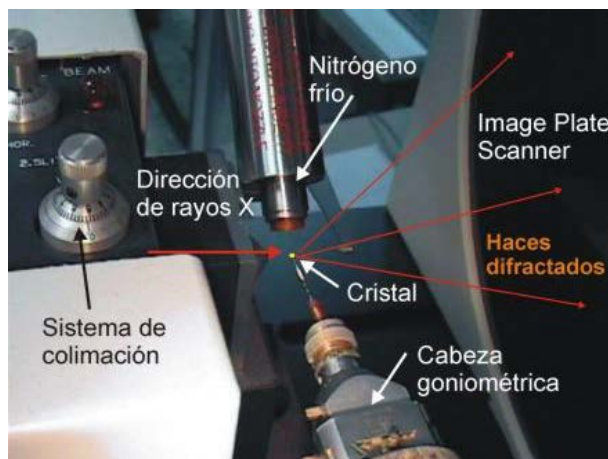


Figura 5.33: Imagen del difractómetro donde se muestran las distintas partes que lo forman.

<http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia> [May-2015]

Se dispone de una cabina de control donde se vigila todo el proceso, y se pueden manipular diferentes variables gracias a programas informáticos, además de almacenar los datos obtenidos. Algunas de estas variables son la longitud de onda, tiempo de exposición, distancia entre cristal y detector, ángulo de oscilación o ángulo que gira el goniómetro durante la captura de cada imagen, ángulo total girado por el goniómetro y el número de imágenes realizadas. Finalizado el experimento, se obtienen los diagramas de difracción correspondientes a cada ángulo de giro del goniómetro (Figura 5.34).

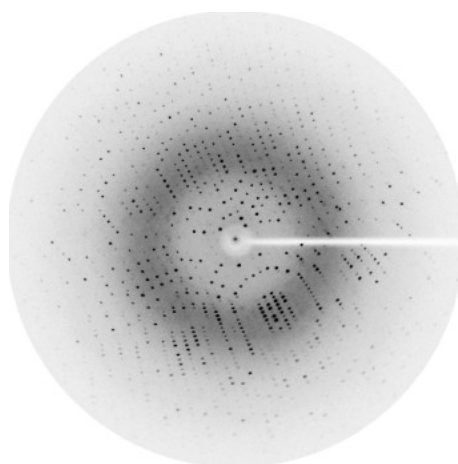


Figura 5.34: Una de los cientos de imágenes de un patrón de difracción de un cristal de proteína. Los puntos de la imagen son la consecuencia de la dispersión cooperativa (difracción) de los innumerables electrones contenidos en todos los átomos que constituyen el cristal. Disponible en

http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/parte_07.html. [May-2015]

5.5.3. Análisis de los resultados

A continuación, se deben tratar los diagramas de difracción obtenidos en la etapa anterior, con el fin de encontrar la resolución de la estructura de la molécula difractada. El proceso de análisis de los diagramas de difracción consta, en resumen, de las siguientes fases:

- Indexado, integrado, procesado y escalado.
- Resolución de la estructura.
- Refinado.
- Validación.

Debido al gran número de operaciones matemáticas que intervienen en estas fases, se ejecutarán con la ayuda de programas informáticos hasta obtener, si fuera posible, una representación detallada a escala atómica de la molécula cristalizada.

Indexado, integrado, procesado y escalado:

El objetivo del **indexado** es determinar, a partir de uno o varios diagramas de difracción (dependiendo de su calidad), la red de Bravais y las dimensiones de la celda. El programa asigna a todas las reflexiones observadas los correspondientes índices de Miller. A partir de estos valores se puede conocer la simetría del cristal, los parámetros de la celda elemental y el grupo espacial.

Para ello, se puede bien realizar un indexado automático (el cual puede dar muchos errores si los datos de difracción no son muy buenos debido a que puede tomar reflexiones de poca intensidad o poco definidas) o bien realizar un autoindexado, en el cual se revisan y se seleccionan una a una las diferentes reflexiones, eligiendo las reflexiones más fuertes y redondas e ignorando las poco definidas y ovaladas, ya que representan desorden del cristal. A continuación, el programa es capaz de encontrar los parámetros de la celda unitaria y el grupo espacial. Además asigna a todas las reflexiones el correspondiente índice de Miller. Sin embargo, no muestra una única solución, sino que propone una serie de posibles resultados de grupos espaciales junto a un valor de penalización. Dicha penalización hace referencia a la diferencia entre los grupos espaciales posibles y el ajuste de los datos experimentales a éstos. La solución preferida es aquella que tenga la mayor simetría y con un valor bajo de penalización, aunque no tiene por qué ser la correcta. El programa permite modificar parámetros como la mosaicidad (desorden interno del cristal), pudiendo influir en la lista de resultados que propone el programa.

En la **integración** se calculan mejor las posiciones de los máximos de intensidad para cada reflexión. Para ello se aplica un perfil Gaussiano a cada una de las reflexiones, se comparan con los datos experimentales y se minimizan las diferencias utilizando el método de los mínimos cuadrados.

En el **procesado** se optimiza la información de todas las imágenes recogidas en función de la intensidad.

Una vez recogidas todas las intensidades se lleva a cabo el **escalado**, que tiene por objetivo aplicar la misma escala a cada reflexión, ya que nunca son iguales por motivos experimentales (fluctuaciones del rayo, imperfecciones, etc.) y obtener una media de todas las intensidades, $I(hkl)$. Éstas se recogen en un único fichero. Además, se obtienen unos valores estadísticos que dan idea de la calidad de los datos. Algunos de ellos son:

- *Resolución máxima, I/σ* (I : intensidad de reflexión, σ : desviación de la intensidad): Es el valor de resolución que se coge como límite de la integración, cuanto más pequeño mejor. Como regla general se corta la resolución cuando $I/\sigma > 2$ para evitar la introducción de error.
- *R_{merge}* : Grado en el que las observaciones de cada reflexión única se desvían de ser iguales entre si. Su valor debe ser inferior a 15%:

$$R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i (\bar{I}(hkl) - I(hkl)_i)}{\sum_{hkl} \sum_i (I(hkl)_i)}$$

- χ^2 : Da una idea del ajuste entre los datos observados y calculados. Ha de ser próximo a 1 y se expresa como:

$$\chi^2 = \sum k \cdot \frac{(I - \bar{I})^2}{N \cdot \varepsilon^2}$$

- *Compleitud*: Tanto por ciento de reflexiones únicas que se han obtenido. Cuanto mayor, mejor.
- *Redundancia*: Cantidad de veces que se repiten las reflexiones. Cuanto mayor, mejor.

Finalmente se convierten las intensidades obtenidas en el escalado en factores de estructura mediante la siguiente fórmula:

$$I = |F(hkl)|^2$$

Resolución de estructura:

Determinar una estructura cristalina es encontrar la distribución de densidad electrónica (número de electrones por unidad del volumen). Se parte del espectro de difracción donde la intensidad y posición de las difracciones facilita información del espacio recíproco. La transformación del espacio recíproco, definido por los factores de estructura $F(hkl)$ al espacio cristalino, definido por $\rho(xyz)$, implica la resolución de una transformada de Fourier.

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)| \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha(hkl)]$$

Mediante las etapas anteriores, se determinan los índices de Miller (h,k,l) y mediante las intensidades de las reflexiones se calculan el valor de los módulos de los factores de estructura $F(hkl)$ que son unas magnitudes que equivalen a la resultante de la dispersión de todos los átomos de la celda, para cada punto del espacio recíproco. Sin embargo, el problema de esta ecuación es que se desconoce el ángulo de fase α , el cual da una idea de cómo están colocadas las moléculas. A esto se le conoce como **el problema de las fases**. Para su determinación existen diferentes métodos:

- Métodos directos: Sólo aplicables cuando la resolución es muy alta (normalmente moléculas pequeñas).
- Métodos indirectos: Aplicables a macromoléculas. Se deben ir probando diferentes iteraciones hasta encontrar un resultado satisfactorio, ya que no existen técnicas experimentales. Existen diversas alternativas como el método de reemplazamiento isomorfo múltiple (MIR), método de dispersión anómala múltiple (MAD) y **método de reemplazo molecular (MR)**. Este último método es el que se empleará en este proyecto.

El **método de reemplazo molecular** consiste en resolver la estructura de un cristal a partir de una estructura similar conocida (modelo). A este modelo se le aplican operaciones de rotación y traslación para orientarlo convenientemente haciendo que coincida con la molécula de estudio (Figura 5.35) y se calcula el mapa de densidad electrónica usando los factores de estructura experimentales $F(hkl)$. El grado de semejanza entre las dos estructuras debe ser elevado para que el método funcione.

Para las proteínas se pueden utilizar los modelos de proteínas similares de estructuras ya resueltas por rayos X o RMN, que se pueden encontrar en el *Protein Data Bank* (PDB). El *Protein Data Bank* es una base de datos donde están almacenadas las estructuras de RMN y rayos X de todas las estructuras resueltas hasta el momento.

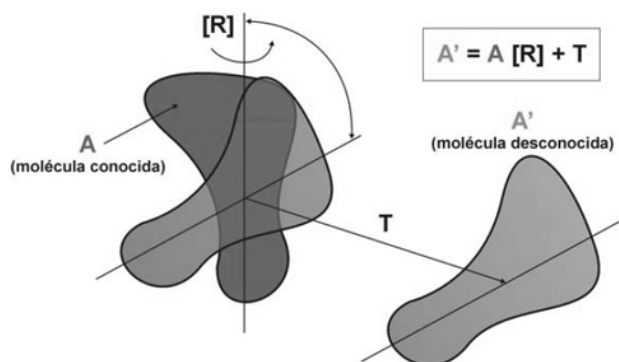


Figura 5.35: Esquema del proceso de reemplazo molecular (MR).

La molécula de estructura conocida (A) se gira mediante la operación de rotación [R] y se traslada mediante T, para llevarla a la posición que ocupa la molécula problema (A').

http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/parte_07.html. [May-2015]

En primer lugar se debe estimar el número de moléculas de la unidad asimétrica. Para ello se utilizará el coeficiente de *Matthews* (V_m) que equivale al volumen del cristal por unidad de masa molecular del complejo $\text{\AA}^3/\text{Da}$.

Utilizando la siguiente ecuación se puede aproximar fácilmente el número de moléculas en la unidad asimétrica. El valor estimado es el más probable pero puede ser que no se cumpla y que haya más o menos moléculas de las esperadas dependiendo de si el cristal está más o menos solvatado.

$$V_m = \frac{V}{M m n}$$

donde:

V_m : coeficiente de *Matthews*. ($2,69 \text{\AA}^3/\text{Da}$ para proteínas; $2,59 \text{\AA}^3/\text{Da}$ para ácidos nucleicos y $3,08 \text{\AA}^3/\text{Da}$ para complejos [44]).

V: volumen de la celda unitaria (\AA^3).

M: masa molecular de la proteína, el ácido nucleico o el complejo (Da).

m: multiplicidad del grupo espacial (número de veces que se repite la unidad asimétrica en la celda).

n: número de moléculas de la proteína, ácido nucleico o complejo.

Una vez realizada la orientación del modelo, se calculan unos parámetros que dan idea del nivel de adecuación del modelo a los datos experimentales:

$$R = \frac{\sum_{hkl} |F(obs) - k \cdot |F(calc)||}{\sum_{hkl} |F(obs)|}$$

$$C = \frac{\sum_{hkl} [(|F(obs)|^2 - \overline{|F(obs)|^2}) \cdot (|F(calc)|^2 - \overline{|F(calc)|^2})]}{[\sum_{hkl} (|F(obs)|^2 - \overline{|F(obs)|^2}) \cdot \sum_{hkl} (|F(calc)|^2 - \overline{|F(calc)|^2})]^{\frac{1}{2}}}$$

donde:

- **F(obs)** es el factor de estructura observado en las difracciones (dato experimental).
- **F(calc)** es el factor de estructura calculado a partir del modelo (dato teórico).

R es un parámetro que representa el error entre el modelo y los datos experimentales. A lo largo de los diferentes ciclos consecutivos que se dan en el proceso de resolución, este parámetro tendría que verse reducido, siendo un valor entre un 15% y un 25% aceptable para macromoléculas.

C es un coeficiente de correlación que da idea de la adecuación del modelo y los datos observados. Por lo tanto interesa que sea cuanto más grande mejor.

Refinado:

Tras la etapa de resolución de estructura viene la etapa de refinado. La finalidad del refinado es la modificación del modelo para obtener una mejor correlación con los datos de difracción experimentales (observados). Se intenta minimizar las discrepancias entre los datos de difracción observados y las calculadas a partir del modelo, mejorando la posición de los átomos. Además se pueden añadir moléculas que faltan, como moléculas de agua y contraiones.

Durante el refinado, se sigue comparando entre el modelo y los datos experimentales, basándose en los factores de estructura y en los parámetros R y C. Las variables a refinar son las coordenadas de cada átomo (xyz) y el denominado factor de temperatura (B), que hace referencia a la incertidumbre posicional de los átomos debido al movimiento térmico.

El refinado puede llevarse a cabo mediante diferentes métodos: mínimos cuadrados, refinado por máxima probabilidad (maximum likelihood refinement), refinado por dominios rígidos (rigid body refinement) o por templeado simulado (simulated annealing).

Para asegurar que el factor R disminuye por una mejora del modelo y no por motivos matemáticos, se utiliza el denominado R_{free} . Este factor corresponde a un conjunto de reflexiones, (normalmente entre 5 y 10%) escogidos al azar, que no se refinan. En cada ciclo se comparan el R y el R_{free} obtenidos, los cuales deben disminuir de manera similar y terminar con un valor parecido.

Validación:

Tras obtener un modelo aceptable, se calculan los mapas de densidad. En cristalografía de macromoléculas se utilizan principalmente dos tipos de mapas.

- Mapa de densidad 2Fo-Fc. Idealmente este tipo de mapa debe superponerse a la estructura del modelo. Si el modelo es erróneo, se verán mapas de densidad discontinuos y que no coinciden. Se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$|F(hkl)| = 2 \cdot |F(obs)| - |F(calc)|$$

- Mapa de diferencias Fo-Fc. Con este tipo de mapa se visualiza qué falta y qué sobra. Si el modelo fuese completamente correcto este mapa sería nulo ya que los factores de estructura observados y calculados serían iguales. Se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$|F(hkl)| = |F(obs)| - |F(calc)|$$

Una diferencia positiva quiere decir que existe una zona donde faltan electrones y es necesario añadir más átomos. Por el contrario, una diferencia negativa indica exceso de electrones, es decir, hay una zona donde sobran átomos o éstos son más pequeños (Figura 5.36).

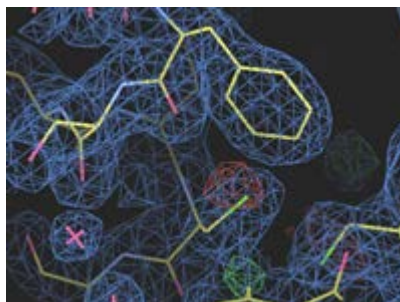


Figura 5.36: Mapa de densidad electrónica y mapa de diferencias.

Ejemplo de un mapa de densidad electrónica (azul), que indica que el modelo es correcto, y mapa de diferencias (verde y rojo), que indican ausencia o exceso de densidad electrónica.

Finalmente, para validar la estructura hay que comprobar que el mapa de densidad se ajusta correctamente al modelo, es decir, que no hay zonas de valor diferente a cero en el mapa de diferencias. Además se deben verificar parámetros estereoquímicos, distancias y ángulos de enlace. En el caso de las proteínas, los valores de sus ángulos de torsión ϕ (phi) y ψ (psi) están energéticamente limitados según el diagrama de Ramachandran (Figura 5.37), que muestra las regiones permitidas para cada tipo de estructura secundaria (α , β).

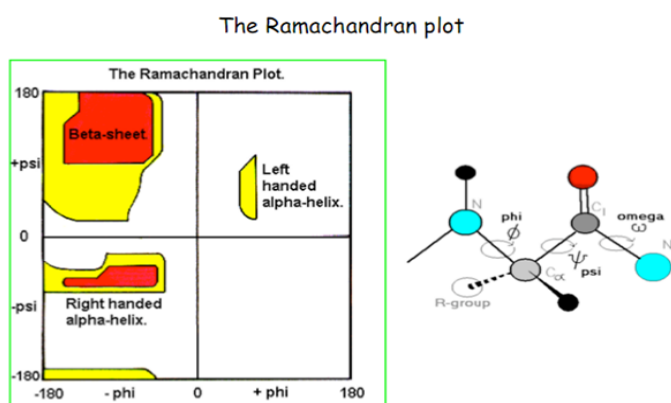


Figura 5.37: Diagrama de Ramachandran.

Indica las regiones permitidas y las parcialmente permitidas para cada tipo de estructura secundaria (hélice α o lámina β) en función de los valores de los ángulos phi y psi de los aminoácidos.

<http://knowledgesun.com/wp-content/uploads/2014/10/4.png> [May-2015]

El modelo se deposita en el *Protein Data Bank* (PDB) y si supera la revisión y validación, la macromolécula recibe un código que lo identifica. El archivo queda disponible para cualquiera que desee acceder a él.

En la Tabla A.7 del anexo A.6 se recoge un listado de todos los programas informáticos que se han utilizado para el análisis de los datos de difracción en cada una de las etapas.

6. Resultados

6.1. Obtención de la proteína HMGB1 en *Escherichia coli*

La proteína HMGB1(Δ 7-164) se ha obtenido a partir de un cultivo de *Escherichia coli* mediante la técnica del ADN recombinante (en el apartado 5.1 se explicó la base teórica). En la Figura 6.1 se muestra un resumen de este proceso.

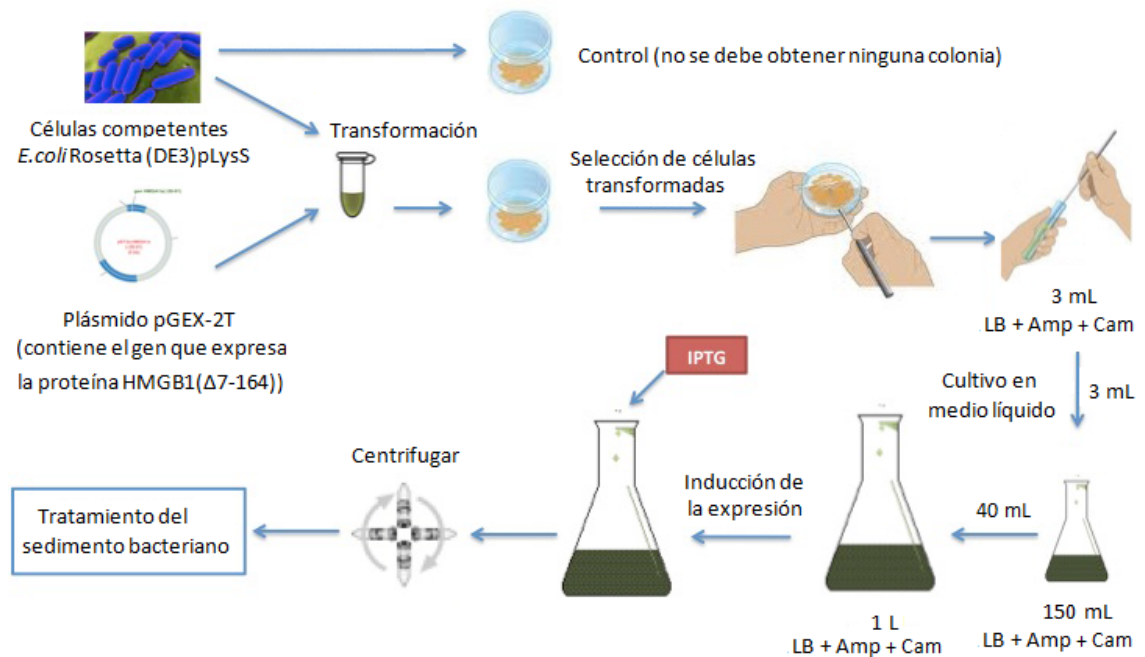


Figura 6.1: Esquema del proceso de obtención de HMGB1(Δ 7-164) en *E. coli* mediante la técnica del ADN recombinante. Adaptado de [37].

Así, se ha introducido un plásmido que contiene el gen que expresa la proteína de interés HMGB1(Δ 7-164), dentro de una bacteria (*Escherichia coli* cepa Rosetta(DE3)pLysS, en este caso) para que la bacteria exprese esta proteína. El proceso de transformación (introducción del nuevo ADN en la bacteria) no es 100 % efectivo, por lo tanto se deben seleccionar sólo las bacterias transformadas (aquellas que hayan incorporado el plásmido). Para ello se utilizó el antibiótico ampicilina.

Una vez incubadas las células con el plásmido (el protocolo se explica detalladamente en el apartado 5.1.1), se cultivaron en placas de agar con los antibióticos cloranfenicol (Cam, al cual tiene resistencia la cepa) y ampicilina (Amp, para seleccionar las colonias de bacterias transformadas, ya que son las únicas que teóricamente podrán crecer). Para confirmar que

las colonias obtenidas realmente corresponden a células transformadas, se llevó a cabo paralelamente un control con células que no fueron incubadas con el plásmido y que se cultivaron también en placas de agar con ampicilina y cloranfenicol. En este control no se observó crecimiento, por lo que se pudo confirmar que las colonias obtenidas eran transformadas.

A continuación se picó una colonia de células transformadas y se incubó en un tubo con 3 mL de medio líquido (LB + Amp + Cam) (ver composición en anexo A.3) durante 6 horas a 37°C y con agitación orbital a 250 rpm. Posteriormente se inoculó el contenido del tubo en un matraz con 150 mL del mismo medio y se incubó O.N. en las mismas condiciones. Al día siguiente se inoculó un volumen suficiente de este cultivo (unos 40 mL) sobre 1 litro del mismo medio para conseguir que la DO_{600} tuviera un valor entre 0,1 y 0,2. Este proceso se hizo por duplicado, para obtener dos litros de cultivo y así conseguir más cantidad de proteína. Se nombró a cada réplica (1) y (2). Los valores de DO_{600} que se obtuvieron fueron 0,138 y 0,125 respectivamente (ver Tabla 6.1, tiempo 0).

Para iniciar la expresión de la proteína es necesario añadir IPTG al medio (inducción con IPTG) (ver apartado 5.1.1). Antes de inducir la expresión se requiere que la DO_{600} del cultivo tenga un valor aproximado de 0.8, dentro de la fase de crecimiento exponencial de las bacterias, ya que en esta fase las células expresarán de forma óptima. El medio se continuó incubando a 37°C y con agitación orbital a 250 rpm. Se fueron tomando muestras periódicamente para leer su DO_{600} y así poder controlar el crecimiento del cultivo (ver Tabla 6.1).

Tabla 6.1: Valores de DO_{600} para cada litro de cultivo de las muestras tomadas periódicamente.

Tiempo (min)	DO_{600} muestra (1)	DO_{600} muestra (2)
0	0,138	0,125
120	0,376	0,376
150	0,567	0,591
190	0,774	0,822

Tras alcanzar valores próximos a 0.8 (a los 190 minutos), se inició la expresión de la proteína añadiendo 0,5 mL de IPTG 1 M (concentración final 0,5 mM) y se continuaron incubando ambos medios durante 3 horas a 37°C y con agitación orbital (250 rpm). Durante este periodo, se tomaron 3 muestras a tiempos 0, 1,5 h y 3 h después de la inducción, las cuales se utilizaron para medir las absorbancias de los medios y para realizar un control electroforético (Tabla 6.2 y Figura 6.2).

Tabla 6.2: Valores de DO_{600} para cada litro de cultivo de las muestras tomadas periódicamente tras la inducción con IPTG 1 M (concentración final 0,5 mM).

Tiempo tras la inducción (h)	DO_{600} muestra (1)	DO_{600} muestra (2)
0	0.774	0.822
1.5	1.108	1.159
3	1.206	1.246

El control electroforético se llevó a cabo en un gel SDS-PAGE (Figura 6.2). El volumen por muestra fue de 50 μ L de cultivo. Antes de cargar las muestras, éstas se centrifugaron durante 5 minutos a 4.000 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 15 μ L de tampón de muestras (Tabla 5.6). Finalmente se hirvieron durante 6 minutos para romper la pared celular y desnaturalizar las proteínas (ver apartado 5.2.4).

Tal y como se explicó en el apartado 5.1, la proteína se expresó inicialmente fusionada con una cola de glutatión S-transferasa (cola GST). Es decir, se utilizó un plásmido que contenía la secuencia que expresa la proteína de fusión GST-HMGB1(Δ 7-164) (Figura 5.2). Como se verá en el próximo apartado (apartado 6.2), esta estrategia permitió utilizar una cromatografía de afinidad GST, facilitando así la purificación de la proteína.

La proteína de fusión GST-HMGB1(Δ 7-164) tiene una masa molecular de unos 44.500 Da (unos 18.500 Da de la proteína HMGB1(Δ 7-164) y unos 26.000 Da de la cola GST). Como se puede observar en el gel (Figura 6.2), existe una banda en las muestras perfectamente reconocible a la altura aproximada de $MW = 45.000$, de modo que se pudo identificar la banda de la proteína GST-HMGB1(Δ 7-164). Además se aprecia que esta proteína se fue expresando de manera progresiva: A tiempo 0 h tras la inducción, tanto en la muestra (1) como en la muestra (2) todavía no se ha empezado a expresar la proteína de interés. Después de 1,5 h de la inducción con IPTG, ya se puede apreciar claramente la banda correspondiente a la proteína de fusión GST-HMGB1(Δ 7-164). Esta banda se intensifica al cabo de 3 h.

Tras verificar que las células expresaron la proteína deseada (Figura 6.2) se inició la recuperación del producto. Para ello, y puesto que la proteína expresada es intracelular, se separaron primero las células del medio por centrifugación (ver 5.1.1). El sedimento bacteriano así obtenido se sonicó aplicando el tratamiento explicado en el apartado 5.1.2. Este tratamiento permitió romper las paredes celulares y así liberar la proteína al medio sin desnaturalizarse. Además eliminó parte de las impurezas (sobre todo las insolubles). Aun así, todavía quedaban muchas impurezas, principalmente otras proteínas solubles de la propia célula y, por tanto, se purificaron los extractos procedentes de los dos litros de cultivo empleando técnicas cromatográficas (apartado 6.2).

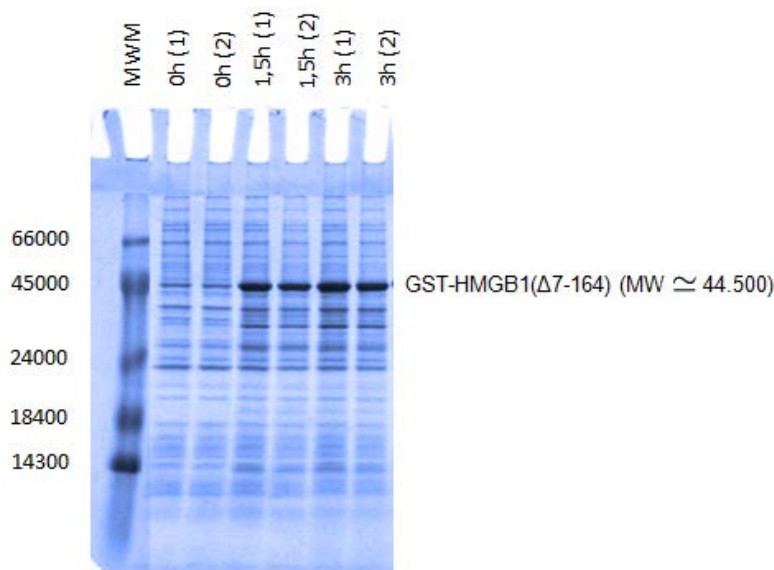


Figura 6.2: Análisis electroforético en gel SDS-PAGE del proceso de inducción.

Muestras tomadas durante el inicio, transcurso y final de la inducción (0 h, 1,5 h y 3 h, respectivamente), para cada uno de los dos cultivos de 1 litro. En todas las muestras se observa la presencia de múltiples bandas, lo que indica la presencia de numerosas proteínas de origen bacteriano que se tendrán que eliminar durante las etapas de purificación.

MWM, marcador de masa molecular.

6.2. Purificación cromatográfica de la proteína

El proceso de purificación de la proteína HMGB1(Δ7-164) comenzó con la técnica de cromatografía de afinidad GST, seguida de una cromatografía de intercambio catiónico y finalmente una cromatografía de exclusión molecular.

6.2.1. Cromatografía de afinidad GST

Como se ha comentado en el apartado anterior, la proteína HMGB1(Δ7-164) se ha expresado fusionada con la proteína GST. La proteína de fusión se pudo purificar fácilmente utilizando una columna de afinidad cuya matriz estaba compuesta de sefarosa con la molécula de glutatión inmovilizada. La alta afinidad entre el glutatión y la cola GST permitió que la proteína de fusión quedase retenida en la columna, mientras que el resto de proteínas no. Finalmente se utilizó una proteasa que cortó específicamente entre la cola GST y el fragmento de HMGB1(Δ7-164), obteniendo la proteína HMGB1(Δ7-164) libre, mientras que la cola GST permaneció unida al glutatión de la matriz.

Así pues, siguiendo el protocolo explicado en el apartado 5.2.1, el sobrenadante tras la sonicación se cargó en la columna de cromatografía de afinidad, previamente equilibrada. Esta columna tenía un volumen empaquetado de 6.5 mL de matriz glutatión sefarosa, adecuado para tratar la muestra obtenida tras la expresión de las células en dos litros de cultivo.

La muestra se incubó en la resina de glutatión sefarosa durante un mínimo de dos horas a 4°C con agitación orbital, para facilitar la unión por afinidad. Así, la proteína de fusión GST-HMGB1(Δ 7-164) quedó retenida en la matriz debido a la alta afinidad de la cola GST con los grupos glutatión. Después de la incubación de la muestra, se eluyó el *flow through* (FT) por gravedad. A continuación se hizo un lavado a la columna para asegurar la elución de todas las proteínas no unidas a la matriz (W).

Para eluir la proteína de interés, se hizo una digestión con la enzima trombina, la cual cortó la proteína de fusión justo después de la cola GST (ver apartado 5.2.1 y Figura 5.2). Para que esta enzima actuase adecuadamente, se hizo previamente un lavado de la matriz con la solución trombina (ThW), se añadió la enzima trombina y se dejó incubando durante toda la noche en agitación orbital a 4°C. Al día siguiente se detuvo la reacción de digestión añadiendo EDTA 0,5 M (100 μ L). A partir de este momento, las muestras eluidas contenían la proteína de interés libre de la cola GST, que sigue unida a la columna. Primero se recogió el FT de la escisión por gravedad (FTc) y se hicieron posteriormente hasta tres lavados (EIW1, EIW2 y EIW3) para tratar de eluir toda la proteína de interés.

Las muestras FT, W y ThW se recogieron en Falcons de 50 mL, mientras que las muestras FTc, EIW1, EIW2 y EIW3 se recogieron en Falcons de 15 mL. De todas estas muestras se extrajeron alícuotas para el control electroforético de la purificación. En la Figura 6.3 se observan las muestras analizadas electroforéticamente que se obtuvieron en los diferentes pasos de la cromatografía de afinidad.

Como era de esperar, la fracción FT contenía muchas de las proteínas contaminantes de la muestra inicial que no quedaron retenidas en la matriz por no tener afinidad a ella. Como no se observa proteína HMGB1(Δ 7-164), quiere decir que no se ha sobrecargado la columna. Tras el lavado siguiente, fracción W, se acabaron de eliminar todas las proteínas no unidas a la matriz, de modo que se siguen observando en la electroforesis las mismas proteínas contaminantes pero con menos intensidad. En la fracción ThW (lavado con la solución tampón trombina), ya no se detectó la presencia de ninguna proteína. Esto indica que no se perdió proteína y que la columna se lavó correctamente.



Figura 6.3: Gel SDS-PAGE correspondiente a la cromatografía de afinidad GST.

MWM, marcador de masa molecular; FT, *flow through*; W, lavado de la columna (*wash*); ThW, lavado con la solución tampón trombina para la digestión con la trombina (*thrombin wash*); FTc, fracción eluida después de la escisión (*flow through after cleavage*); EIW(1, 2 y 3), fracciones eluidas (*elution wash*); Beads, muestra de micropartículas que componen la matriz de la columna.

En las fracciones FTc, EIW1, EIW2 y EIW3, se vio claramente en el gel (Figura 6.3) que la enzima trombina realizó la escisión entre la cola GST y la proteína HMGB1(Δ 7-164). Estas muestras contenían la proteína bastante pura, pero todavía se podían apreciar bandas adicionales que indicaban que se necesitaba seguir purificando la muestra. Se juntaron estas fracciones en un Falcon de 50 mL, obteniendo un volumen aproximado de 24 mL.

Como control, para verificar si se había recuperado toda la proteína unida a la columna, se tomó una pequeña muestra de la matriz de la columna (beads), se diluyó en agua y tampón de muestras y se cargó en el gel para observar su contenido. En esta fracción (carril beads de la Figura 6.3) se observó que la cola GST seguía unida a la columna (banda muy intensa). Se apreciaban también las bandas de GST-HMGB1(Δ 7-164) y HMGB1(Δ 7-164) pero muy levemente. Estas dos bandas tenues indican que se dio tiempo suficiente para que se cortasen casi todas las uniones GST-HMGB1(Δ 7-164) y que las proteínas HMGB1(Δ 7-164), libres de la cola GST, eluyeron prácticamente en su totalidad, respectivamente.

Para la cuantificación de la muestra obtenida se midió su absorbancia y, mediante la ley de Lambert-Beer, se calculó su concentración (apartado 5.2.6). Con este valor se calcularon los mg de proteína que contenía la muestra:

$$C (M) = \frac{A}{\varepsilon \cdot l} = \frac{1,00}{20700 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot L \cdot 1 \text{ cm}} = 4,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$$

$$4,8 \cdot 10^{-5} \frac{\text{mol}}{L} \cdot 18484 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \cdot 0,024 L = 0,0214 \text{ g} = 21,4 \text{ mg}$$

Finalmente la columna se regeneró con cloruro de guanidina para eluir las colas GST unidas a la matriz (apartado 5.2.1), y así restablecer las condiciones iniciales de la columna para poder volver a utilizarla.

6.2.2. Cromatografía de intercambio catiónico

Debido a que la muestra todavía presentaba alguna proteína contaminante, se utilizó una cromatografía con diferente principio de separación a la columna anterior: separación por carga. Aprovechando la carga neta positiva de las proteínas HMGB1, se utilizó una columna de intercambio catiónico, en concreto la columna HiTrap SP FF en un sistema FPLC ÄKTA Purifier (*GE Healthcare*) (ver apartado 5.2.2). Esta columna, cuya matriz está compuesta de sefarosa con el grupo sulfopropil (SP) (carga negativa) retuvo la proteína HMGB1, mientras que las proteínas con carga neutra o carga negativa eluyeron. Para eluir la proteína de interés, se utilizó un gradiente de concentración creciente de sodio, que actuó como contraión desplazando la proteína retenida en la matriz.

Para ello, la muestra, de unos 24 mL, se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos (rotor SS34, Sorvall) para eliminar restos insolubles que pudieran obstruir la columna. El sobrenadante se recogió en un Falcon de 50 mL y se cargó en la columna de intercambio catiónico. En este caso se utilizó el loop de 10 mL (el mayor disponible) de modo que la muestra se cargó en la columna mediante tres inyecciones de 8 mL.

A continuación se muestra un cuadro resumen (Tabla 6.3) de las condiciones en las que se llevó a cabo esta cromatografía. Para más detalles, consultar el apartado 5.2.2.

Tabla 6.3: Cuadro resumen de las condiciones de la cromatografía de intercambio catiónico.

Columna de intercambio catiónico	Columna Hitrap SP FF (GE Healthcare). Matriz seferosa con grupo isopropil (SP)
Presión máxima admisible	0,3 MPa
Volumen de resina de la columna	5 mL
Muestra	21,4 mg en 24 mL (100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM Tris pH=7,9).
Tamaño loop	10 mL
Inyecciones de muestra en el loop	3 inyecciones de 8 mL de muestra cada una.
Flujo	1 ml/min
Condiciones de elución	100 mM NaCl → 1 M NaCl en 90 mL
Solución de elución	1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM Tris pH=7,9.
Volumen de las fracciones	2 mL
Absorbancias medidas a λ	220 nm, 260 nm y 280 nm

La Figura 6.4 muestra el cromatograma correspondiente a esta cromatografía. En ella se puede ver el pico de absorbancia a 280 nm (aproximadamente al 40% de la pendiente, se puede decir que ya eluyó toda la proteína). Se analizaron por electroforesis aquellas fracciones que se corresponden con el pico de absorbancia (Figura 6.5). En las fracciones 24-32, se puede observar la elución de la proteína con algunas bandas adicionales.

Las fracciones recogidas en la columna de cromatografía de intercambio catiónico enriquecidas en la proteína de interés y con menor proporción de bandas contaminantes (fracciones 26-32) se juntaron en un Falcon de 15 mL, obteniendo un volumen de muestra de 14 mL. Se consideró que tanto la 24 como la 25 tenían mucha impureza en proporción con la cantidad de proteína y se descartaron.

Tras finalizar la cromatografía, se lavó la columna con 5 volúmenes de agua y 10 volúmenes de etanol a una velocidad de 1 mL/min y se guardó a 4°C.

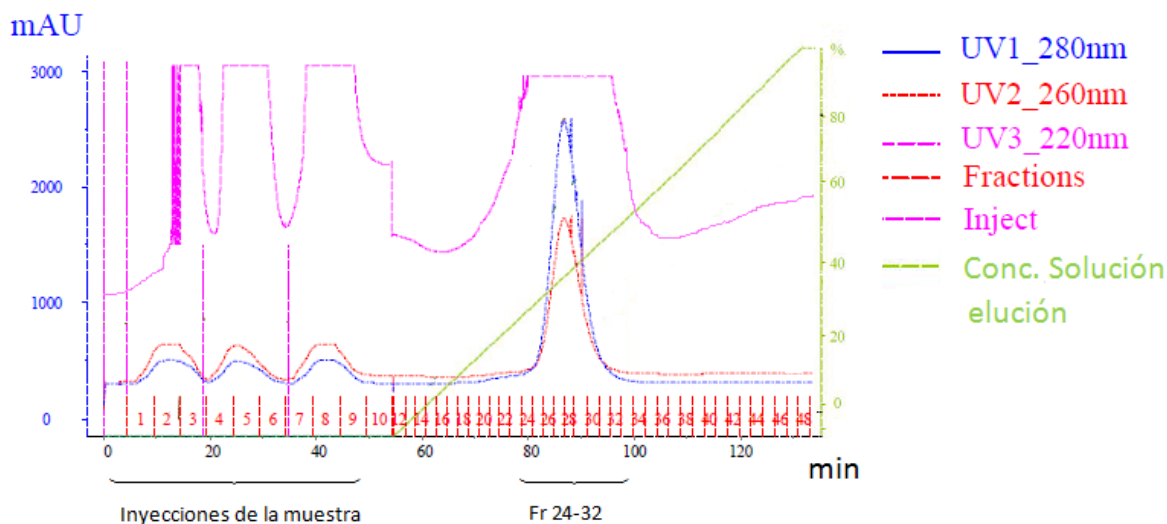


Figura 6.4: Cromatograma correspondiente a la columna HiTrap SP FF para la proteína HMGB1(Δ 7-164).

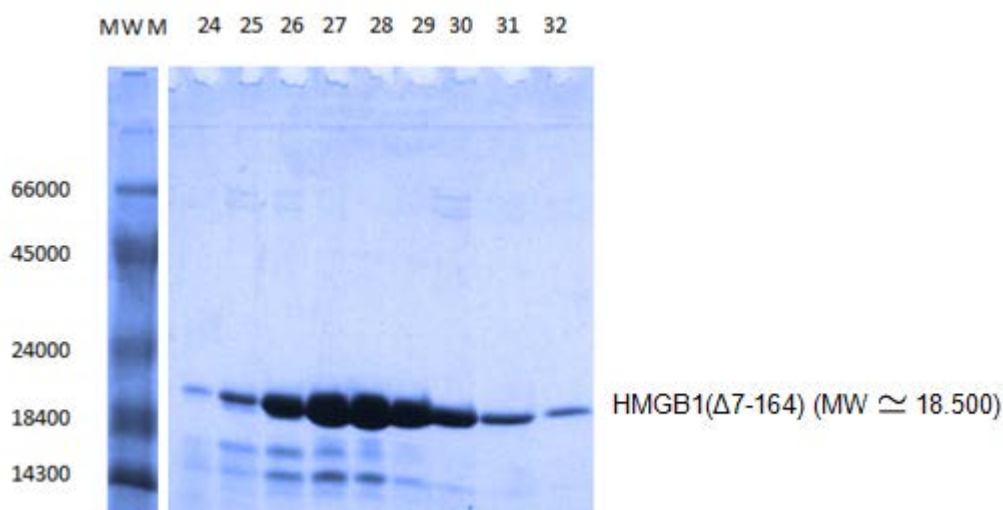


Figura 6.5: Gel SDS-PAGE correspondiente a las fracciones obtenidas tras la columna HiTrap SP FF para la proteína HMGB1(Δ 7-164). MWM, marcador de masa molecular

Al igual que para la anterior cromatografía, se determinaron los mg de proteína de la muestra obtenida midiendo su absorbancia y utilizando la ley de Lambert-Beer:

$$C (M) = \frac{A}{\varepsilon \cdot l} = \frac{1,16}{20700 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot L \cdot 1 \text{ cm}} = 5,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$$

$$5,6 \cdot 10^{-5} \frac{\text{mol}}{L} \cdot 18484 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \cdot 0,014 L = 0,0145 \text{ g} = 14,5 \text{ mg}$$

6.2.3. Cromatografía de exclusión molecular

Para eliminar las bandas adicionales fundamentalmente de menor tamaño observadas en el gel de la Figura 6.5, se recurrió a la cromatografía de exclusión molecular. La matriz de esta columna contiene esferas porosas microscópicas que permitieron la entrada de moléculas pequeñas, retrasándolas. Así, eluyeron en primer lugar las moléculas más grandes, por hacer menos recorrido, consiguiendo una separación de las moléculas por tamaño.

La muestra obtenida a partir de las fracciones seleccionadas de la columna de intercambio se purificó en una columna de exclusión molecular HiLoad Superdex 75 10/300 GL (24 mL de volumen empaquetado). Dicha columna tiene un rango óptimo de separación de proteínas de masa molecular entre 3.000 y 70.000 Da. El volumen máximo de muestra a cargar en esta columna para obtener una buena resolución en el cromatograma es de 500 μ L. Además, no es recomendable cargar más de 10 mg de proteína. Como tanto el volumen de muestra como la cantidad de proteína eran mayores (unos 14 mL y 14 mg respectivamente) (ver apartado 6.2.2), antes de cargar la muestra, ésta se concentró (0,65 mL finales), se dividió en dos alícuotas y se desarrollaron dos cromatografías consecutivas.

Para concentrar la muestra (ver apartado 5.2.5), se utilizó un VIVASPIN 20 MWCO=5000 (ver Tabla 5.10). Primero se hidrató la membrana añadiendo 15 mL de agua y se centrifugó durante 15 min a 7.500 g. Se descartó el agua tanto del depósito que contiene la muestra como del de filtrado. Después se lavó con 15 mL de la solución de equilibrado de la cromatografía de intercambio catiónico (100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM Tris pH=7,9) y se operó de la misma manera.

Seguidamente se añadió la muestra a concentrar. La muestra se centrifugó durante 65 minutos a 7.500 g, y se obtuvo un volumen en el depósito de muestra de 650 μ L. Durante este tiempo se fue revisando periódicamente el volumen de mezcla concentrada. Es conveniente guardar los filtrados obtenidos, para comprobar que no se haya perdido nada de proteína al concentrar. En este caso la absorbancia de los filtrados fue de 0,064 que, para un volumen de filtrado de 13 mL, da un total de 0,74 mg, de modo que se puede concluir que se perdió poca proteína en este paso.

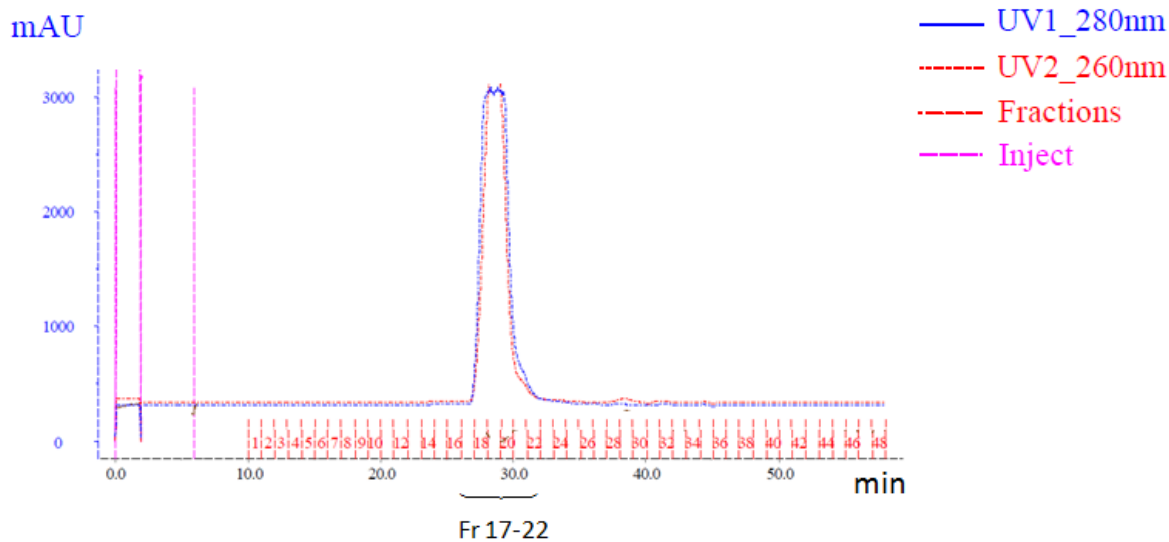
En la Tabla 6.4 se muestra un cuadro resumen de las condiciones en las que se llevó a cabo esta cromatografía. Para más detalles, consultar el apartado 5.2.3.

Tabla 6.4: Cuadro resumen de las condiciones de la cromatografía de exclusión molecular.

Columna de exclusión molecular	Columna HiLoad Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare). Matriz agarosa y dextrano entrecruzado
Presión máxima admisible	1,8 MPa
Volumen de resina de la columna	24 mL
Muestra	14,5 mg en 650 μ L (360 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM Tris pH=7,9).
Tamaño loop	500 μ L
Runs	2 runs (mitad del volumen de la muestra para cada run)
Flujo	0,5 ml/min
Condiciones de elución	Isocrática (composición constante de solución)
Solución de equilibrado y elución	150 mM NaCl, 50 mM HEPES pH=7,4, 1 mM DTT
Volumen de las fracciones	0,5 mL
Absorbancias medidas a λ	220 nm, 260 nm y 280 nm

Antes de cargar la muestra se equilibró la columna con 2 volúmenes de solución de equilibrado. A continuación, para la preparación de la muestra, ésta se centrifugó a 12.000 rpm, 4°C y 10 minutos en una microcentrífuga y, usando un loop de 500 μ L, se cargaron unos 300 μ L de sobrenadante en la columna de exclusión molecular. Se usaron 1,5 volúmenes de la solución de equilibrado y elución a un flujo constante de 0,5 mL/min. El volumen de las fracciones fue de 0,5 mL. Una vez acabada la cromatografía, se recogieron las fracciones que presentaban pico de absorbancia a 280 nm. Finalmente se cargaron los 350 μ L restantes de la muestra y se repitió el proceso. En la Figura 6.6 se muestran los cromatogramas de las dos cromatografías, y en la Figura 6.7 su correspondiente gel SDS-PAGE. Al finalizar, se lavó la columna con dos volúmenes de agua y dos volúmenes de alcohol al 20%.

RUN 1



RUN 2

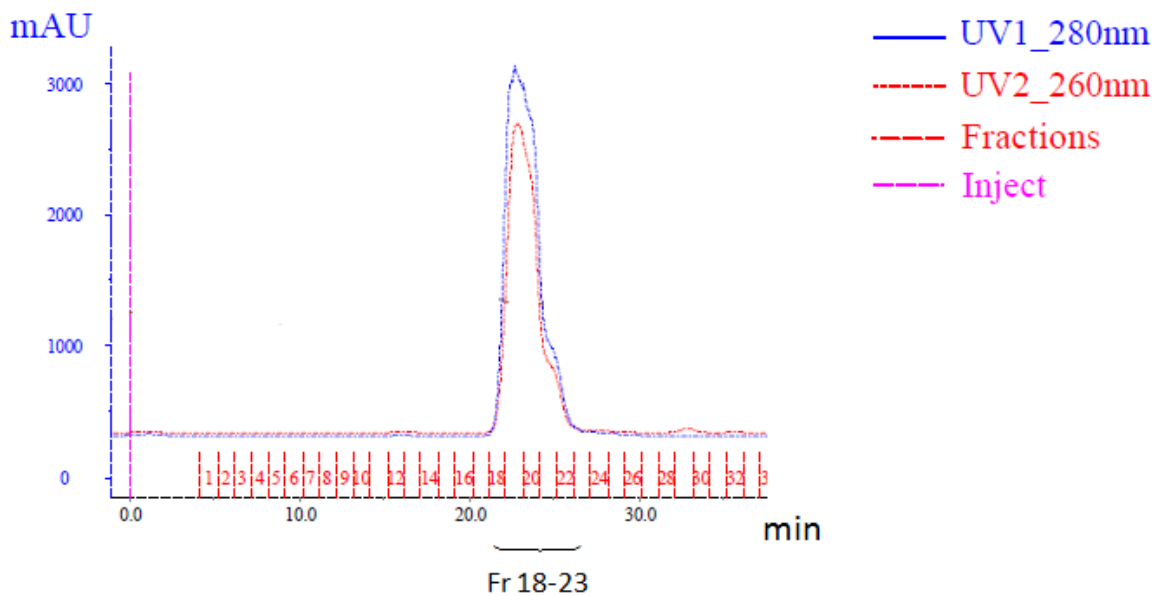


Figura 6.6: Cromatogramas correspondientes a la columna HiLoad Superdex 75 para la proteína HMGB1(Δ 7-164).

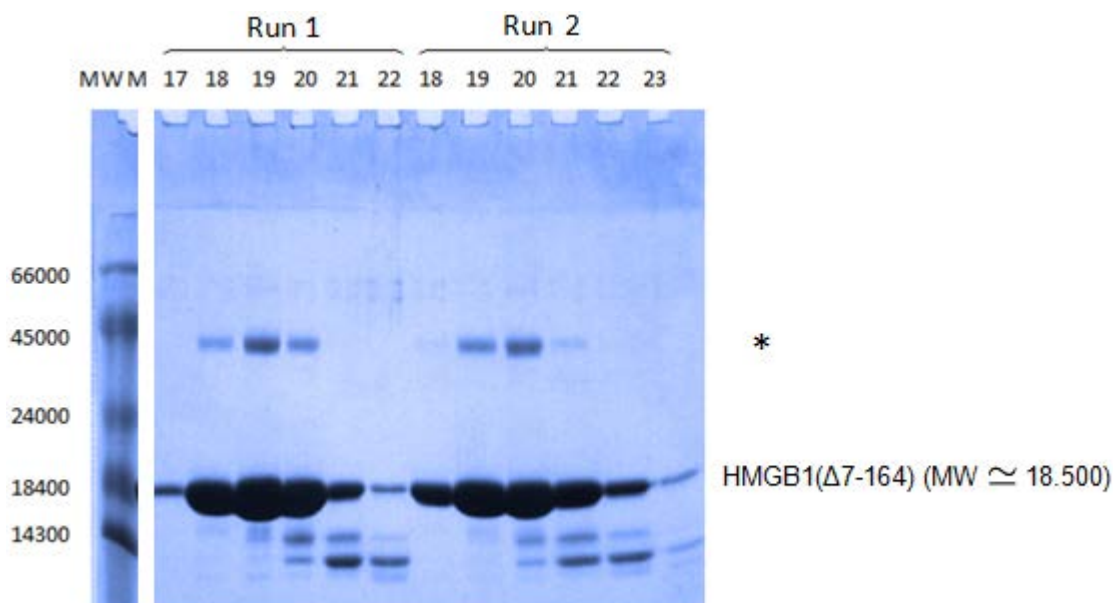


Figura 6.7: Gel SDS-PAGE correspondiente a las fracciones obtenidas tras la columna HiLoad Superdex 75 para la proteína HMGB1(Δ 7-164). MWM, marcador de masa molecular. * Posible dímero de la proteína HMGB1(Δ 7-164).

En función de los resultados obtenidos en el gel de electroforesis (Figura 6.7), se decidieron juntar las fracciones en función de su pureza. En la Tabla 6.5 se indica cómo se agruparon:

Tabla 6.5: Agrupación de las fracciones de ambos runs de la cromatografía de exclusión molecular según su pureza.

	Cromatografía 1	Cromatografía 2	Volumen total (mL)
Muestra 1	Fracciones 17, 18 y 19	Fracciones 18 y 19	2,5
Muestra 2	Fracción 20	Fracción 20	1
Muestra 3	Fracción 21	Fracción 21 y 22	1,5

6.3. Concentración final de la proteína

Para cristalografía es recomendable obtener muestras no sólo muy puras, sino también muy concentradas, ya que se trabaja con volúmenes muy pequeños. En general, se considera una muestra de proteína apta para cristalografía si su concentración final es mayor a 2 mM.

Una vez juntadas las fracciones obtenidas de la columna de exclusión molecular (Tabla 6.5), éstas se concentraron utilizando los dispositivos Vivaspín®. Estos dispositivos, como se explicó en el apartado 5.2.5, además de servir para concentrar, también se pueden utilizar para cambiar el medio de la muestra (diafiltración). De esta manera se utilizó una solución de menor contenido en sal para preparar la muestra para los ensayos de cristalografía: 50 mM NaCl, 25 mM HEPES, 1mM DTT, pH=7,4 (la proteína, tras salir de la columna de exclusión molecular, se encuentra disuelta en la solución 150 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1 mM DTT, pH=7,4).

El procedimiento fue igual que en el apartado 6.2.3., donde hubo que concentrar las muestras para cargar un volumen adecuado en la columna de exclusión molecular. Sin embargo existen una serie de diferencias respecto a la vez anterior: El Vivaspín® que se utilizó en esta ocasión fue de 4 mL de capacidad, en vez de 20 mL, ya que el volumen de las muestras era inferior a 4 mL (Tabla 5.10). En este caso, además de concentrar, se hizo una diafiltración. Esto es, tras la concentración de la proteína, se realizan una serie de lavados con la nueva solución en la que se quiere dejar disuelta la muestra de proteína.

Primero se hidrataron las membranas (en este caso 3 mL de agua miliQ, y se centrifugó 10 min a 7.500 g), se añadió 3 mL de solución en la que se encuentra disuelta la proteína (150 mM NaCl, 50 mM HEPES pH=7,4, 1 mM DTT) y se centrifugó 10 min a 7500 g. Finalmente se concentró la muestra proteica (se centrifugó 15 min a 7.500 g).

Para realizar la diafiltración, se realizaron 3 lavados de 3 mL de solución en la que se quiere dejar la muestra (50 mM NaCl, 25 mM HEPES, 1mM DTT, pH=7,4), durante 20 min y 7.500 g, para cada muestra. En la Tabla 6.6 se muestran las concentraciones y volúmenes finales obtenidos, así como los mg, mientras que en la Figura 6.8 se observa el análisis electroforético en gel SDS para cada muestra con el fin de observar su pureza.

Tabla 6.6: Resultados de la concentración de las muestras finales.

	V inicial (mL)	V final (mL)	C final (mM)	mg
Muestra 1	2,5	0,3	2,62	14,55
Muestra 2	1	0,3	0,81	4,54
Muestra 3	1,5	0,2	0,36	1,36

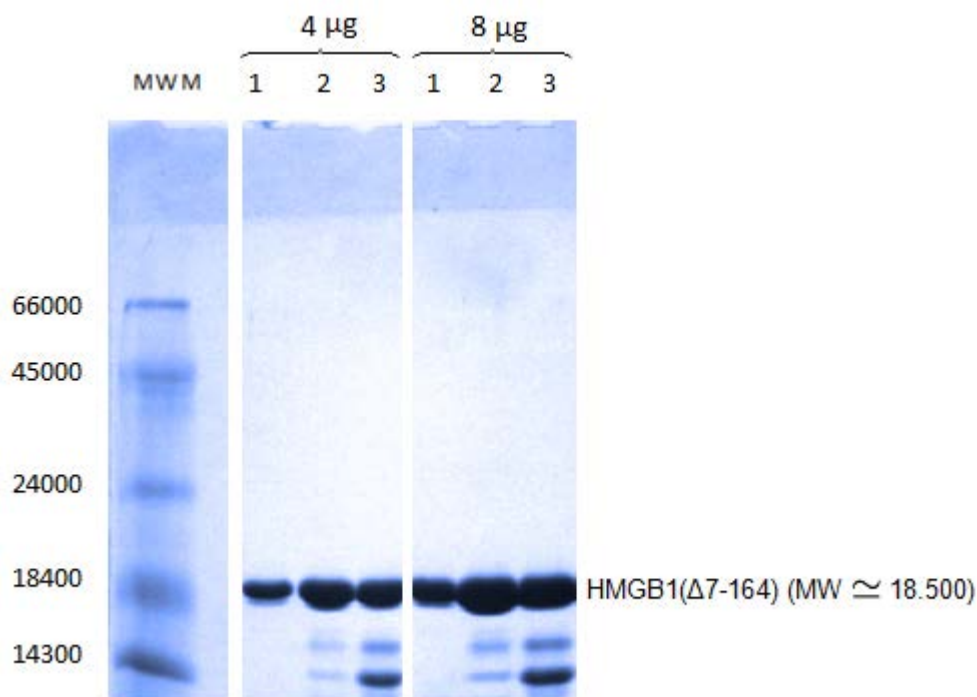


Figura 6.8: Gel SDS-PAGE de las fracciones finales concentradas de la proteína HMGB1(Δ7-164). MWM, marcador de masa molecular.

Con el fin de asegurar que no se hubiera perdido proteína en este paso, se guardaron los filtrados y se leyó su absorbancia. En este caso, los valores fueron de 0, 0,0027 y 0,0044, de modo que se puede asegurar que no se perdió proteína.

Según los datos obtenidos en la Tabla 6.6, la muestra 1 tenía una concentración final adecuada (más de 2 mM) y mucha cantidad de proteína, de modo que no se requirió seguir concentrándola. Sin embargo, las concentraciones finales obtenidas de las muestras 2 y 3 fueron muy bajas, la cantidad en mg de proteína en esas muestras fue muy pequeña y además contenían la mayoría de bandas contaminantes de menor masa molecular (Figura 6.8).

En vista de los resultados obtenidos en el gel SDS-PAGE (Figura 6.8), la muestra 1 se seleccionó para su uso en cristalografía. Esta muestra de 300 μL se distribuyó en 6 alícuotas de 50 μL y se congelaron en nitrógeno líquido. En cambio las muestras 2 y 3 se descartaron para su uso en los ensayos cristalográficos.

Por lo tanto, los ensayos cristalográficos se llevaron a cabo con la muestra 1, de elevada pureza y con una concentración de 2,62 mM (en 50 mM de NaCl, 25 mM HEPES, 1 mM DTT y pH=7,4).

6.4. Ensayos cristalográficos con la proteína HMGB1

Una vez se ha obtenido una fracción de proteína HMGB1(Δ 7-164) muy pura, apta para cristalografía, se procede a realizar ensayos cristalográficos, con el objetivo de conseguir cristalizar un complejo de la proteína unida a ADN.

Se probaron tres oligonucleótidos distintos:

- C₂A₂TA₂TCGCGAT₂AT₂G₂ (20 pb).
- GA₂T₂A₂CGTACGT₂A₂T₂CG (21 pb).
- CGCGT₅CGCGA₅CGCG₂ (23 pb).

No se sabe exactamente la longitud de secuencia idónea para que los dos dominios HMG-box (box A y box B) se unan al ADN y así poder cristalizar el complejo. En trabajos previos se consiguió cristalizar un dominio HMG-box (box A) con una secuencia de 10 pb [18]. Además, se sabe que en las dos estructuras resueltas que contienen dos dominios HMG-box, la quimera SRY-box y la HMGB de la mitocondria (TFAM), se utilizaron una secuencia de 16 y 22 pb respectivamente. Por lo tanto se ha considerado que las tres secuencias presentaban unas longitudes adecuadas para la formación del complejo. Además, la formación del complejo se ha verificado mediante ensayos EMSA (ver más adelante).

En cuanto a los ensayos cristalográficos, las condiciones a variar fueron la solución de cristalización, el pH, la relación y la concentración de complejos HMGB1-ADN y el tipo de precipitante, siendo la temperatura constante (4°C).

- 1) Solución de cristalización: Se han utilizado principalmente soluciones de la casa Hampton Research (Natrix HR2-116). Además se han utilizado soluciones “adaptadas” de elaboración propia. Para la selección de las soluciones a utilizar se han tenido en cuenta estudios anteriores. Las soluciones más utilizadas han sido Natrix 15 (N15), Natrix 43 (N43), y soluciones adaptadas que contienen Tris (T6 y T9) y cacodilato de sodio (C6 y C9) (ver anexo A.4).
- 2) pH: Los pH de trabajo se encuentran entre 6 y 7,5, para trabajar en condiciones próximas a las fisiológicas. No obstante, a partir de datos obtenidos en un seminario sobre las condiciones de cristalización de la proteína ABF2, una proteína similar a la de interés (también con dos motivos HMG-box de unión al ADN), se realizaron unos pocos ensayos a pH ácido (pH=4,5).

- 3) Relación y concentración de complejo HMGB1-ADN: Se han probado las relaciones proteína-oligonucleótido 1:1, 2:1 y 4:1. Además se aumentó la concentración de proteína-oligonucleótido en algunas gotas (serie S) para ver su influencia a la hora de obtener un cristal.
- 4) Precipitante: Los precipitantes utilizados han sido PEG y, principalmente MPD. Se empieza con una concentración determinada en el pozo y se va aumentando progresivamente, en función de cómo vaya evolucionando la gota.

La formación de complejos entre los tres oligonucleótidos mencionados anteriormente y la HMGB1(Δ 7-164) se confirmó mediante electroforesis en geles EMSA. Este tipo de electroforesis se basa en la disminución de la movilidad electroforética de los complejos ADN-proteína en comparación con el ADN libre. Las muestras se prepararon manteniendo una concentración constante de ADN y variando la concentración de proteína. Para todos los oligonucleótidos utilizados se observó la formación de complejo con la proteína HMGB1(Δ 7-164) (Figuras 6.9, 6.10 y 6.11).

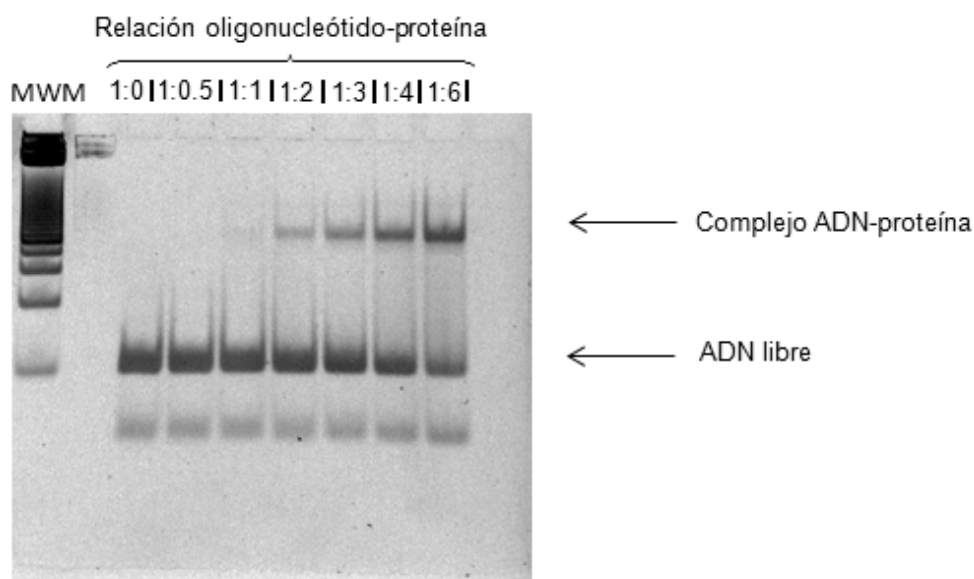


Figura 6.9: Gel EMSA del complejo formado por el oligonucleótido GA₂T₂A₂CGTACGT₂A₂T₂CG con la proteína HMGB1(Δ 7-164) teñido con SYBR® Gold.

MWM: marcador de masa molecular 20 *Base Pair DNA ladder* Bayou Biolabs, que presenta bandas de 20 pb a 500 pb en incrementos de 20 pb. Se indica la relación molar oligonucleótido:proteína.

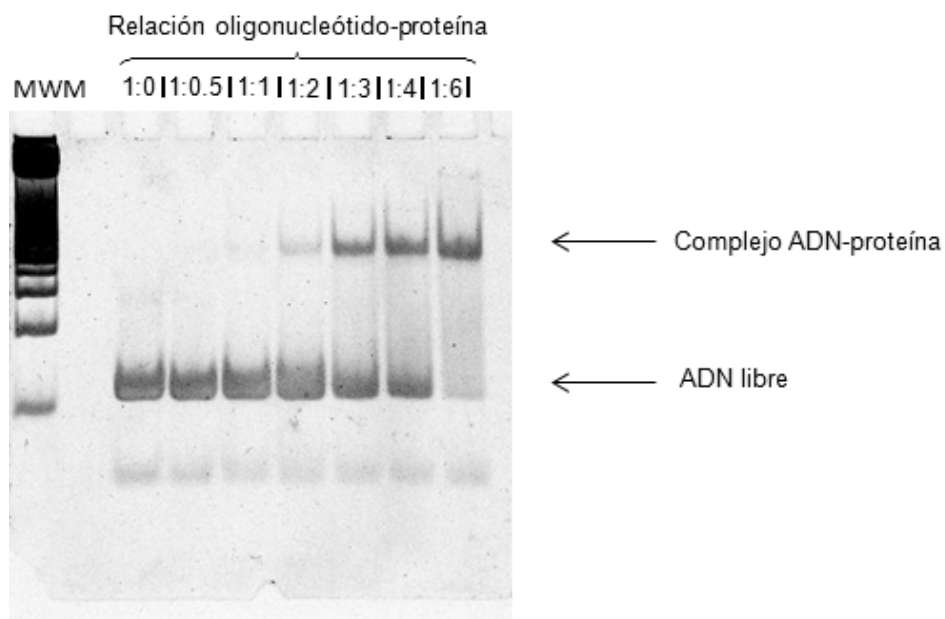


Figura 6.10: Gel EMSA del complejo formado por el oligonucleótido CGCGT₅CGCGA₅CGCG₂ con la proteína HMGB1(Δ7-164) teñido con SYBR® Gold.

MWM: marcador de masa molecular 20 Base Pair DNA ladder Bayou Biolabs. Se indica la relación molar oligonucleótido:proteína.

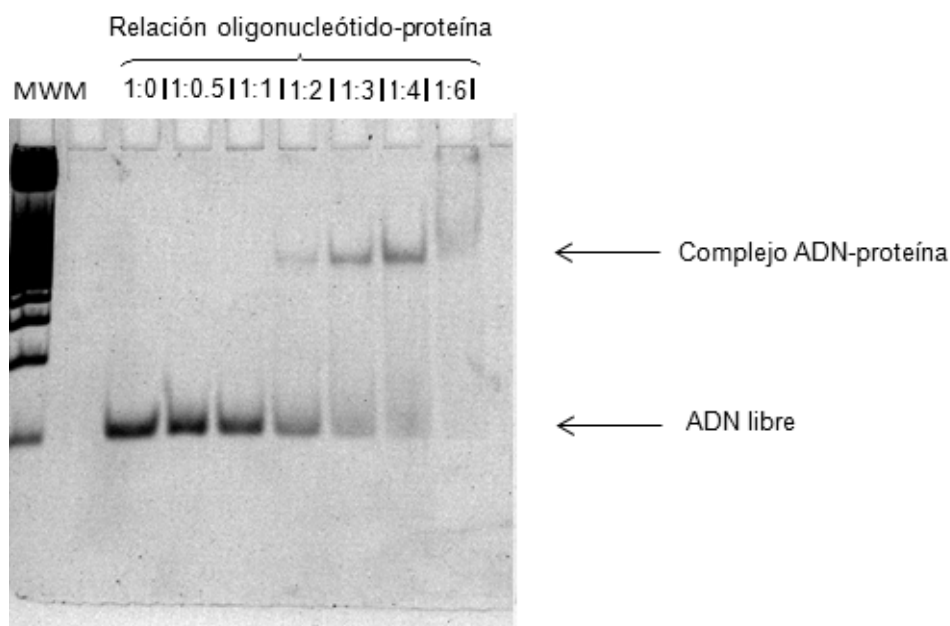


Figura 6.11: Gel EMSA del complejo formado por el oligonucleótido C₂A₂TA₂TCGCGAT₂AT₂G₂ con la proteína HMGB1(Δ7-164) teñido con SYBR® Gold.

MWM: marcador de masa molecular 20 Base Pair DNA ladder Bayou Biolabs. Se indica la relación molar oligonucleótido:proteína.

De forma muy breve, el siguiente esquema resume la cantidad de ensayos llevados a cabo para cada oligonucleótido y dónde se pudieron pescar cristales:

Tabla 6.7: Resumen de los ensayos cristalográficos llevados a cabo. Se indica el oligonucleótido utilizado, la cantidad de cristales y las gotas donde se pescaron cristales.

Serie A	Serie G	Serie S, B y R
GA ₂ T ₂ A ₂ CGTACGT ₂ A ₂ T ₂ CG	CGCGT ₅ CGCGA ₅ CGCG ₂	C ₂ A ₂ TA ₂ TCGCGAT ₂ AT ₂ G ₂
12 gotas	46 gotas	48 gotas
(ningún cristal pescado)	(se pescó en las gotas G2, G24 y G40)	(se pescó en las gotas B6, B11 y B12)

Se debe tener en cuenta que la cristalización de fragmentos tan largos de ADN junto con una proteína de unos 160 aminoácidos presenta muchas dificultades debido a la complejidad de obtener una estructura ordenada de estas moléculas.

En los apartados siguientes se resumen las condiciones de los 106 ensayos cristalográficos realizados y los resultados obtenidos. En ellos se detallan sus condiciones (relación molar proteína-oligonucleótido y sus concentraciones, las sales utilizadas, pH y tipo de precipitante). Para ver una descripción más detallada de cada gota, ver el anexo B.

6.4.1. Oligonucleótido GA₂T₂A₂CGTACGT₂A₂T₂CG con la proteína HMGB1

Se han realizado un total de 12 gotas (serie A) con este oligonucleótido de 21 pb. La Tabla 6.8 muestra un resumen de estas condiciones.

Tabla 6.8: Descripción resumida de las condiciones de las gotas de la serie A. Para una descripción más detallada, ver anexo B.

Gotas	Relación molar P:O ¹	Sales utilizadas	pH	Precipitantes utilizados
A1→A6	2:1 (0,4 mM/0,2 mM)	MgCl ₂ , NH ₄ Ac	6,7,5	MPD
A7→A12	1:1 (0,25 mM/0,25 mM)	MgCl ₂ , NH ₄ Ac	6,7,5	MPD

¹P, proteína; O, oligonucleótido.

Gotas A1→A6: Se utilizaron las soluciones N15, N43, C6, C9, T6 y T9 (ver anexo A.4) y con relación molar P:O de 2:1. Estas gotas empezaron con una concentración de MPD en el pozo baja, de 20%, que se fue aumentando gradualmente un 2%. Todas las gotas eran inicialmente claras y dieron una alta separación de fases junto a una rápida y excesiva nucleación (Figura 6.12) a concentraciones de MPD bajas (en torno al 30%). Esta es una situación desfavorable, ya que los cristales no pueden crecer debido al exceso de núcleos cristalinos.

Gotas A7→A12: Se decidió disminuir la relación molar a P:O 1:1 y aumentar la concentración en el pozo de MPD de forma más lenta (1%). La evolución de las gotas fue similar a las anteriores, ya que aun así, no se pudo evitar la excesiva nucleación. Debido a que los ensayos con los otros oligonucleótidos parecían más prometedores, se centró más la atención en ellos (ver apartados siguientes).

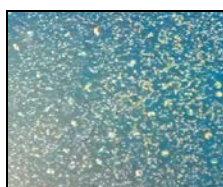


Figura 6.12: Ejemplo de nucleación excesiva (Gota A1).

6.4.2. Oligonucleótido CGCGT₅CGCGA₅CGCG₂ con la proteína HMGB1

Se han realizado un total de 46 gotas (serie G) con el oligonucleótido CGCGT₅CGCGA₅CGCG₂ (23 pb). La Tabla 6.9 muestra un resumen de estas condiciones.

Tabla 6.9: Descripción resumida de las condiciones de las gotas de la serie G. Para una descripción más detallada, ver anexo B.

Gotas	Relación molar P:O ¹	Salas utilizadas	pH	Precipitantes utilizados
G1→G6	1:1 (0,25 mM/0,25 mM)	MgCl ₂ , NH ₄ Ac	6;7,5	MPD
G7→G18	1:1 (0,25 mM/0,25 mM)	MgCl ₂ , NH ₄ Ac	4,5	PEG,MPD
G19→G25	1:1 (0,25 mM/0,25 mM)	MgCl ₂ , NH ₄ Ac	6;7,5	MPD
G26→G35	2:1 (0,5 mM/0,25 mM)	MgCl ₂ , NH ₄ Ac	6;7,5	MPD
G36→G40	1:1 (0,25 mM/0,25 mM)	MgCl ₂ , NH ₄ Ac	6;7,5	MPD
G41→G46	4:1 (0,8 mM/0,2 mM)	MgCl ₂ , NH ₄ Ac	6;7,5	MPD

¹P, proteína; O, oligonucleótido.

G1→G6: Se probaron las mismas soluciones de cristalización que en las anteriores gotas. En la gota G2, que contiene la solución N43, se obtuvieron varios cristales con crecimiento en diferentes direcciones (Figura 6.13, izquierda). A pesar de ello se pescó un único cristal. Para ello se tuvo que partir por la zona que delimita con los otros cristales con ayuda de una aguja. En la gota G5 se produjeron cristales líquidos (Figura 6.13, derecha) y en el resto de casos, precipitado cristalino que no evolucionó favorablemente.

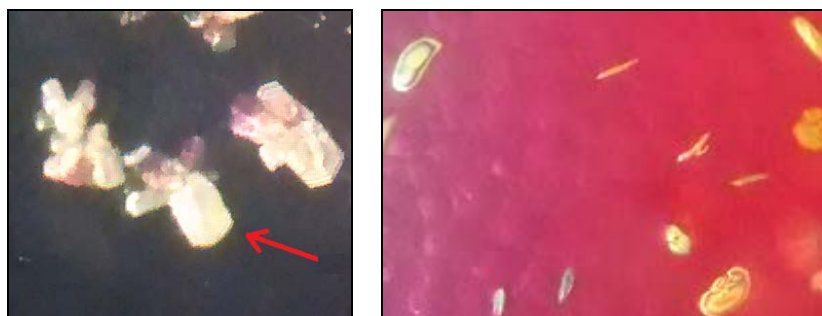


Figura 6.13: Gota G2 (izquierda) y gota G5 (derecha).

G2: 0,25 mM HMGB1; 0,25 mM CGCGT₅CGCGA₅CGCG₂; 25 mM Tris pH= 7,5; 25 mM NH₄Ac + 5 mM MgCl₂; 5% MPD. Pozo: 38% MPD.

G7→G18: En estas gotas se intentaron reproducir las condiciones de cristalización de la proteína ABF2 (una proteína similar a la HMGB1(Δ 7-164), con dos motivos de unión al ADN del tipo HMG-box):

- Volumen de gota: entre 2 y 4 μ L
- Sales: 10 mM NH₄Ac en la gota.
- Tampón: Citrato de trisodio a pH 4,5.
- Tipo de precipitante: PEG 4000.
- Concentración de precipitante en el pozo: 25-32%.

La característica que más destaca de estas condiciones es su bajo pH (4,5) muy diferente al resto de gotas llevadas a cabo en este proyecto (entre 6 y 7,5). Se probaron tanto el precipitante PEG como el MPD, además de combinaciones con la sal MgCl₂. No obstante, sólo se obtuvieron gotas claras y alguna turbia.

G19→G25: Estas gotas son repeticiones de las gotas G1-G6, enfocándose en las soluciones de cristalización N43, C9 y T9. La gota G24 contenía dos cristales pequeños pero con las caras aparentemente muy lisas (Figura 6.14), lo cual podría indicar una buena ordenación del cristal. Ambos cristales fueron pescados.



Figura 6.14: Gota G24.

G24: 0,25 mM HMGB1; 0,25 mM CGCGT₅CGCGA₅CGCG₂; 25 mM Tris pH= 7,5; 12,5 mM MgCl₂; 5% MPD; 1 mM DTT. Pozo: 37% MPD.

G26→G35: Para estas gotas el complejo se incubó O.N. (en lugar de 1 hora como en las anteriores gotas) con la finalidad de facilitar la unión entre oligonucleótido y proteína. Estas gotas (con relación proteína-oligonucleótido 2:1), a diferencia de las anteriores (con relación 1:1), sólo presentaron separación de fases y ningún precipitado cristalino, a pesar de haber alcanzado concentraciones de MPD en el pozo superiores al 55%.



Figura 6.15: Ejemplo de separación de fases: Gota G27.

G36→G40: Estas gotas se diferencian de las gotas G19 y G22, en que el complejo tuvo una incubación O.N. La gota G40 (Figura 6.16) contenía un pequeño cristal que brillaba mucho y aparentemente parecía estar bien ordenado (caras bastante lisas y aristas definidas), de modo que se pescó.



Figura 6.16: Gota G40.

G40: 0,25 mM HMGB1; 0,25 mM CGCGT₅CGCGA₅CGCG₂; 25 mM NaCac pH= 6,0; 12,5 mM MgCl₂; 5% MPD; 1 mM DTT. Pozo: 40% MPD.

G41→G46: Se llevaron a cabo 6 gotas con relación molar proteína-oligonucleótido 4:1. La incubación del complejo fue O.N. Sólo se consiguieron pequeños cristales que no crecieron y separación de fases muy marcada, a pesar de haber alcanzado concentraciones en el pozo de hasta 59%.

6.4.3. Oligonucleótido C₂A₂TA₂TCGCGAT₂AT₂G₂ con la proteína HMGB1

Con este oligonucleótido (20 pb) se han realizado un total de 46 gotas, divididas en tres series: Serie S (relación proteína-oligonucleótido 2:1), serie B (relación 1:1) y serie R (relación 4:1). La Tabl muestra un resumen de estas condiciones.

Tabla 6.10: Descripción resumida de las condiciones de las gotas de las series S, B y R. Para una descripción más detallada, ver anexo B.

Gotas	Relación molar P:O ¹	Salas utilizadas	pH	Precipitantes utilizados
S1→S6	2:1 (0,5 mM/0,25 mM)	MgCl ₂ , NH ₄ Ac	6;7,5	MPD
S7→S12	2:1 (0,5 mM/0,25 mM)	MgCl ₂	6;7,5	MPD
S13→S18	2:1 (0,6 mM/0,3 mM)	MgCl ₂	6;7,5	MPD
S19→S24	2:1 (0,5 mM/0,25 mM)	MgCl ₂	6;7,5	MPD
B1→B6	1:1 (0,3 mM/0,3 mM)	MgCl ₂ , NH ₄ Ac	6;7,5	MPD
B7→B12	1:1 (0,3 mM/0,3 mM)	MgCl ₂	6;7,5	MPD
B13→B18	1:1 (0,3 mM/0,3 mM)	MgCl ₂	6;7,5	MPD
R1→R6	4:1 (1 mM/0,25 mM)	MgCl ₂ , NH ₄ Ac	6;7,5	MPD

¹P, proteína; O, oligonucleótido.

S1→S6: En las gotas cuyas soluciones de cristalización fueron N15 y T9 se consiguió obtener pequeños cristales irregulares (Figura 6.17), los cuales tenían bastante brillo. Sin embargo, debido a que no se pudo aumentar el tamaño de éstos y que no mejoraron, se descartaron. En el resto de las gotas se obtuvo separación de fases a altas concentraciones de pozo, pero no se obtuvo ningún tipo de precipitado, aun sobrepasando el 60% de precipitante en el pozo.



Figura 6.17: Gota S1 (izquierda) y gota S6 (derecha).

S7→S12: Se decidió realizar repeticiones haciendo hincapié en las soluciones de cristalización N15 y T9, obteniendo resultados similares a las anteriores gotas.

S13→S18: Con el fin de estudiar la influencia de la concentración de proteína y oligonucleótido, se decidió aumentarla a 0,6 mM y 0,3 mM respectivamente, manteniendo la relación 2:1. No se apreció ninguna ventaja significativa, por lo que se decidió no realizar más gotas con estas concentraciones.

S19→S24: En estas repeticiones se utilizaron únicamente las soluciones de cristalización N15 y T9 (las que habían dado mejores resultados en los ensayos previos) pero a diferencia de las anteriores, el complejo tuvo una incubación O.N. (en vez de 1 hora). En la cápsula S24 se obtuvieron cristales de un tamaño adecuado, sin embargo éstos presentaban diversas direcciones de crecimiento y además no brillaban mucho (Figura 6.18).



Figura 6.18: Gota S24.

S24: 0,5 mM HMGB1; 0,25 mM $C_2A_2TA_2TCGCGAT_2AT_2G_2$; 25 mM Tris pH= 7,5; 12,5 mM $MgCl_2$; 5% MPD; 1 mM DTT. Pozo: 40% MPD.

En la serie B la relación de proteína-oligonucleótido fue de 1:1.

B1→B6: Se probaron las mismas soluciones de cristalización que en las gotas S1-S6, obteniendo, de igual manera, cristales solamente con las soluciones de cristalización N15 y T9. En la cápsula B1 se obtuvieron cristales irregulares que no presentaban mucho brillo. En la cápsula B6 se obtuvieron, al 40% de concentración de MPD en el pozo, pequeños cristales irregulares y pegados en el centro de la gota, que al cabo de unos días aumentaron de tamaño. Aunque no presentaban caras muy lisas, se pescaron dos cristales debido a su alto brillo y gran tamaño. Al igual que en la gota G2, los cristales se tuvieron que partir por las zonas delimitantes con ayuda de una aguja, para poder separarlos (Figura 6.19, derecha). Como se verá más adelante (apartado 6.5) se han podido analizar los diagramas de difracción obtenidos con estos cristales, ya que presentaban una calidad aceptable.



Figura 6.19: Gota B1 (izquierda) y gota B6 (derecha).

B6: 0,3 mM HMGB1; 0,3 mM C₂A₂TA₂TCGCGAT₂AT₂G₂; 25 mM Tris pH= 7,5; 12,5 mM MgCl₂; 5% MPD; 1 mM DTT. Pozo: 40% MPD.

B7→B12: Este conjunto de gotas se centró exclusivamente en las soluciones de cristalización N15 y T9. Los cristales obtenidos utilizando la solución N15 fueron bastante inestables (se fundieron con facilidad), mientras que con la solución T9 se obtuvieron cristales grandes (B11 y B12) (Figura 6.20). B11 brillaba mucho pero presentaba alguna imperfección, de modo que se le fue aumentando la concentración en el pozo un 1% para que se terminaran de definirse las aristas. B12 presentaba menos brillo y aristas menos definidas. Ambos cristales se pescaron y sus diagramas de difracción también presentaron una calidad aceptable como para ser analizados. Al ser réplicas de B6, sus diagramas de difracción fueron muy parecidos.



Figura 6.20: Gota B11 (izquierda) y gota B12 (derecha).

B11 y B12: 0,3 mM HMGB1; 0,3 mM C₂A₂TA₂TCGCGAT₂AT₂G₂; 25 mM Tris pH= 7,5; 12,5 mM MgCl₂; 5% MPD; 1 mM DTT. Pozo: 42% MPD.

B13→B18: A diferencia del resto de gotas de la serie B, el complejo tuvo una incubación O.N. Subiendo la concentración de forma similar a anteriores ocasiones, se produjo un exceso de nucleaciones. Se deberían repetir y subir las concentraciones de MPD del pozo de forma más lenta.

R1→R6: Se llevaron a cabo 6 gotas con relación molar 4:1. Para la solución de cristalización Natrix 15, se observó un cristal (Figura 6.21) que crece en varias direcciones. De momento se sigue supervisando, ya que el cristal todavía se está formando.



Figura 6.21: Gota R1

R6: 1 mM HMGB1; 0,25 mM C₂A₂TA₂TCGCGAT₂AT₂G₂; 25 mM NaCac pH= 6; 20 mM MgCl₂; 2,5% MPD. Pozo: 42% MPD.

Consideraciones finales:

En general, de las 6 diferentes soluciones de precipitación utilizadas (Natrix 15, Natrix 43, C6, C9, T6 y T9), aquéllas con las que se han obtenido mejores resultados han sido Natrix 15, Natrix 43 y T9. Se podrían probar también otras soluciones (ver anexo A.4). También convendría probar con otro tipo de sales como CaCl₂.

Principalmente se llevaron a cabo gotas con relación proteína oligonucleótido 1:1 y 2:1. Se podrían realizar más ensayos con otras relaciones, como 4:1 (en este proyecto sólo le realizaron 12 gotas).

En las primeras gotas que se realizaron, la incubación del complejo fue de 1 hora. Sin embargo, considerando la longitud de la secuencia de los oligonucleótidos utilizados (≥ 20 pb) y que la proteína a cristalizar contiene unos 160 aminoácidos, se probó también incubación O.N. para facilitar la formación del complejo (recomendable para futuros experimentos).

Los diagramas de difracción procedentes de las gotas B6, B11 y B12 (como se verá en el apartado 6.5) presentaron buena calidad como para ser analizados. Por lo tanto se recomendaría seguir trabajando alrededor de esas condiciones (0,3 mM HMGB1; 0,3 mM $C_2A_2TA_2TCGCGAT_2AT_2G_2$; 25 mM Tris pH = 7,5; 12,5 mM $MgCl_2$; 5% MPD; 1 mM DTT. Pozo: 40% MPD) y así obtener un cristal que brille más y que presente una forma más regular que los obtenidos en este proyecto; así se obtendría un cristal más ordenado que daría lugar a mejores diagramas de difracción.

6.5. Análisis de los resultados de difracción

Se consiguieron difractar 8 cristales (B6-1, B6-2, B11, B12, G2, G24-1, G24-2, G40). Estos cristales fueron difractados en la plataforma XALOC del sincrotrón ALBA de Cerdanyola del Vallès (Barcelona). Cuantas más reflexiones aparezcan en los diagramas de difracción, de más información se dispondrá acerca de la estructura de la molécula. Sólo B6-1, B11 y B12 mostraron unos diagramas de difracción con suficientes reflexiones como para ser estudiados. El resto de cristales presentaron unos diagramas de difracción con muy pocas reflexiones ya que los cristales no presentaban orden.

A través del análisis de los diagramas de difracción obtenidos de la serie B (B6-1 y B12, ambos correspondientes a las mismas condiciones de cristalización) se ha podido resolver la estructura del ADN. A continuación se detalla el proceso seguido.

Parámetros de difracción:

Los valores utilizados durante la recogida de datos fueron los siguientes:

- Ángulo de oscilación: 1° .
- Distancia entre el cristal y el detector: 550,4 mm.
- Ángulo total girado por el goniómetro: 360° .
- Número de diagramas de difracción: 360.
- Longitud de onda del rayo X: 0,979 Å.
- Tiempo de exposición por imagen: 0,5 segundos.

Desde la cabina de control se pudo centrar el cristal para poder optimizar el punto de incidencia de la radiación sincrotrón. Se debe escoger una zona representativa sin imperfecciones. Una vez centrado, se procedió a la difracción en diferentes ángulos con la ayuda de un goniómetro, obteniendo así el conjunto de diagramas (Figura 6.22).

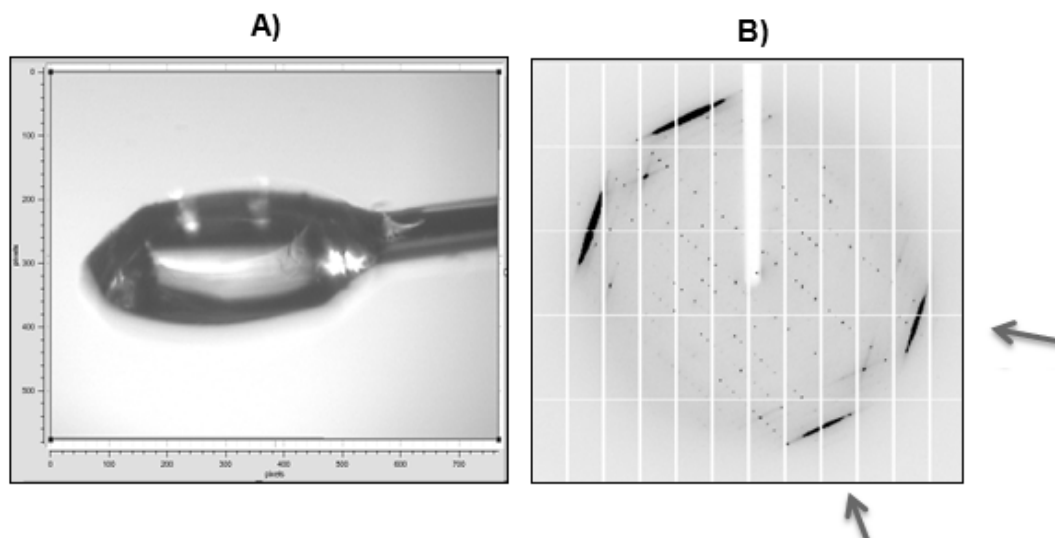


Figura 6.22: Difracción del cristal B6-1.

A) Imagen del cristal B6-1 en el loop. B) Uno de los diagramas de difracción obtenidos del cristal B6-1 obtenido durante la recogida de los datos. Los cristales B11 y B12 presentaron diagramas similares.

En el diagrama de difracción mostrado se observan abundantes reflexiones de buena intensidad, las cuales van a permitir obtener información acerca de la estructura molecular. Las reflexiones próximas al centro representan las distancias más grandes dentro del cristal (el diámetro de la molécula del ADN es de unos 20 Å). Las difracciones que se encuentran en la periferia indican distancias más cortas (como la distancia entre bases de 3,4 Å). La reflexión más alejada que puede detectarse se define como resolución. Así, cuanto más lejos lleguen las reflexiones, más resolución tendrá un cristal y, por tanto, más información se obtendrá acerca de la estructura. En este caso fue de 2,97 Å. Además, se observan dos stackings intensos correspondientes al ADN (flechas en Figura 6.22.B). Esto indica que las cadenas de ADN se encuentran posicionadas en dos direcciones, es decir, pueden estar, o bien cruzadas entre ellas en el espacio, o bien dobladas debido a la proteína.

Determinación de la celda y el grupo espacial:

El tratamiento de los datos se inició utilizando el programa *iMosflm*. El programa realiza el indexado de las reflexiones de una serie de diagramas de difracción y propone una serie de celdas elementales que pueden dar ese patrón de difracción.

En la Figura 6.23 se pueden ver estas celdas propuestas ordenadas de menor a mayor valor de penalización. Este valor de penalización da una idea de las diferencias que existen entre las reflexiones reales y las que daría idealmente esa celda.

Solution	Lat.	Pen.	a	b	c	α	β	γ	$\sigma(x,y)$	$\sigma(\theta)$	δ beam
1 (ref)	aP	0	26.4	60.9	76.3	95.8	90.1	89.9	1.36	1.40	0.01 (0.0)
2 (ref)	aP	0	26.4	60.9	76.3	84.2	89.9	89.9	1.36	1.40	0.01 (0.0)
3 (ref)	mP	1	60.9	26.4	76.3	90.0	95.8	90.0	1.36	1.40	0.01 (0.0)
4 (reg)	oP	56	26.4	60.9	76.2	90.0	90.0	90.0	-	-	-
5 (reg)	mP	56	26.4	60.9	76.2	90.0	90.2	90.0	-	-	-
6 (reg)	mP	56	26.4	76.2	60.9	90.0	89.9	90.0	-	-	-
7 (reg)	mC	79	154.7	26.4	60.9	90.0	95.8	90.0	-	-	-
8 (reg)	mC	80	124.6	26.4	76.2	90.0	95.8	90.0	-	-	-
9 (reg)	oC	134	26.4	154.7	60.9	90.0	90.0	90.0	-	-	-
10 (reg)	oC	135	26.4	124.6	76.2	90.0	90.0	90.0	-	-	-
11 (reg)	mC	157	124.6	26.4	92.5	90.0	124.1	90.0	-	-	-
12 (reg)	mC	187	26.4	154.7	60.9	90.0	90.1	90.0	-	-	-
13 (reg)	mC	188	26.4	124.6	76.2	90.0	90.2	90.0	-	-	-
14 (reg)	mC	240	102.4	92.5	26.4	90.0	90.2	90.0	-	-	-
15 (reg)	mC	241	92.5	102.4	26.4	90.0	90.1	90.0	-	-	-
16 (reg)	oC	241	92.5	102.4	26.4	90.0	90.0	90.0	-	-	-
17 (reg)	tP	296	68.6	68.6	26.4	90.0	90.0	90.0	-	-	-
18 (reg)	aP	297	26.4	124.6	154.7	90.0	90.0	90.0	-	-	-

Show lattices summary[+] Search beam-centre [-]
Spacegroup: P2

Figura 6.23: Celdas propuestas según el programa *iMosflm* junto a su valor de penalización.

Se ha de seleccionar el grupo espacial con mayor simetría y con muy poca penalización. En este caso se escogió el grupo espacial P2, con un valor de penalización de 1. Además del *iMosflm*, se utilizaron otros programas, como el *XDS*, para realizar el indexado. Este programa escogió como mejor opción parámetros de celda muy similares al escogido por *iMosflm*. En la Figura 6.24 aparecen las predicciones que hace el programa, que idealmente deberían coincidir con las reflexiones obtenidas experimentalmente.

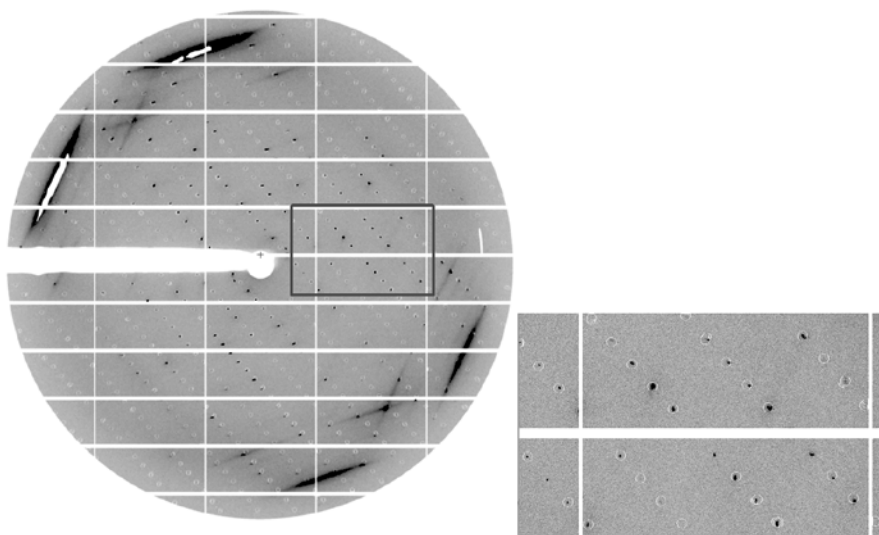


Figura 6.24: Comparación entre las reflexiones reales y las que darían para la celda seleccionada.

Para comprobar que el programa ha tomado correctamente las reflexiones de los diagramas de difracción, se ha utilizado el programa *hklview* del paquete CCP4, donde se puede observar que la representación gráfica de los datos de las reflexiones que ha tomado es similar a los diagramas de difracción del cristal obtenidos experimentalmente.

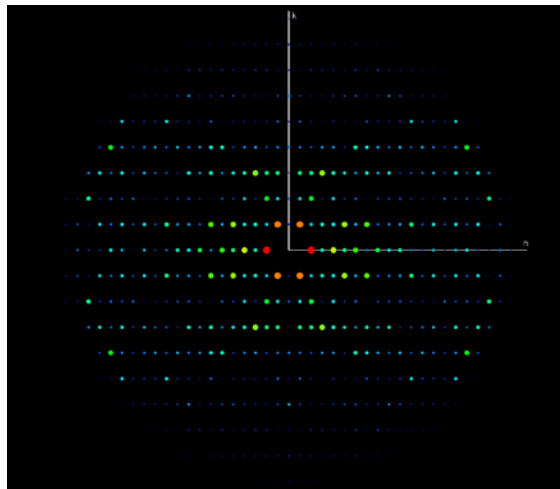


Figura 6.25: Representación gráfica del diagrama de difracción simulado con *hklview*.

Finalmente con el programa XDS se realizaron las etapas de integrado, procesado y escalado. En esta última etapa se obtuvieron datos estadísticos que dieron una idea de la validez del grupo espacial escogido. En este paso es donde se puede mejorar la calidad de los resultados variando diferentes parámetros, como fijar el límite de resolución (se recomienda aquel en el que $I/\sigma > 2$) o excluyendo diagramas de difracción que presenten mayor error respecto al resto. Finalmente, se deberían obtener valores de χ^2 próximos a 1 y $R_{\text{merge}} < 15\%$. Los resultados obtenidos tras el escalado se resumen en la Tabla 6.11.

Tabla 6.11: Datos obtenidos tras el escalado de los diagramas de difracción.

Grupo espacial	P2 ₁		
Parámetros de celda	a = 60,65	b = 26,34	c = 76,43
	$\alpha = 90,00^\circ$	$\beta = 95,97^\circ$	$\gamma = 90,00^\circ$
Rango de resolución	45,02-2,92		
Número de reflexiones observadas (únicas)	34.768 (5.658)		
Compleitud (%)	95,8		
I/σ	6,32		
R_{merge}	0,14		
χ^2	0,77		

Consideraciones previas al reemplazamiento molecular:

Para verificar la presencia de proteína en el cristal B6-1, se analizó el cristal electroforéticamente (ver apartado 5.4.5). El resultado se puede ver en el gel de poliacrilamida-SDS (Figura 6.26)

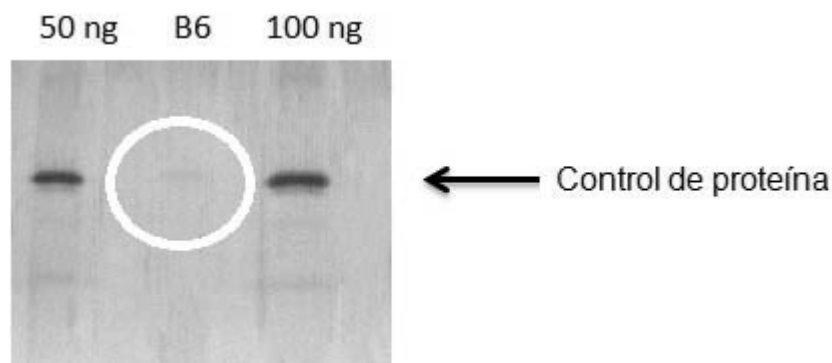


Figura 6.26: Gel poliacrilamida-SDS del cristal B6-1.

Se han cargado en el gel controles de proteína a 50 ng y 100 ng.

En el centro se ha cargado el cristal B6-1 disuelto en tampón de muestras para electroforesis. Se puede apreciar una banda muy tenue de proteína dentro del círculo blanco.

Como puede verse en la Figura 6.26, se aprecia una banda muy tenue correspondiente a la proteína HMGB1(Δ 7-164) del cristal fundido (dentro del círculo blanco), lo que indicaría presencia de proteína en el cristal.

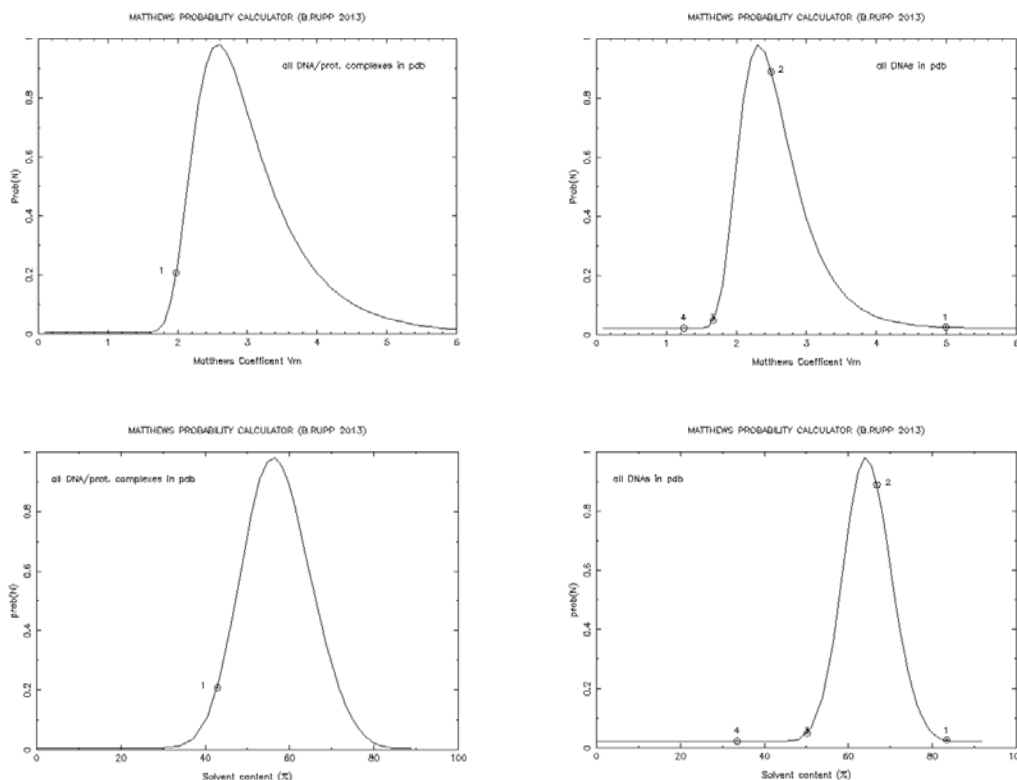
El contenido dentro de la unidad asimétrica se puede estimar con las probabilidades de *Matthews*. Para ello se utilizó un calculador automático que se basa en las teorías de probabilidad de *Matthews* (accesible en la página web: <http://www.ruppweb.org/mattprob/>). En un principio el cristal presentó contenido en proteína (Figura 6.26), por lo tanto se consideró que el cristal contenía tanto proteína como oligonucleótido. No obstante, también se calculó el contenido suponiendo que sólo hubiera ADN, en caso de que la proteína estuviera desordenada y no pudiera observarse.

- Masa molecular oligonucleótido $C_2A_2TA_2TCGCGAT_2AT_2G_2$: 12.232,12 Da.
- Masa molecular HMGB1(Δ 7-164): 18.484 Da.

En la figura 6.27 se muestran las gráficas que representan las probabilidades de *Matthews* junto a sus valores de coeficientes de *Matthews* (fila superior) o contenido en solvente (fila inferior) para diferentes cantidades de moléculas consideradas (las diferentes soluciones se representan en círculos dibujados sobre la gráfica, junto al número de moléculas).

Complejo

Duplex



Contenido unidad asimétrica con mayor probabilidad	Vm (Å ³ /Da)
1 complejo	1,98
2 dúplex	2,48

Figura 6.27: Probabilidades de *Matthews* para el coeficiente de *Matthews* (Vm) y para el contenido en solvente.

Para estimar el número de complejos se ha supuesto que el complejo se ha formado en una relación molar 1:1 (una molécula de proteína por un dúplex). En las gráficas se pueden observar el número de complejos o de dúplex más probable (máximo del pico) en la unidad asimétrica en relación al valor del coeficiente de *Matthews* (fila superior) y del contenido en solvente (fila inferior). En la tabla se detallan los valores del coeficiente de *Matthews* para el contenido estimado en la unidad asimétrica.

La probabilidad de encontrar 1 complejo (relación molar 1:1) es muy pequeña (ligeramente superior al 20%) mientras que la probabilidad de encontrar 2 dúplex es muy elevada (sobre un 90%). Por este motivo, como primera aproximación el reemplazamiento molecular se llevó a cabo considerando que la unidad asimétrica contenía 2 dúplex de ADN.

Reemplazamiento molecular:

El reemplazamiento molecular consiste en orientar un modelo establecido con nuestros datos experimentales mediante funciones de rotación y traslación. Para realizar el reemplazamiento molecular se necesitó:

- Modelo teórico: Se obtuvo un modelo teórico Watson-Crick del oligonucleótido $C_2A_2TA_2TCGCGAT_2AT_2G_2$ en forma B con el programa Turbo-Frodo.
- Datos del proceso: Con el programa XDS se obtuvo directamente el fichero con los hkl y los factores de estructura.
- Información del grupo espacial: parámetros de celda, simetría, número de moléculas en la celda, etc.

Se ha realizado el reemplazamiento molecular con el programa MolRep, que sitúa correctamente la orientación de los dúplex en el espacio de la unidad asimétrica. Al aplicar simetría se debe observar que estos dúplex deben organizarse de manera lógica, con una separación aceptable y no se deben superponer entre ellos.

La salida mostró dos dúplex como unidad asimétrica (como el grupo espacial es $P2_1$, habrá 4 dúplex en la celda unitaria) y éstos se encontraban cruzados, tal y como se observó en el diagrama de difracción (Figura 6.22.B). Además, al aplicar simetría se observó que no existían solapamientos entre ellos y la separación entre ellos era correcta. Se han visualizado estas soluciones con el programa Coot 4.1 y Jmol.

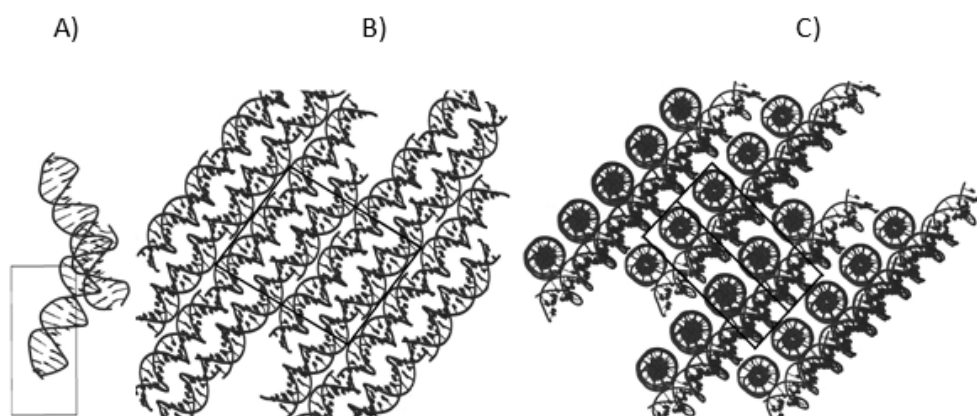


Figura 6.28: Modelo de la estructura correspondiente al cristal B6-1 que contiene el oligonucleótido $C_2A_2TA_2TCGCGAT_2AT_2G_2$.

A) Vista de una celda unitaria que contiene dos dúplex en la unidad asimétrica. B) y C) Empaquetamiento de las moléculas según vista frontal y en una proyección sobre una diagonal de la celda. Imágenes obtenidas con el programa Jmol.



Figura 6.29: Separación entre los dúplex al aplicar simetría.

Como se puede observar, la separación entre los dúplex es aceptable y no existe solapamiento. Imagen obtenida utilizando el programa Coot 4.1.

Refinado:

En esta etapa se ajustan las posiciones de los átomos con pequeños movimientos de las moléculas para que el modelo encaje con el mapa de densidad. Además en este paso se pueden añadir moléculas como iones, agua, etc.

El refinado se lleva a cabo mediante ciclos consecutivos y se modifican variables como la resolución, el número de ciclos, etc. Para saber si en estos ciclos se está mejorando el ajuste del modelo, se tienen en cuenta parámetros estadísticos característicos de esta fase: R_{factor} y R_{free} (correspondiente al 5% de reflexiones marcadas que no se refinan). Ambos valores deben tener valores bajos (deberían estar por debajo de 0,3) y el FOM (figura de mérito) debería ser superior a 0,5.

Mientras se van realizando diferentes refinados, se han ido visualizando la estructura y los mapas (de densidad y de diferencias) a través del programa Coot 4.1. El mapa de densidad (azul) nos indica cómo es la estructura que se está calculando comparada con la observada. Por lo tanto, si el modelo se ajusta a lo observado, los mapas se superponen y son continuos dentro de la molécula. El mapa de diferencias (verde y rojo) permite ver las diferencias entre la estructura calculada y la observada. El rojo (negativo) indica que sobra algo y el verde (positivo) que falta, de modo que este mapa debe ser lo más reducido posible. Para validar la estructura habría que comprobar que el mapa de densidad se ajusta suficientemente al modelo y que no haya zonas de valor diferente a 0 en el mapa de diferencias.

Para realizar el refinado se ha utilizado el programa *Refmac5*. Se realizó un *restrained refinement*, que restringe las distancias entre los puentes de hidrógeno de los pares de bases de las moléculas de ADN. Se llevó a cabo un refinamiento de 100 ciclos para una resolución de 3,2 Å. En la Figura 6.30 se puede ver cómo fueron bajando los valores de los parámetros R_{fac} y R_{free} con respecto al número de ciclos.

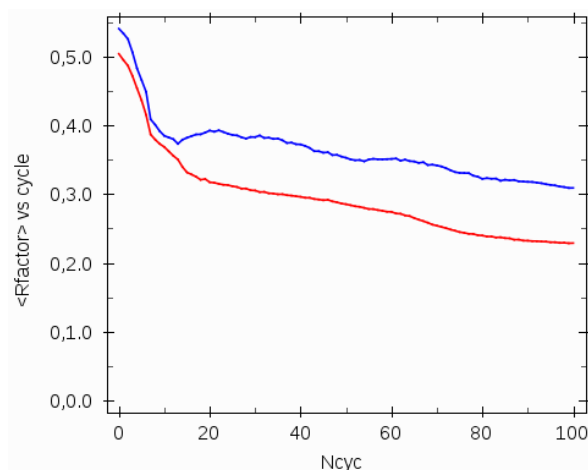


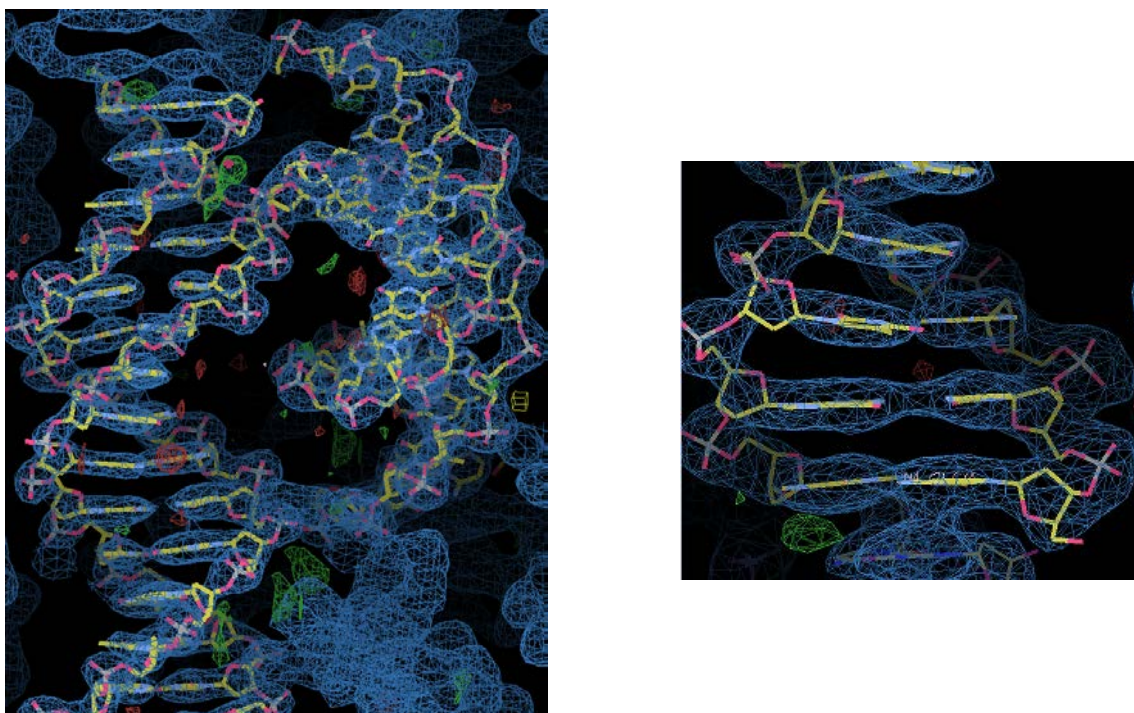
Figura 6.30: Número de ciclos vs R_{factor} (rojo) y R_{free} (azul). Se observa la evolución de estos parámetros durante 100 ciclos, utilizando el método de *restrained refinement* a una resolución de 3,2 Å. El parámetro R_{factor} descendió desde 0,50 hasta 0,22 y R_{free} desde 0,54 hasta 0,30.

A continuación se continuó refinando aplicando el método TLS (*Translation, Libration and Screw-rotation*) más *restrained refinement*. En la Tabla 6.12 se recogen los parámetros estadísticos obtenidos para el modelo final de la estructura.

Tabla 6.12: Datos del refinamiento del cristal B6-1

Cristal B6-1	
R_{fac}	0.211
R_{free}	0.263
FOM	0.727

Estos valores son bastante buenos ya que R_{fac} y R_{free} son menores de 0,3 y FOM es superior a 0,5. En la Figura 6.31 se puede observar cómo el mapa de densidad se ajusta muy bien al dúplex, perfilando los pares de bases y el esqueleto de la doble hélice. En la Figura 6.32 se muestra el empaquetamiento del cristal B6-1 para el grupo espacial $P2_1$.



**Figura 6.31: Modelo junto con el mapa de densidad para ambos dúplex cruzados (izquierda).
Detalle de los pares de bases (derecha).**

El modelo se ajusta bastante bien al mapa de densidad. Imagen realizada con el programa Coot 4.1.

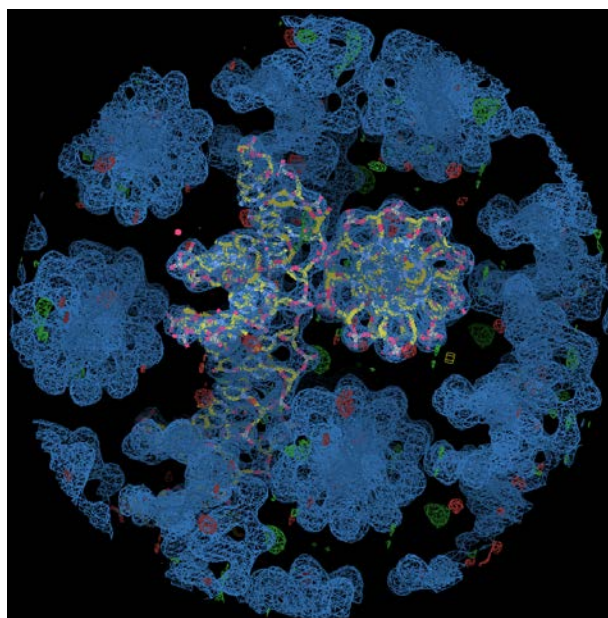


Figura 6.32: Empaquetamiento del cristal B6-1 para el grupo espacial $P2_1$.

Se observan claramente los mapas de densidad de los dúplex en dos direcciones. Sin embargo, no se observa mapa de diferencias de un gran volumen como para que pudiera representar la proteína.

Imagen realizada con el programa Coot 4.1.

Sin embargo, siguen existiendo zonas de valor diferente a 0 en el mapa de diferencias (zonas verdes y rojas). En este caso estas zonas son pequeñas, de modo que podrían corregirse ajustando la posición de átomos, añadiendo agua, iones, etc. Se probó añadiendo algunas moléculas de agua y del ión magnesio (se utilizó la sal $MgCl_2$ en la gota), pero no se consiguieron reducir más los valores de R_{fac} y R_{free} . Esto puede deberse a la baja resolución que se obtuvo (3 Å). Así, cuanto más resolución se alcanzase, de más información se dispondría y por lo tanto se podrían colocar mejor las moléculas, ajustándose mejor el modelo a la realidad.

Como no hay zonas con gran volumen de densidad electrónica en el mapa de diferencias, no fue posible identificar la proteína HMGB1(Δ 7-164) debido a que, aunque sí había proteína en el cristal, aunque muy poca (Figura 6.26), ésta se encuentra desordenada. La posición de la proteína podría explicar la estabilidad de las grandes moléculas de ADN y el cruce entre ellas.

Conclusiones

Se ha expresado satisfactoriamente la proteína HMGB1(Δ 7-164) utilizando la técnica del ADN recombinante en un cultivo de la bacteria *Escherichia coli*, en la que previamente se había introducido el gen que codifica la proteína deseada. Ésta no se expresó sola, sino fusionada con la proteína GST, con el fin de facilitar su purificación.

Con respecto a la purificación de la muestra, cabe destacar la primera técnica cromatográfica utilizada (columna de afinidad GST) que permitió eliminar la mayoría de proteínas contaminantes de origen bacteriano. Durante la cromatografía de intercambio catiónico, la proteína HMGB1(Δ 7-164) eluyó aproximadamente a una concentración de 400 mM NaCl. Finalmente gracias a la cromatografía de exclusión molecular se consiguieron eliminar las proteínas de menor tamaño que quedaban presentes en la muestra. Esta secuencia de técnicas cromatográficas permitió obtener fracciones de elevada pureza para llevar a cabo ensayos cristalográficos.

Para los ensayos cristalográficos se utilizaron 3 oligonucleótidos de larga secuencia (\geq 20 pares de bases) para facilitar la formación del complejo, ya que la proteína HMGB1(Δ 7-164) contiene los dos dominios de unión HMG-box (box A y B). Para todos ellos se han hecho estudios de interacción con la proteína HMGB1(Δ 7-164) utilizando geles EMSA, con los cuales se ha confirmado la formación de complejo.

En los ensayos con el oligonucleótido GA₂T₂A₂CGTACGT₂A₂T₂CG (21 pb) sólo se obtuvo precipitado amorfo o cristalino en exceso tanto para las relaciones proteína:oligonucleótido 1:1 como 2:1. Convendría probar más condiciones e ir aumentando la concentración en el pozo de forma más moderada.

En cambio, para los ensayos con los oligonucleótidos CGCGT₅CGCGA₅CGCG₂ (23 pb) y C₂A₂TA₂TCGCGAT₂AT₂G₂ (20 pb) sí se obtuvieron cristales que pudieron ser pescados. Aun así, sus formas fueron bastante irregulares y no eran altamente birrefringentes. Habría que optimizar las condiciones para obtener cristales más ordenados.

Los cristales pescados se difractaron en la plataforma XALOC del sincrotrón ALBA de Cerdanyola del Vallès (Barcelona). Sólo uno de ellos (B6-1), junto a sus réplicas B11 y B12, dieron unos diagramas de difracción de una calidad suficiente como para poder ser tratados. Las condiciones de cristalización fueron: 25 mM Tris pH = 7,5; 12,5 mM MgCl₂, 5% MPD, 1 mM DTT y el cristal apareció en torno al 40 % de MPD en el pozo.

Con la información de los diagramas de difracción obtenidos (a una resolución de 3 Å) fue posible determinar los parámetros de celda y el grupo espacial. Así, el cristal obtenido corresponde al grupo espacial $P2_1$ ($a = 60,65$; $b = 26,34$; $c = 76,43$; $\alpha = 90^\circ$; $\beta = 95,97^\circ$; $\gamma = 90^\circ$) donde dos dúplex conforman una unidad asimétrica. Estos dúplex se encuentran cruzados.

Además, se consiguió resolver la estructura del ADN. Para ello se utilizó un modelo teórico de la forma B del ADN y se empleó la técnica de reemplazamiento molecular junto a un posterior refinado. Sin embargo no pudo localizarse la proteína, probablemente por encontrarse desordenada en el cristal. La posición de la proteína podría explicar el cruce entre los dúplex.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría aprovechar este apartado para mostrar mi más profundo agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna manera forman parte de este trabajo.

En primer lugar me gustaría darles las gracias a mis directoras de proyecto. A la Dra. Núria Saperas por la confianza depositada en mí, dándome la oportunidad de incorporarme en el grupo de trabajo MACROM del Departamento de Ingeniería Química. También le agradezco todo el tiempo dedicado en este proyecto, además de sus consejos y el gusto por el trabajo bien hecho. A la Dra. Lourdes Campos por introducirme en el mundo de la cristalografía, sus explicaciones sobre este campo tan nuevo para mí, así como todas las horas dedicadas a la obtención de gotas y el procesado de los diagramas de difracción. Ha sido una experiencia muy enriquecedora.

A todos mis compañeros del grupo. Especialmente a Cinthia, por todas las horas pasadas en el laboratorio y todo lo que me ha enseñado. A Raquel por sus visitas esporádicas pero muy provechosas gracias a sus consejos. A Paco por su paciencia y su inestimable ayuda en el análisis de datos.

A mis amigos de siempre, por darme ánimos y hacerme reír. Gracias por estar ahí a pesar de la distancia de estos últimos años.

Quiero agradecer especialmente este trabajo a Edgar, por su amor sincero y por ayudarme sobre todo en los momentos difíciles y hacer que todo sea más fácil.

Finalmente quiero agradecerélos a mis padres por su amor, su apoyo incondicional y por ser un ejemplo a seguir. Gracias a ellos soy lo que soy.

A todos, gracias.

BIBLIOGRAFÍA

Referencias bibliográficas

- [1] Watson, J.D. & Crick, F.H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**, 737-738.
- [2] Türler, H., Buchowicz, J. & Chargaff, E. (1969). Studies on the nucleotide arrangement in deoxyribonucleic acids: XIII. Frequency and composition of purine isostichs in calf-thymus deoxyribonucleic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **195**, 456-465.
- [3] Watson, J.D., Baker, T.A., Bell, S.P., Gann, A., Levine, M. & Losick, R. (2008). *Molecular biology of the gene*. 6th edition. (San Francisco Cold Spring Harbor, Pearson/Benjamin Cummings; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).
- [4] Leslie, A.G., Arnott, S., Chandrasekaran, R. & Ratliff, R.L. (1980). Polymorphism of DNA double helices. *J. Mol. Biol.* **143**, 49–72.
- [5] Ghosh, A. & Bansal, M. (2003). A glossary of DNA structures from A to Z. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **59**, 620–626.
- [6] Berg, J.M., Tymoczko, J.L. & Stryer, L. (2002). *Biochemistry* 5th edition. *W. H. Freeman, New York*.
- [7] Franklin, R.E. & Gosling, R.G. (1953). Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature* **171**, 740-741.
- [8] Nikolova, E.N., Kim, E., Wise, A.A., O'Brien, P.J., Andricioaei, I. & Al-Hashimi, H.M. (2011). Transient Hoogsteen base pairs in canonical duplex DNA. *Nature* **470**, 498–502.
- [9] Murchie, A.I. & Lilley, D.M. (1992). Supercoiled DNA and cruciform structures. *Methods Enzymol.* **211**, 158-180.
- [10] Wolfsberg, T.G., McEntyre, J. & Schuler, G.D. (2001). Guide to the draft human genome. *Nature* **409**, 824-826.

- [11] The ENCODE Project Consortium. (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* **447**, 799–816.
- [12] Viswamitra, M.A., Shakked, Z., Jones, P.G., Sheldrick, G.M., Salisbury, S.A. & Kennard, O. (1982). Structure of the deoxytetranucleotide d-pApTpApT and a sequence-dependent model for poly(dA-dT). *Biopolymers* **21**, 513-533.
- [13] Abrescia, N.G.A., González, C., Gouyette, C. & Subirana, J.A. (2004). X-ray and NMR Studies of the DNA Oligomer d(ATATAT): Hoogsteen Base Pairing in duplex DNA. *Biochemistry* **43**, 4092-4100.
- [14] Zuo, E.T., Tanious, F.A., Wilson, W.D., Zon, G., Tan, G.S. & Wartell, R.M. (1990). Effect of base-pair sequence on the conformations and thermally induced transitions in oligodeoxyribonucleotides containing only AT base pairs. *Biochemistry* **29**, 4446-4456.
- [15] Moreno, T., Pous, J., Subirana, J.A. & Campos, J.L. (2010). Coiled-coil conformation of a pentamidine-DNA complex. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **66**, 251-257.
- [16] Fonfría-Subirós, E., Acosta-Reyes, F., Saperas, N., Pous, J., Subirana, J.A. & Campos, J.L. (2012). Crystal Structure of a Complex of DNA with One AT-hook of HMGA1. *PLOS ONE* **7**.
- [17] Acosta-Reyes, F.J., Dardonville, C., de Koning, H.P., Natto, M., Juan A. Subirana, J.A. & Campos, J.L. (2014). In and out of the minor groove: interaction of an AT-rich DNA with the drug CD27. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **70**, 1614-1621.
- [18] Sánchez, R., Acosta-Reyes, F.J., Malarkey, C.S., Saperas, N., Churchill, M.E.A. & Campos, J.L. (2015). Two high-mobility group box domains act together to underwind and kink DNA. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **71**, 1423-1432.
- [19] Annunziato, A. (2008). DNA Packaging: Nucleosomes and Chromatin. *Nature Education* **1**, 26.

- [20] Goodwin, G.H., Sanders, C. & Johns, E.W. (1973). A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur. J. Biochem.* **38**, 14–19.
- [21] Bustin, M. & Reeves, R. (1996). High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **54**, 35-100.
- [22] Bustin, M. (2001). Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. *Trends. Biochem. Sci.* **26**, 152-153.
- [23] Catez, F. & Hock, R. (2010). Binding and interplay of HMG proteins on chromatin: lessons from live cell imaging. *Biochim. Biophys. Acta* **1799**, 15-27.
- [24] Bustin, M. (1999). Regulation of DNA-Dependent Activities by the Functional Motifs of the High-Mobility-Group Chromosomal Proteins. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5237-5246.
- [25] Hardman, C.H., Broadhurst, R.W., Raine, A.R., Grasser, K.D., Thomas, J.O. & Laue, E.D. (1995). Structure of the A-domain of HMG1 and its interaction with DNA as studied by heteronuclear three- and four-dimensional NMR spectroscopy. *Biochemistry* **34**, 16596-16607.
- [26] Weir, H.M., Kraulis, P.J., Hill, C.S., Raine, A.R., Laue, E.D. & Thomas, J.O. (1993). Structure of the HMG box motif in the B-domain of HMG1. *EMBO J.* **12**, 1311-1319.
- [27] Murphy, F.V. 4th., Sehy, J.V., Dow, L.K., Gao, Y.G. & Churchill, M.E. (1999). Co-crystallization and preliminary crystallographic analysis of the high mobility group domain of HMG-D bound to DNA. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **55**, 1594–1597.
- [28] Read, C.M., Cary, P.D., Crane-Robinson, C., Driscoll, P.C. & Norman, D.G. (1993). Solution structure of a DNA-binding domain from HMG1. *Nucleic Acids Res.* **21**, 3427–3436.
- [29] Zhang, Q. & Wang, Y. (2010). HMG modifications and nuclear function. *Biochim. Biophys. Acta* **1799**, 28–36.

- [30] Stros, M. (2010). HMGB proteins: Interactions with DNA and chromatin. *Biochim. Biophys. Acta* **1799**, 101–113.
- [31] Kuniyasu, H., Chihara, Y. & Kondo, H. (2003). Differential effects between amphotericin and advanced glycation end products on colon cancer cells. *Int. J. Cancer* **104**, 722–727.
- [32] Giavara, S., Kosmidou, E., Hande, M.P., Bianchi, M.E., Morgan, A., d'Adda di Fagagna, F. & Jackson, S.P. (2005). Yeast Nhp6A/B and mammalian Hmgb1 facilitate the maintenance of genome stability. *Curr. Biol.* **15**, 68–72.
- [33] Sims, G.P., Rowe, D.C., Rietdijk, S.T., Herbst, R. & Coyle, A.J. (2010). HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 367-388.
- [34] McCauley, M. J., Zimmerman, J., Maher, L.J. III & Williams, M.C. (2007). HMGB binding to DNA: single and double box motifs. *J. Mol. Biol.* **374**, 993–1004.
- [35] Sánchez, R. (2009). *Expressió, purificació i cristal·lització de la proteïna HMGA1a (PFC)*. Barcelona: ETSEIB.
- [36] Roemer, S.C., Adelman, J., Churchill, M.E. & Edwards, D.P. (2008). Mechanism of high-mobility group protein B enhancement of progesterone receptor sequence-specific DNA binding. *Nucleic Acids Res.* **36**, 3655-3666.
- [37] Millán, C.R. (2013). *Estudio estructural de la unión de ADN rico en adeninas y timinas con la proteïna HMGA1a y con fármacos específicos de unión al surco estrecho del ADN (TFM)*. Barcelona: ETSEIB.
- [38] Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- [39] Chayen, N. (2005). Methods for separating nucleation and growth in protein crystallization. *Prog. Biophys. Molecular Biol.* **88**, 329–337.
- [40] Fowles, W. W., DeLucas, L. J., Twigg, P. J., Howard, S. B., Meehan Jr., E. J. & Baird, J. K. (1988). Experimental and theoretical analysis of the rate of solvent equilibration in the hanging drop method of protein crystal growth. *Journal of Crystal Growth* **90**, 117–129.

- [41] Rabilloud, T., Vuillard, L., Gilly, C. & Lawrence, J.J. (1994). Silver-staining of proteins in polyacrylamide gels: a general overview. *Cell. Mol. Biol.* **40**, 57-75.
- [42] Baquero, D. (2014). *Assajos cristal·logràfics de complexos d'oligonucleòtids rics en AT amb fàrmacs, pèptids i HMGA1a(50-91)* (PFC). Barcelona: ETSEIB.
- [43] International Union of Crystallography. (1969). *International Tables for X-Ray Crystallography*. Volume 1, 3rd Edition (Kynoch Press, Birmingham, England).
- [44] Kantardjieff, K.A. & Rupp, B. (2003). Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA and protein-nucleic acid complex crystals. *Protein Sci.* **12**, 1865-1871.

Bibliografía complementaria

Libros:

- Bates, A.D. & Maxwell, A. (1993). *DNA topology*. (IRL Press at Oxford University Press, Oxford).
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. & Stryer, L. (2002). *Biochemistry*. 5th edition. (W. H. Freeman, New York).
- GE Healthcare Handbooks. (2000). *Gel Filtration. Principles and Methods*. (General Electric Company).
- GE Healthcare Handbooks. (2002). *GST Gene Fusion System. Handbook*. (General Electric Company).
- Gómez-Moreno, C. & Sancho Sanz, J. (2003). *Estructura de proteínas*. (Ed. Ariel, Barcelona).
- Sands, D.E. (1971). *Introducción a la cristalografía*. (Ed. Reverté, Barcelona).
- Watson, J.D., Baker, T.A., Bell, S.P., Gann, A., Levine, M. & Losick, R. (2008). *Molecular biology of the gene*. 6th edition. (Pearson/Benjamin Cummings; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).

Páginas web:

- ALBA SYNCHROTRON [<http://www.cells.es>, marzo 2015]
- CCP4 WIKI [<http://ccp4wiki.org/>, mayo 2015]
- CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC): Cristalografía de Rayos X. [<http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/index.html>, marzo 2015]
- HAMPTON RESEARCH [<http://www.hamptonresearch.com/>, marzo 2015]
- RCSB PROTEIN DATA BANK -RCSB PDB [<http://www.rcsb.org/>, mayo 2015]
- UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA. Consideraciones ambientales para los PFC. [http://www.etseib.upc.edu/docs/-_Informaci_Acadmica/_Portal_de_docencia/Projectes_i_Treballs/Guies/Consideracions_ambientals.pdf, junio 2015]

Proyectos y tesis consultados (por autor)

- Baquero, D. (2014). *Assajos cristal·logràfics de complexos d'oligonucleòtids rics en AT amb fàrmacs, pèptids i HMGA1a(50-91) (PFC)*. Barcelona: ETSEIB.
- Maturana, M. (2012) *Estudios cristal·logràfics de complejos de péptidos y la droga diamino-fenilindol (DAPI) con oligonucleótidos rics en adeninas y timinas (PFC)*. Barcelona: ETSEIB.
- Millán, C.R. (2013). *Estudio estructural de la unión de ADN rico en adeninas y timinas con la proteína HMGA1a y con fármacos específicos de unión al surco estrecho del ADN (TFM)*. Barcelona: ETSEIB.
- Navallas, M.C. (2012). *Expressió, purificació i assajos cristal·logràfics de la proteïna HMGA1b(1-90) (PFC)*. Barcelona: ETSEIB.
- Sánchez, R. (2014). *Estudis estructurals de complexos de les proteïnes HMG amb DNA (TD)*. Barcelona: ETSEIB.
- Sánchez, R. (2009). *Expressió, purificació i cristal·lització de la proteïna HMGA1a (PFC)*. Barcelona: ETSEIB.

ANEXO A: MATERIALES Y MÉTODOS

A.1. Inducción con IPTG

El plásmido pGEX-2T se inserta en la célula huésped y está diseñado para la producción rápida de una proteína determinada. Este plásmido, además de contener un gen que codifica la proteína de interés, contiene un gen *lacI^q* que codifica la proteína represora *lac*, la cual se une a la región operador del promotor *tac*, bloqueando la transcripción (Figura A.1.a). El isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG) es un análogo sintético de la lactosa y se utiliza como inductor artificial del operón *lac*, ya que es capaz de unirse a la proteína represora *lac*, formando un complejo inductor-represor. Es entonces cuando la RNA polimerasa de la célula huésped transcribe el gen que codifica la proteína de interés (Figura A.1.b).

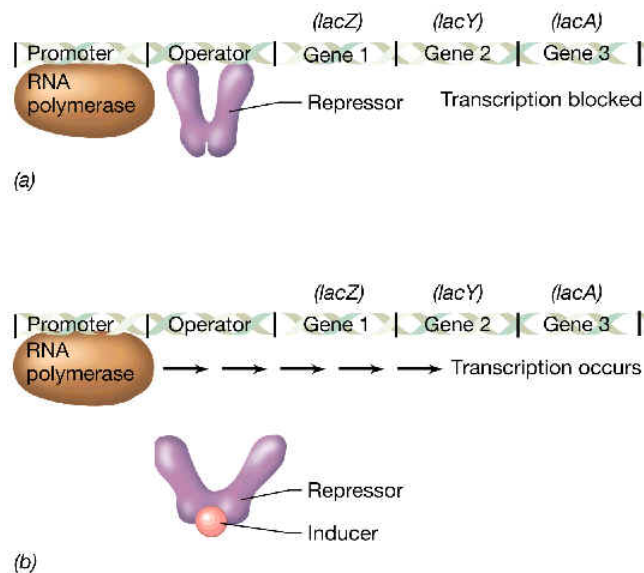


Figura A.1: Inducción de la proteína con IPTG.

a) La transcripción está inhibida por la presencia del represor. b) El inductor IPTG se une al represor, permitiendo que la RNA polimerasa inicie la transcripción.

<http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/15regulacion.htm> [Feb-2015]

A.2. Obtención de células competentes Rosetta(DE3)pLysS

A continuación se explica el protocolo seguido en este proyecto para conseguir hacer competentes a las células Rosetta(DE3)pLysS. Dado que esta cepa de *E.coli* es resistente a cloranfenicol (Cam), este antibiótico se incorpora a todos los medios de cultivo.

Importante: Durante todo el protocolo se debe trabajar en condiciones de asepsia (tanto el material como las soluciones han de estar autoclavadas y siempre cerca de la llama).

Día 1:

1. Se prepara una placa de medio LB + 34 µg/µL Cam.
2. Se coge el cooler y se saca una alícuota de células del congelador a -80°C. Mediante un asa de Kolle (de platino) se rasca un poco y se hace una siembra en escocés en la placa de LB + 34 µg/µL Cam.

Observación: La siembra en escocés consiste en ir arrastrando un número cada vez más pequeño de células para obtener células distribuidas individualmente sobre la superficie de la placa.

3. Se coloca la placa en la estufa a 37°C y se deja O.N.

Día 2:

1. Picar una sola colonia de la placa O.N. en un tubo que contenga 4 mL de LB + 34 µg/µL Cam.
2. Dejar crecer las bacterias O.N. a 37°C con agitación 250 rpm.

Día 3:

6. Inocular 0,8 mL del cultivo O.N. en 50 mL del mismo medio (en un erlenmeyer de 250 mL) y dejar crecer hasta obtener una DO_{600} de 0,7.

Observación: A medida que las células crecen, el medio se va enturbiando. De vez en cuando se pipetea un pequeño volumen del medio (1 mL) en condiciones asépticas, para medir la absorbancia, hasta que el valor de DO_{600} sea de 0,7. Como referencia, se considera que en los primeros 30 minutos las células no crecen, y a partir de ahí, cada 30 minutos las células se van duplicando.

7. Congelar un tubo de bacterias: 900 µL + 300 µL de Glicerol al 60% (autoclavado).

Observación: El Glicerol es un anticongelante. Evita que se formen cristales de hielo al congelar las muestras a -80°C. Esta muestra se conserva como estoc a -80°C.

8. Centrifugar el cultivo a 4.000 g durante 5 min a 4°C (rotor GSA a 5.000 rpm, Sorvall).
9. Descartar el sobrenadante.

10. Resuspender el pellet en 10 mL de 100 mM $MgCl_2$ (4°C).
11. Pasarlo a un tubo de 50 mL con tapón.
12. Dejar en hielo durante 30 min.
13. Centrifugar a 4.000 g durante 5 min a 4°C (rotor SS34 entre 5.500 y 6.000 rpm, Sorvall).
14. Descartar el sobrenadante.
15. Resuspender el pellet en 2 mL de 100 mM $CaCl_2$ (4°C).
16. Dejar en hielo durante 60 min.
17. Centrifugar 4.000 g durante 5 min a 4°C (rotor SS34 entre 5.500 y 6.000 rpm, Sorvall).
18. Descartar el sobrenadante.
19. Resuspender el pellet en 4 mL de 85 mM $CaCl_2$ -15% Glicerol.
Observación: Preparar al momento 3 mL de 100 mM $CaCl_2$ + 1 mL Glicerol al 60%.
20. Hacer alícuotas de 300 μ L y 200 μ L. Congelar a -80°C rápidamente.

A.3. Medio de cultivo

Tabla A.1: Composición de los medios de cultivo utilizados. pH final = 7

Medio LB (1 litro de cultivo)	Medio LB+agar (375 mL cultivo) (25 placas)
10 g triptona	3,75 g triptona
5 g extracto de levadura	1,87 g extracto de levadura
10 g NaCl	3,75 g NaCl
	5,62 g agar (1,5% de LB).

A.4. Soluciones Natrix HR2-116 y soluciones adaptadas

A continuación se muestra la composición de las soluciones Natrix HR2-116 de la marca comercial Hampton Research utilizadas para la realización de los ensayos cristalográficos, así como la de las soluciones adaptadas

Soluciones Natrix HR2-116 (Hampton Research):

Tabla A.2: Composición de las soluciones Natrix HR2-116 (Hampton Research)

Soluciones Natrix HR2-116	
Nº	Composición
1	0.01 M Mg Chloride, 0.05 M MES, pH=5.6, 2 M Lithium Sulfate
2	0.01 M Mg Acetate, 0.05 M MES, pH=5.6, 2.5 M Ammonium Sulfate
3	0.1 M Mg Acetate, 0.05 M MES, pH=5.6, 20% MPD
4	0.2 M K Chloride, 0.01 M Mg Sulfate, 0.05 M MES, pH=5.6, 10% PEG 400
5	0.2 M K Chloride, 0.01 M Mg Chloride, 0.05 M MES, pH=5.6, 5% PEG 8000
6	0.1 M Ammonium Sulfate, 0.01 M Mg Chloride, 0.05 M MES, pH=5.6, 20% PEG 8000
7	0.02 M Mg Chloride, 0.05 M MES, pH=6, 15% iso-Propanol
8	0.005 M Mg Sulfate, 0.1 M Ammonium Acetate, 0.05 M MES, pH=6.0, 0.6 M NaCl
9	0.1 M K Chloride, 0.01 M Mg Chloride, 0.05 M MES, pH=6.0, 10% PEG 400
10	0.005 M Mg Sulfate, 0.05 M MES, pH=6.0, 5% PEG 4000
11	0.01 M Mg Chloride, 0.05 M Na Cacodylate, pH=6.0, 1 M Lithium Sulfate
12	0.01 M Mg Sulfate, 0.05 M Na Cacodylate, pH=6.0, 1.8 M Lithium Sulfate
13	0.015 M Mg Acetate, 0.05 M Na Cacodylate, pH=6.0, 1.7 M Ammonium Sulfate
14	0.1 M K Chloride, 0.025 M Mg Chloride, 0.05 M Na Cacodylate, pH=6.0, 15% iso-Propanol
15	0.04 M Mg Chloride, 0.05 M Na Cacodylate, pH=6.0, 5% MPD
16	0.04 M Mg Acetate, 0.05 M Na Cacodylate, pH=6.0, 30% MPD
17	0.2 M K Chloride, 0.01 M Ca Chloride, 0.05 M Na Cacodylate, pH=6.0, 10% PEG 4000
18	0.01 M Mg Acetate, 0.05 M Na Cacodylate, pH=6.5, 1.3 M Lithium Sulfate
19	0.01 M Mg Sulfate, 0.05 M Na Cacodylate, pH=6.5, 2 M Ammonium Sulfate
20	0.1 M Ammonium Acetate, 0.015 M Mg Acetate, 0.05 M Na Cacodylate, pH=6.5, 10% iso-Propanol
21	0.2 M K Chloride, 0.005 M Mg Chloride, 0.05 M Na Cacodylate, pH=6.5, 10% 1.6 Hexanediol
22	0.08 M Mg Acetate, 0.05 M Na Cacodylate, pH=6.5, 15% PEG 400
23	0.2 M K Chloride, 0.01 M Mg Chloride, 0.05 M Na Cacodylate, pH=6.5, 10% PEG 4000
24	0.2 M Ammonium Acetate, 0.01 M Ca Chloride, 0.05 M Na Cacodylate, pH=6.5, 10% PEG 4000
25	0.08 M Mg Acetate, 0.05 M Na Cacodylate, pH=6.5, 30% PEG 4000
26	0.2 M K Chloride, 0.1 M Mg Acetate, 0.05 M Na Cacodylate, pH=6.5, 10% PEG 8000
27	0.2 Ammonium Acetate, 0.01 M Mg Acetate, 0.05 M Na Cacodylate, pH=6.5, 30% PEG 8000
28	0.05 Mg Sulfate, 0.05 M HEPES-Na, pH=7.0, 1.6 M Lithium Sulfate
29	0.01 Mg Chloride, 0.05 M HEPES-Na, pH=7.0, 4 M Lithium Chloride
30	0.01 M Mg Chloride, 0.05 M HEPES-Na, pH=7.0, 1.6 Ammonium Sulfate
31	0.005 M Mg Chloride, 0.05 M HEPES-Na, pH=7.0, 25% PEG Monomethyl Ether 550
32	0.2 M K Chloride, 0.01 M Mg Chloride, 0.05 M HEPES-Na, pH=7.0, 20% 1.6 Hexanediol
33	0.2 M Ammonium Chloride, 0.01 M Mg Chloride, 0.05 M HEPES-Na, pH=7.0, 30% 1.6 Hexanediol
34	0.1 M K Chloride, 0.005 M Mg Sulfate, 0.05 M HEPES-Na, pH=7.0, 15% MPD
35	0.1 M K Chloride, 0.01 M Mg Chloride, 0.05 M HEPES-Na, pH=7.0, 5% PEG 400
36	0.1 M K Chloride, 0.01 M Ca Chloride, 0.05 M HEPES-Na, pH=7.0, 10% PEG 400
37	0.2 M K Chloride, 0.025 M Mg Sulfate, 0.05 M HEPES-Na, pH=7.0, 20% PEG 200
38	0.2 M Ammonium Acetate, 0.15 M Mg Acetate, 0.05 M HEPES-Na, pH=7.0, 5% PEG 4000
39	0.1 M Ammonium Acetate, 0.020 M Mg Chloride, 0.05 M HEPES-Na, pH=7.0, 5% PEG 8000
40	0.01 M Mg Chloride, 0.05 M Tris-HCl, pH=7.5, 1.6 M Ammonium Sulfate
41	0.1 M K Chloride, 0.015 M Mg Chloride, 0.05 M Tris-HCl, pH=7.5, 10% PEG Monomethyl Ether 550
42	0.01 M Mg Chloride, 0.05 M Tris-HCl, pH=7.5, 5% iso-Propanol
43	0.01 M Mg Chloride, 0.05 M Ammonium Acetate, 0.05 M Tris-HCl, pH=7.5, 10% MPD
44	0.2 M K Chloride, 0.05 M Mg Chloride, 0.05 M Tris-HCl, pH=7.5, 10% PEG 4000
45	0.025 M Mg Sulfate, 0.05 M Tris-HCl, pH=8.5, 1.8 M Ammonium Sulfate
46	0.005 M Mg Sulfate, 0.05 M Tris-HCl, pH=8.5, 35% 1.6 M Hexanediol
47	0.1 M K Chloride, 0.01 M Mg Chloride, 0.05 M Tris-HCl, pH=8.5, 30% PEG 400
48	0.01 M Ca Chloride, 0.2 M Ammonium Chloride, 0.05 M Tris-HCl, pH=8.5, 30% PEG 4000

Soluciones adaptadas¹:**Tabla A.3: Composición de las soluciones adaptadas**

Soluciones adaptadas	
Nombre de la solución	Composición
C1	50 mM NaCac, 20 mM NH ₄ Ac, 2 mM DTT, 6% PEG 3350, pH=6
C2	50 mM NaCac, 20 mM NH ₄ Ac, 2 mM DTT, 10% MPD, pH=6
C3	50 mM NaCac, 20 mM MgAc, 2 mM DTT, 6% PEG 3350, pH=6
C4	50 mM NaCac, 20 mM MgAc, 2 mM DTT, 10% MPD, pH=6
C5	50 mM NaCac, 20 mM MgCl ₂ , 2 mM DTT, 6% PEG 3350, pH=6
C6	50 mM NaCac, 20 mM MgCl ₂ , 2 mM DTT, 10% MPD, pH=6
C7	50 mM NaCac, 20 mM CaCl ₂ , 2 mM DTT, 6% PEG 3350, pH=6
C8	50 mM NaCac, 20 mM CaCl ₂ , 2 mM DTT, 10% MPD, pH=6
C9	50 mM NaCac, 25 mM MgCl ₂ , 2 mM DTT, 10% MPD, pH=6
T1	50 mM Tris, 20 mM NH ₄ Ac, 2 mM DTT, 6% PEG 3350, pH=7,5
T2	50 mM Tris, 20 mM NH ₄ Ac, 2 mM DTT, 10% MPD, pH=7,5
T3	50 mM Tris, 20 mM MgAc, 2 mM DTT, 6% PEG 3350, pH=7,5
T4	50 mM Tris, 20 mM MgAc, 2 mM DTT, 10% MPD, pH=7,5
T5	50 mM Tris, 20 mM MgCl ₂ , 2 mM DTT, 6% PEG 3350, pH=7,5
T6	50 mM Tris, 20 mM NH ₄ Ac, 2 mM DTT, 10% MPD, pH=7,5
T7	50 mM Tris, 20 mM CaCl ₂ , 2 mM DTT, 6% PEG 3350, pH=7,5
T8	50 mM Tris, 20 mM CaCl ₂ , 2 mM DTT, 10% MPD, pH=7,5
T9	50 mM Tris, 20 mM NH ₄ Ac, 2 mM DTT, 6% PEG 3350, pH=7,5

Tabla A.4: Composición de las soluciones adaptadas

Soluciones adaptadas	
Nombre de la solución	Composición
Cit1	50 mM NaCit, 20 mM NH ₄ Ac, 2 mM DTT, 6% PEG 3350, pH=4,5
Cit2	50 mM NaCit, 20 mM NH ₄ Ac, 6% PEG 3350, pH=4,5
Cit3	50 mM NaCit, 20 mM NH ₄ Ac, 2 mM DTT, 10% MPD, pH=4,5
Cit4	50 mM NaCit, 20 mM NH ₄ Ac, 10% MPD, pH=4,5
Cit5	50 mM NaCit, 20 mM MgCl ₂ , 2 mM DTT, 6% PEG 3350, pH=4,5
Cit6	50 mM NaCit, 20 mM MgCl ₂ , 6% PEG 3350, pH=4,5
Cit7	50 mM NaCit, 20 mM MgCl ₂ , 2 mM DTT, 10% MPD, pH=4,5
Cit8	50 mM NaCit, 20 mM MgCl ₂ , 10% MPD, pH=4,5
Cit9	50 mM NaCit, 20 mM NH ₄ Ac, 20 mM MgCl ₂ , 2 mM DTT, 6% PEG 3350, pH=4,5
Cit10	50 mM NaCit, 20 mM NH ₄ Ac, 20 mM MgCl ₂ , 6% PEG 3350, pH=4,5
Cit11	50 mM NaCit, 20 mM NH ₄ Ac, 20 mM MgCl ₂ , 2 mM DTT, 10% MPD, pH=4,5
Cit12	50 mM NaCit, 20 mM NH ₄ Ac, 20 mM MgCl ₂ , 10% MPD, pH=4,5

¹ NaCac: Cacodilato de sodio.

NH₄Ac: Acetato de Amonio.

MgAc: Acetato de magnesio.

NaCit: Citrato de trisodio.

A.5. La unidad cristalina

En este anexo se presentan los sistemas cristalinos, las redes de Bravais y los grupos espaciales. Tal y como se explicó en el apartado 5.4.1, la celda unitaria es el bloque más pequeño que se repite por traslación ordenada en las tres direcciones del espacio y que genera todo el cristal. Se caracteriza por tres vectores a , b y c , y por los ángulos α , β y γ que forman estos vectores entre ellos. En función de estos parámetros de la celda, se pueden obtener los 7 sistemas cristalinos. Además, según la localización de los puntos reticulares se distinguen 14 redes de Bravais. Todas estas combinaciones se recogen en la Tabla A.5.

La nomenclatura P, C, F e I hacen referencia a la localización de los puntos reticulares:

P: Celda primitiva. Contiene sólo un punto reticular: un octavo en cada uno de los ocho vértices.

C: Centrada en una cara. Contiene dos puntos reticulares: un octavo en cada uno de los ocho vértices, una mitad en una cara y otra mitad en la cara opuesta.

I: Centrada en el cuerpo. Contiene dos puntos reticulares: un octavo en cada uno de los ocho vértices y uno en el centro de la celda.

F: Centrada en las caras. Contiene cuatro puntos reticulares: un octavo en cada uno de los ocho vértices y los otros tres se dividen en seis mitades, cada una situada en el centro de cada cara.

Finalmente, los 65 grupos espaciales componen el conjunto de operaciones de simetría que se han de aplicar a la unidad asimétrica para generar la celda unitaria. En la Tabla A.6 se detallan los 65 grupos espaciales.

Tabla A.5: Clasificación de los sistemas cristalinos y las redes de Bravais [Disponible en <http://www.iue.tuwien.ac.at/phd/karlowatz/img151.png>]

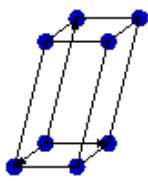
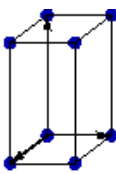
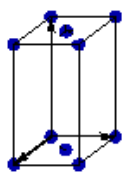
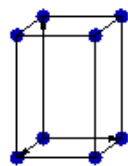
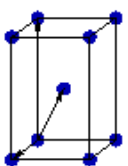
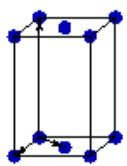
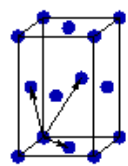
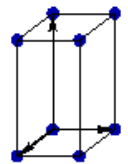
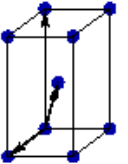

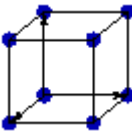
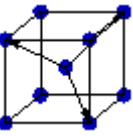
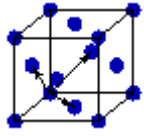
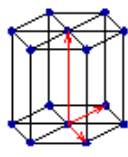
Los 7 sistemas cristalinos		Las 14 redes de Bravais			
Nombre	Parámetros	P	I	C	F
<i>Triclínico</i>	$a \neq b \neq c$ $\alpha \neq \beta \neq \gamma$				
<i>Monoclínico</i>	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \gamma = 90^\circ \neq \beta$				
<i>Ortorrómico</i>	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$				
<i>Tetragonal</i>	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$				
<i>Trigonal</i>	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma < 120^\circ$				
<i>Cúbico</i>	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$				
<i>Hexagonal</i>	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = 90^\circ$ $\gamma = 120^\circ$				

Tabla A.6: Clasificación de los grupos espaciales.

Sistema cristalino	Grupos espaciales
Triclínico	P1
Monoclínico	P2, P2 ₁ , C2
Ortorrómbico	P222, P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ , P2 ₁ 2 ₁ 2, P222 ₁ , C222, C222 ₁ , F222, I222, I2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Tetragonal	P4, P4 ₁ , P4 ₂ , P4 ₃ , I4, I4 ₁ , P422, P42 ₁ 2, P4 ₁ 22, P4 ₁ 2 ₁ 2, P4 ₂ 22, P4 ₂ 2 ₁ 2, P4 ₃ 2 ₁ 2, P4 ₃ 22, I4 ₁ 22, I422
Trigonal	P3, P3 ₁ , P3 ₂ , R3, P312, P321, P3 ₁ 21, P3 ₁ 12, P3 ₂ 21, P3 ₂ 12, R32
Cúbico	P23, F23, I23, P2 ₁ 3, I2 ₁ 3, P432, P4 ₁ 32, P4 ₂ 32, P4 ₃ 32, F432, F4 ₁ 32, I432, I4 ₁ 32
Hexagonal	P6, P6 ₅ , P6 ₁ , P6 ₄ , P6 ₃ , P6 ₂ , P622, P6 ₁ 22, P6 ₂ 22, P6 ₃ 22, P6 ₄ 22, P6 ₅ 22

A.6. Análisis de datos de difracción.

Tabla A.7: Programas utilizados en este proyecto durante el análisis de los datos de difracción.

Etapa	Programa
Integración, indexado, procesado y escalado	IMosflm y XDS
Realización de modelos	Turbo-Frodo
Reemplazo molecular	MolRep (CCP4)
Refinado	Refmac5 (CCP4)
Visualización de mapas	Coot 4.1
Representación gráfica	Jmol
Paquetes integrados	CCP4suite

ANEXO B: RESULTADOS

A lo largo de este proyecto se han llevado a cabo 106 ensayos de cristalización empleando la técnica de difusión de vapor en gota colgante. Estos ensayos se han dividido en varias series, en función de las condiciones de la gota. En este apartado se detallan las condiciones de cristalización probadas para cada serie cristalográfica.



En cada serie se especifica la secuencia del oligonucleótido utilizado y su concentración en estoc, la concentración de proteína en estoc, el nombre de la cápsula, la concentración y relación molar tanto del oligonucleótido como de la proteína en la gota, las soluciones Matrix (Hampton Research) o soluciones adaptadas junto a su cantidad de sales, tampón, pH, cantidad y tipo de precipitante, condiciones del pozo (inicial y final) y observaciones de la gota (principalmente gota clara, separación de fases, precipitado cristalino u obtención de cristales de diversos tipos). En la Tabla B.1 se explican algunas de las abreviaturas utilizadas en las tablas de condiciones de gotas, así como los colores utilizados para indicar en qué condiciones se obtuvieron cristales de considerable calidad.

Tabla B.1: Leyenda de colores y glosario de las tablas y de las condiciones de las gotas.

Cap	Nombre de la cápsula.
Rel	Relación molar (X:1) entre proteína (X) y oligonucleótido (1).
C _P (mM)	Concentración de proteína, en mM.
C _{ADN} (mM)	Concentración de oligonucleótido, en mM.
SC	Nombre de la solución de cristalización (ver composición en Tabla A.2, A.3 y A.4).
Prec	% de precipitante en la gota.
Pozo	Tipo de precipitante y concentración (%) de precipitante en el pozo.
	Cápsula de donde se han pescado y congelado cristales.

Serie A:

Tabla B.2: Condiciones y resultados para las gotas de la serie A (cápsulas A1-A12).

HMGB1(Δ7-164), Muestra 1, Concentración: 2,62 mM en 50 mM NaCl, 25 mM HEPES, pH:7,4, 1 mM DTT												
Oligonucleótido: GAATTAACGTACGTTAATTCG. Concentración: 1,87 mM en 25 mM NaCac. pH:6,5.												
Temperatura = 4°C												
Cap	Condiciones gota (V = 4 μL)									% Pozo (MPD)		Observaciones
	Rel	C _P (mM)	C _{ADN} (mM)	Condiciones de cristalización						Inicial	Final	
				SC	Tampón	pH	Sal	Prec.	Otros			
A1	2:1	0,4	0,2	N15	25 mM NaCac	6	20 mM MgCl ₂	2,5% MPD		20	27	Muchas precipitaciones.
A2				N43	25 mM Tris	7,5	25 mM NH ₄ Ac + 5 mM MgCl ₂	5% MPD		20	29	Muchas precipitaciones.
A3				T6	25 mM Tris	7,5	10 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	29	Muchas precipitaciones.
A4				C6	25 mM NaCac	6	10 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	29	Muchas precipitaciones.
A5				C9	25 mM NaCac	6	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	29	Muchas precipitaciones.
A6				T9	25 mM Tris	7,5	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	27	Muchas precipitaciones.
A7	1:1	0,25	0,25	N15	25 mM NaCac	6	20 mM MgCl ₂	2,5% MPD		20	38	Muchas precipitaciones.
A8				N43	25 mM Tris	7,5	25 mM NH ₄ Ac + 5 mM MgCl ₂	5% MPD		20	38	Muchas precipitaciones.
A9				T6	25 mM Tris	7,5	10 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	34	Muchas precipitaciones.
A10				C6	25 mM NaCac	6	10 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	30	Muchas precipitaciones.
A11				C9	25 mM NaCac	6	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	30	Muchas precipitaciones.
A12				T9	25 mM Tris	7,5	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	25	Muchas precipitaciones.

En estas condiciones, a pesar de ir aumentando la concentración de precipitante en el pozo de forma muy lenta y de haber reducido la relación molar de 2:1 a 1:1, no se ha conseguido reducir la nucleación. Habría que probar más condiciones.

Serie G:**Tabla B.3: Condiciones y resultados para las gotas de la serie G (cápsulas G1-G6).**

HMGB1(Δ 7-164), Muestra 1, Concentración: 2,62 mM en 50 mM NaCl, 25 mM HEPES, pH:7,4, 1 mM DTT												
Oligonucleótido: CGCGTTTTTCGCGAAAAACGCGG. Concentración: 3,13 mM en 25 mM NaCac. pH:6,5.												
Temperatura = 4°C												
Cap	Condiciones gota (V = 4 μ L)									Pozo (MPD)		Observaciones
	Rel	C _P (mM)	C _{ADN} (mM)	Condiciones de cristalización						Inicial	Final	
				SC	Tampón	pH	Sal	Prec.	Otros			
G1	1:1	0,25	0,25	N15	25 mM NaCac	6	20 mM MgCl ₂	2,5% MPD		20	40	A 34 % se obtuvo precipitado cristalino que no evoluciona.
G2				N43	25 mM Tris	7,5	25 mM NH ₄ Ac + 5 mM MgCl ₂	5% MPD		20	55	A 38 % aparecieron cristales que fueron creciendo en diferentes direcciones.
G3				T6	25 mM Tris	7,5	10 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	40	Precipitado cristalino.
G4				C6	25 mM NaCac	6	10 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	40	Precipitado cristalino más separación de fases.
G5				C9	25 mM NaCac	6	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	33	Cristal líquido que se fue fundiendo.
G6				T9	25 mM Tris	7,5	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	36	Precipitado cristalino más separación de fases.

Para todos los ensayos realizados con este oligonucleótido apareció precipitado cristalino. Se podría fundirlos y volverlos a cristalizar para obtener cristales más grandes.

Continuación serie G:

Tabla B.4: Condiciones y resultados para las gotas de la serie G (cápsulas G7-G18).

HMGB1(Δ7-164), Muestra 1, Concentración: 2,62 mM en 50 mM NaCl, 25 mM HEPES, pH:7,4, 1 mM DTT												
Oligonucleótido: CGCGTTTTTCGCGAAAAACGCGG. Concentración: 3,13 mM en 25 mM NaCac. pH:6,5.												
Temperatura = 4°C												
Cap	Condiciones gota (V = 4 µL)									Pozo (MPD o PEG 400)		Observaciones
	Rel	C _P (mM)	C _{ADN} (mM)	Condiciones de cristalización						Inicial	Final	
				SC	Tampón	pH	Sal	Prec.	Otros			
G7	1:1	0,25	0,25	Cit1	25 mM NaCit	4,5	10 mM NH ₄ Ac	3% PEG	1 mM DTT	25	50	Gota clara
G8				Cit2	25 mM NaCit	4,5	10 mM NH ₄ Ac	3% PEG		25	50	Gota clara
G9				Cit3	25 mM NaCit	4,5	10 mM NH ₄ Ac	5% MPD	1 mM DTT	25	50	Gota clara
G10				Cit4	25 mM NaCit	4,5	10 mM NH ₄ Ac	5% MPD		25	50	Gota turbia
G11				Cit5	25 mM NaCit	4,5	10 mM MgCl ₂	3% PEG	1 mM DTT	25	50	Gota clara
G12				Cit6	25 mM NaCit	4,5	10 mM MgCl ₂	3% PEG		25	50	Gota turbia
G13				Cit7	25 mM NaCit	4,5	10 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	25	50	Gota clara
G14				Cit8	25 mM NaCit	4,5	10 mM MgCl ₂	5% MPD		25	50	Gota clara
G15				Cit9	25 mM NaCit	4,5	10 mM NH ₄ Ac + 10 mM MgCl ₂	3% PEG	1 mM DTT	25	50	Gota clara
G16				Cit10	25 mM NaCit	4,5	10 mM NH ₄ Ac + 10 mM MgCl ₂	3% PEG		25	50	Gota turbia
G17				Cit11	25 mM NaCit	4,5	10 mM NH ₄ Ac + 10 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	25	50	Gota clara
G18				Cit12	25 mM NaCit	4,5	10 mM NH ₄ Ac + 10 mM MgCl ₂	5% MPD		25	50	Gota clara

Condiciones que intentaron reproducir a las obtenidas de un seminario sobre la cristalización de la proteína ABF2 (proteína con dos motivos de unión del tipo HMG-box, como la HMGB1) con ADN. Se observa que el pH recomendado es muy bajo, algo atípico considerando que se aleja de las condiciones fisiológicas (normalmente pH=7). No se obtuvieron precipitados cristalinos.

Continuación serie G:**Tabla B.5: Condiciones y resultados para las gotas de la serie G (cápsulas G19-G25).**

HMGB1(Δ 7-164), Muestra 1, Concentración: 2,62 mM en 50 mM NaCl, 25 mM HEPES, pH:7,4, 1 mM DTT												
Oligonucleótido: CGCGTTTTTCGCGAAAAACGCGG. Concentración: 3,13 mM en 25 mM NaCac. pH:6,5.												
Temperatura = 4°C												
Cap	Condiciones gota (V = 4 μ L)									Pozo (MPD)		Observaciones
	Rel	C _P (mM)	C _{ADN} (mM)	Condiciones de cristalización						Inicial	Final	
				SC	Tampón	pH	Sal	Prec.	Otros			
G19	1:1	0,25	0,25	N43	25 mM Tris	7,5	25 mM NH ₄ Ac + 5 mM MgCl ₂	5% MPD		30	42	Exceso de nucleación.
G20				N43	25 mM Tris	7,5	25 mM NH ₄ Ac + 5 mM MgCl ₂	5% MPD		30	42	Exceso de nucleación.
G21				N43	25 mM Tris	7,5	25 mM NH ₄ Ac + 5 mM MgCl ₂	5% MPD		30	42	Exceso de nucleación.
G22				C9	25 mM NaCac	6	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	30	57	Pequeños cristales defectuosos que no crecen.
G23				C9	25 mM NaCac	6	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	30	55	Pequeños cristales defectuosos que no crecen.
G24				T9	25 mM Tris	7,5	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	30	49	Dos pequeños cristales con las caras bien definidas.
G25				N43	25 mM Tris	7,5	25 mM NH ₄ Ac + 5 mM MgCl ₂	5% MPD		30	50	Pequeños cristales amorfos. No evolucionan.
Los mejores resultados se obtuvieron en la cápsula G24. Se pudieron pescar los dos cristales. El resto de cristales obtenidos en las otras cápsulas fueron amorfos y no mejoraron.												

Continuación serie G:

Tabla B.6: Condiciones y resultados para las gotas de la serie G (cápsulas G26-G40).

HMGB1(Δ 7-164), Muestra 1, Concentración: 2,62 mM en 50 mM NaCl, 25 mM HEPES, pH:7,4, 1 mM DTT												
Oligonucleótido: CGCGTTTTTCGCGAAAAACGCGG. Concentración: 3,13 mM en 25 mM NaCac. pH:6,5.												
Temperatura = 4°C												
Cap	Condiciones gota (V = 4 μ L)									Pozo (MPD o PEG)		Observaciones
	Rel	C _P (mM)	C _{ADN} (mM)	Condiciones de cristalización						Inicial	Final	
				SC	Tampón	pH	Sal	Prec.	Otros			
G26	2:1	0,5	0,25	N15	25 mM NaCac	6	20 mM MgCl ₂	2,5% MPD		20	47	Separación de fases pronunciada.
G27				N43	25 mM Tris	7,5	25 mM NH ₄ Ac + 5 mM MgCl ₂	5% MPD		20	57	Separación de fases.
G28				T6	25 mM Tris	7,5	10 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	57	Separación de fases pronunciada.
G29				C6	25 mM NaCac	6	10 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	57	Separación de fases discreta.
G30				C9	25 mM NaCac	6	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	57	Separación de fases central.
G31				T9	25 mM Tris	7,5	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	57	Separación de fases pronunciada
G32				N43	25 mM Tris	7,5	25 mM NH ₄ Ac + 5 mM MgCl ₂	5% MPD		20	53	Gota turbia
G33				N43	25 mM Tris	7,5	25 mM NH ₄ Ac + 5 mM MgCl ₂	5% MPD		20	45	Separación de fases
G34				C9	25 mM NaCac	6	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	57	Separación de fases.
G35				T9	25 mM Tris	7,5	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	42	Separación de fases.
G36				1:1	0,25	0,25	N43	25 mM Tris	7,5	25 mM NH ₄ Ac + 5 mM MgCl ₂	5% MPD	
G37	N43	25 mM Tris	7,5				25 mM NH ₄ Ac + 5 mM MgCl ₂	5% MPD		38	47	Precipitado cristalino.
G38	N43	25 mM Tris	7,5				25 mM NH ₄ Ac + 5 mM MgCl ₂	5% MPD		38	46	Precipitado cristalino.
G39	C9	25 mM NaCac	6				12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	35	45	Cristales defectuosos.
G40	C9	25 mM NaCac	6				12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	35	45	Cristales pequeños bastante bien definidos y brillan mucho.

En todas estas gotas el tiempo de incubación del complejo fue O.N. Se probó la relación 2:1, obteniéndose peores resultados que con la relación 1:1, ya que no se consiguió ningún precipitado cristalino. Se realizaron réplicas utilizando las soluciones de cristalización N43 y C9 con la relación 1:1. Se consiguió pescar un cristal de la cápsula G40.

Continuación serie G:**Tabla B.7: Condiciones y resultados para las gotas de la serie G (cápsulas G41-G46).**

HMGB1(Δ 7-164), Muestra 1, Concentración: 2,62 mM en 50 mM NaCl, 25 mM HEPES, pH:7,4, 1 mM DTT												
Oligonucleótido: CGCGTTTTTCGCGAAAAACGCGG. Concentración: 3,13 mM en 25 mM NaCac. pH:6,5.												
Temperatura = 4°C												
Cap	Condiciones gota (V = 4 μ L)									Pozo (MPD)		Observaciones
	Rel	C _P (mM)	C _{ADN} (mM)	Condiciones de cristalización						Inicial	Final	
				SC	Tampón	pH	Sal	Prec.	Otros			
G41	4:1	0,8	0,2	N15	25 mM NaCac	6	20 mM MgCl ₂	2,5% MPD		20	58	Pequeños cristales que no evolucionan.
G42				N43	25 mM Tris	7,5	25 mM NH ₄ Ac + 5 mM MgCl ₂	5% MPD		20	50	Mucha separación de fases en el borde de la gota.
G43				C9	25 mM NaCac	6	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	59	Separación de fases en el centro y en el borde de la gota.
G44				C6	25 mM NaCac	6	10 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	59	Separación de fases en el centro y en el borde de la gota.
G45				T6	25 mM Tris	7,5	10 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	59	Poca separación de fases.
G46				T9	25 mM Tris	7,5	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	50	Separación de fases en el borde de la gota.
Se obtuvo precipitado cristalino con el tampón N15. Para el resto de tampones usados sólo se obtuvo separación de fases. Convendría probar otras condiciones.												

Serie S:

Tabla B.8: Condiciones y resultados para las gotas de la serie S (cápsulas S1-S12).

HMGB1(Δ 7-164), Muestra 1, Concentración: 2,62 mM en 50 mM NaCl, 25 mM HEPES, pH:7,4, 1 mM DTT												
Oligonucleótido: CCAATAATCGCGATTATTGG. Concentración: 7,315 mM en 25 mM NaCac. pH:6,5.												
Temperatura = 4°C												
Cap	Condiciones gota (V = 4 μ L)									Pozo (MPD)		Observaciones
	Rel	C _P (mM)	C _{ADN} (mM)	Condiciones de cristalización						Inicial (%)	Final (%)	
				SC	Tampón	pH	Sal	Prec.	Otros			
S1	2:1	0,5	0,25	N15	25 mM NaCac	6	20 mM MgCl ₂	2,5% MPD		20	61	A 53% se observaron pequeños cristales brillantes. No se consiguió hacerlos crecer.
S2				N43	25 mM Tris	7,5	25 mM NH ₄ Ac + 5 mM MgCl ₂	5% MPD		20	62	Separación de fases en los bordes y en el centro.
S3				T6	25 mM Tris	7,5	10 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	62	Separación de fases pronunciada.
S4				C6	25 mM NaCac	6	10 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	64	Separación de fases discreta.
S5				C9	25 mM NaCac	6	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	62	Separación de fases discreta.
S6				T9	25 mM Tris	7,5	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	58	A 45 % aparecieron cristales pequeños. Son defectuosos pero brillan mucho.
Sólo se obtuvieron pequeños cristales en S1 y S6. Se repitieron estas gotas en las mismas condiciones, pero con un % de pozo inicial superior (30%). Las condiciones N15 y T9 se duplicaron, ya que en ambas se obtuvo precipitado cristalino.												
S7	2:1	0,5	0,25	N15	25 mM NaCac	6	20 mM MgCl ₂	2,5% MPD		30	50	Precipitación cristalina. Se fundieron con facilidad.
S8				N15	25 mM NaCac	6	20 mM MgCl ₂	2,5% MPD		30	57	Pequeños cristales. Se fundieron.
S9				T6	25 mM Tris	7,5	10 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	30	55	Separación de fases.
S10				C6	25 mM NaCac	6	10 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	30	62	Separación de fases.
S11				T9	25 mM Tris	7,5	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	30	47	A 43 % aparecieron cristales pequeños. Se fundieron.
S12				T9	25 mM Tris	7,5	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	30	51	A 45% aparecieron muchas precipitaciones cristalinas.
La proteína con este oligonucleótido y las soluciones de cristalización N15 y T9 dió pequeños cristales. No se consiguió aumentar el tamaño de estos cristales ni obtener una estructura interna ordenada. Para próximas gotas, se decidió aumentar la concentración de proteína y oligonucleótido manteniendo la relación molar.												

Continuación serie S:

Tabla B.9: Condiciones y resultados para las gotas de la serie S (cápsulas S13-S24).

HMGB1(Δ 7-164), Muestra 1, Concentración: 2,62 mM en 50 mM NaCl, 25 mM HEPES, pH:7,4, 1 mM DTT												
Oligonucleótido: CCAATAATCGCGATTATTGG. Concentración: 7,315 mM en 25 mM NaCac. pH:6,5.												
Temperatura = 4°C												
Cap	Condiciones gota (V = 4 μ L)									Pozo (MPD)		Observaciones
	Rel	C _P (mM)	C _{ADN} (mM)	Condiciones de cristalización						Inicial	Final	
				SC	Tampón	pH	Sal	Prec.	Otros			
S13	2:1	0,6	0,3	N15	25 mM NaCac	6	20 mM MgCl ₂	2,5% MPD		20	53	En 43% apareció precipitado cristalino. No evoluciona.
S14				N15	25 mM NaCac	6	20 mM MgCl ₂	2,5% MPD		20	53	En 43 % aparición precipitado cristalino. Se fundió.
S15				T6	25 mM Tris	7,5	10 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	62	Separación de fases.
S16				C6	25 mM NaCac	6	10 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	57	Separación de fases.
S17				T9	25 mM Tris	7,5	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	50	Aparición de pequeños cristales defectuosos. Se fundieron.
S18				T9	25 mM Tris	7,5	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	51	A 40% aparecieron cristales más grandes que en repeticiones anteriores, pero son deformes.
Estas condiciones, con mayor concentración de proteína y oligonucleótido con respecto a las gotas G7-G12, no fueron mucho mejores. En vista de que sólo se obtuvieron precipitados con las soluciones de cristalización N15 y T9, se repitieron nuevamente más gotas con esas condiciones.												
S19	2:1	0,5	0,25	N15	25 mM NaCac	6	20 mM MgCl ₂	2,5% MPD		30	40	Precipitado cristalino.
S20				N15	25 mM NaCac	6	20 mM MgCl ₂	2,5% MPD		30	40	Separación de fases.
S21				N15	25 mM NaCac	6	20 mM MgCl ₂	2,5% MPD		30	41	Precipitado cristalino.
S22				T9	25 mM Tris	7,5	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	30	41	Precipitado cristalino.
S23				T9	25 mM Tris	7,5	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	30	41	Precipitado amorfo con agregados cristalinos brillantes.
S24				T9	25 mM Tris	7,5	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	30	43	En 40% aparecieron cristales grandes, pero irregulares.
La incubación del complejo fue O.N. No se ha podido conseguir el crecimiento de los cristales a un tamaño adecuado. Se decidió probar con otra relación proteína-oligonucleótido.												

Serie B:

Tabla B.10: Condiciones y resultados para las gotas de la serie B (cápsulas B1-B12).

HMGB1(Δ 7-164), Muestra 1, Concentración: 2,62 mM en 50 mM NaCl, 25 mM HEPES, pH:7,4, 1 mM DTT												
Oligonucleótido: CCAATAATCGCGATTATTGG. Concentración: 7,315 mM en 25 mM NaCac. pH:6,5.												
Temperatura = 4°C												
Cap	Condiciones gota (V = 4 μ L)									Pozo (MPD)		Observaciones
	Rel	C _P (mM)	C _{ADN} (mM)	Condiciones de cristalización						Inicial	Final	
				SC	Tampón	pH	Sal	Prec.	Otros			
B1	1:1	0,3	0,3	N15	25 mM NaCac	6	20 mM MgCl ₂	2,5% MPD		20	63	A 55% apareció precipitado cristalino. Pequeños cristales definidos.
B2				N43	25 mM Tris	7,5	25 mM NH ₄ Ac + 5 mM MgCl ₂	5% MPD		20	62	Separación de fases.
B3				T6	25 mM Tris	7,5	10 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	53	Separación de fases.
B4				C6	25 mM NaCac	6	10 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	59	Separación de fases.
B5				C9	25 mM NaCac	6	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	59	Separación de fases.
B6				T9	25 mM Tris	7,5	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	43	A 40% aparecieron pequeños cristales irregulares en el centro. Se difractaron (sincrotrón ALBA) y se analizaron los datos obtenidos.
Se observaron precipitados cristalinos en las mismas condiciones de solución de cristalización que en 2:1, pero en este caso sí se consiguió pescar. En la gota B6 se congelaron dos cristales utilizando un loop magnético de tamaño 0,25.												
B7	1:1	0,3	0,3	N15	25 mM NaCac	6	20 mM MgCl ₂	2,5% MPD		20	44	Precipitado cristalino. Se fundieron.
B8				N15	25 mM NaCac	6	20 mM MgCl ₂	2,5% MPD		20	44	Precipitado cristalino. Se fundieron.
B9				N15	25 mM NaCac	6	20 mM MgCl ₂	2,5% MPD		20	44	Precipitado cristalino. Se fundieron.
B10				T9	25 mM Tris	7,5	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	43	Pequeños cristales con imperfecciones en los bordes.
B11				T9	25 mM Tris	7,5	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	68	A 42 % se obtuvieron dos cristales grandes. Uno no brilla mucho, el otro sí. Tienen muchas imperfecciones en la superficie. Se pescó un cristal
B12				T9	25 mM Tris	7,5	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	66	A 42% aparecieron cristales líquidos que fueron formándose. Se pescó uno.
Repeticiones utilizando las soluciones de cristalización en las que se observó precipitado cristalino en los ensayos anteriores (N15 y T9). Se pescaron dos cristales de las gotas B11 y B12.												

Continuación serie B:**Tabla B.11: Condiciones y resultados para las gotas de la serie B (cápsulas B13-B18).**

HMGB1(Δ 7-164), Muestra 1, Concentración: 2,62 mM en 50 mM NaCl, 25 mM HEPES, pH:7,4, 1 mM DTT												
Oligonucleótido: CCAATAATCGCGATTATTGG. Concentración: 7,315 mM en 25 mM NaCac. pH:6,5.												
Temperatura = 4°C												
Cap	Condiciones gota (V = 4 μ L)									Pozo (MPD)		Observaciones
	Rel	C _P (mM)	C _{ADN} (mM)	Condiciones de cristalización						Inicial	Final	
				SC	Tampón	pH	Sal	Prec.	Otros			
B13	1:1	0,3	0,3	15	25 mM NaCac	6	20 mM MgCl ₂	2,5% MPD		30	38	Formación de esferulitas.
B14				15	25 mM NaCac	6	20 mM MgCl ₂	2,5% MPD		30	39	Precipitado cristalino.
B15				15	25 mM NaCac	6	20 mM MgCl ₂	2,5% MPD		30	38	Precipitado cristalino.
B16				T9	25 mM Tris	7,5	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	30	35	Exceso de nucleaciones.
B17				T9	25 mM Tris	7,5	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	30	35	Exceso de nucleaciones.
B18				T9	25 mM Tris	7,5	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	30	35	Exceso de nucleaciones.
Sería recomendable empezar con concentraciones en el pozo más bajas y subir la concentración más despacio.												

Serie R:

Tabla B.12: Condiciones y resultados para las gotas de la serie R (cápsulas R1-R6).

HMGB1(Δ 7-164), Muestra 1, Concentración: 2,62 mM en 50 mM NaCl, 25 mM HEPES, pH:7,4, 1 mM DTT												
Oligonucleótido: CCAATAATCGCGATTATTGG. Concentración: 7,315 mM en 25 mM NaCac. pH:6,5.												
Temperatura = 4°C												
Cap	Condiciones gota (V = 4 μ L)									Pozo (MPD)		Observaciones
	Rel	C _P (mM)	C _{ADN} (mM)	Condiciones de cristalización						Inicial	Final	
				SC	Tampón	pH	Sal	Prec.	Otros			
R1	4:1	1	0,25	N15	25 mM NaCac	6	20 mM MgCl ₂	2,5% MPD		20	61	A 55% de MPD en el pozo apareció un cristal que va creciendo, pero en varias direcciones.
R2				N43	25 mM Tris	7,5	25 mM NH ₄ Ac + 5 mM MgCl ₂	5% MPD		20	64	Gota clara.
R3				C9	25 mM NaCac	6	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	64	Separación de fases.
R4				C6	25 mM NaCac	6	10 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	64	Separación de fases.
R5				T6	25 mM Tris	7,5	10 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	60	Aparición de muchos núcleos cristalinos.
R6				T9	25 mM Tris	7,5	12,5 mM MgCl ₂	5% MPD	1 mM DTT	20	62	A 48 % de MPD en el pozo aparecieron muchas precipitaciones.

Los mejores resultados se obtuvieron en la cápsula R1. A pesar de que el cristal creció en varias direcciones, podría mejorar y presentar mucho brillo, además de terminar de definirse las aristas. Si eso ocurriera se separaría del resto utilizando una aguja y se pescaría.

ANEXO C: ESTUDIO ECONÓMICO DEL PROYECTO

En este anexo se realiza una evaluación económica del proyecto llevado a cabo. Para calcular el coste global de éste, se han tenido en cuenta los siguientes conceptos: Reactivos y consumibles, equipos, personal y gastos generales. A continuación se describe cada apartado y se detallan los costes parciales y totales.

- a) Reactivos y consumibles: Se incluyen los productos químicos y los materiales consumibles utilizados durante la expresión y purificación de la proteína (incluidos los geles electroforéticos) y durante la realización de los ensayos cristalográficos. Para los reactivos se aplica un factor de uso que corresponde a la fracción de lote consumida y para los consumibles se indica el número de unidades utilizadas (Tabla C.1 y Tabla C.2).

Tabla C.1: Costes asociados a los reactivos.

Producto		Cantidad lote	Precio lote (€)	Factor de uso	Coste (€)
Expresión y purificación					
Medio LB	Triptona	500 g	37	0,14	5,1
	Extracto de levadura	500 g	24	0,07	1,6
	NaCl	500 g	31,6	0,14	4,4
Agar		500 g	54	0,004	0,2
IPTG		1 g	74,5	1,5	111,7
Reactivos para el tratamiento del sedimento bacteriano	Inhibidores de proteasa	20 comprimidos	261,9	0,05	13
	DNAsa	1 mL	106,5	0,001	0,1
Resina para la columna de afinidad GST		25 mL	240	0,3	72
Reactivos para las columnas	Trombina	500 unidades	120,4	0,5	60,2
	Tris	1.000 g	65,4	0,01	0,6
	NaCl	500 g	31,6	0,01	0,3
	EDTA	250 g	51	0,01	0,5
	Glicerol	500 g	52,2	0,05	2,6
	DTT	5 g	129,4	0,005	0,6
	CaCl ₂	500 g	10,9	0,005	0,05
	HEPES	1.000 g	429,5	0,005	2,1
Cloruro de guanidina		25 g	36,5	1	36,5

Producto		Cantidad lote	Precio lote (€)	Factor de uso	Coste (€)
Reactivos geles electroforesis	Acrilamida	500 g	157	0,05	7,8
	Bisacrilamida	100 g	89,4	0,007	0,6
	Tris	1.000 g	65,4	0,07	4,5
	SDS	100 g	82,8	0,016	1,3
	PSA	5 g	12,2	0,25	3
	TEMED	100 mL	25,6	0,009	0,2
	HEPES	1.000 g	429,5	0,001	0,4
	Glicerol	500 g	52,2	0,03	1,5
Reactivos tampón cubeta	Tris	1.000 g	65,4	0,15	9,8
	Glicina	500 g	84,2	0,72	60,6
	SDS	100 g	82,8	0,25	20,7
	HEPES	1.000 g	429,5	0,06	25,7
	NaCl	500 g	31,6	0,01	0,3
	Glicerol	500 g	52,2	0,06	3,1
Reactivos tampón de muestra	Tris	1.000 g	65,4	0,0006	0,04
	SDS	100 g	82,8	0,012	0,9
	Mercaptoetanol	100 mL	35,7	0,03	1
	Azul de bromofenol	5 g	37,8	0,012	0,4
	HEPES	1.000 g	429,5	0,06	25,7
	NaCl	500 g	31,6	0,01	0,3
	Glicerol	500 g	52,2	0,06	3,1
Reactivos solución teñidora y desteñidora	Isopropanol	1 L	19,9	0,4	7,9
	Ácido acético	1 L	14,2	0,4	5,6
	Azul de Coomassie	100 g	135,5	0,05	6,7
Solución comercial SYBRGold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen)		500 µL	154	0,04	6,1
Conjunto de soluciones comerciales SilverQuest (Invitrogen)		1 caja	257	0,1	25,7
Subtotal (expresión y purificación)					534,4

Producto	Cantidad lote	Precio lote (€)	Factor de uso	Coste (€)
Cristalografía				
$C_2A_2TA_2TCGCGAT_2AT_2G_2$ (20 pb)	4 mg	900	0,03	27
$GA_2T_2A_2CGTACGT_2A_2T_2CG$ (21 pb)	4 mg	900	0,005	4,5
$CGCGT_5CGCGA_5CGCG_2$ (23 pb)	4 mg	900	0,09	81
MPD	500 mL	44,3	2	88,6
PEG 400	1 L	30,74	0,05	1,54
Soluciones Natrix H2-116	0,5 mL/solución	140	0,06	8,4
Nitrógeno líquido	1 L	0,72	5	3,6
Subtotal (cristalografía)				214,6
Total (expresión y purificación + cristalografía)				748,4

Tabla C.2: Costes asociados a los consumibles.

Consumible	Precio unitario (€)	Número de unidades	Coste (€)
Expresión y purificación			
Vivaspin 4 mL	4,5	3	13,7
Vivaspin 20 mL	8,3	1	8,3
Columna HiTrap SP FF (5 mL)	110,9	1	110,9
Columna superdex 75 (24 mL)	1.859	1	1.859
Eppendorfs (bolsas)	69,3	1,5	103,9
Puntas pipetas azules (bolsas)	21,6	2	43,3
Puntas pipetas amarillas (bolsas)	13,6	2	27,3
Puntas pipetas blancas (bolsas)	11,8	1	11,8
Subtotal (expresión y purificación)			2.178
Cristalografía			
Cápsulas cristalización	0,12	106	12,7
Crioloop	7,5	1	7,5
Eppendorfs (bolsas)	69,3	1	69,3
Puntas pipetas azules (bolsas)	21,6	0,4	8,6
Puntas pipetas amarillas (bolsas)	13,6	0,05	0,6
Puntas pipetas blancas (bolsas)	11,8	0,05	0,5
Subtotal (cristalografía)			99,2
Total (expresión y purificación + cristalografía)			2.277

- b) Equipos: Se tienen en cuenta todos los equipos utilizados durante el proyecto. Se ha supuesto un periodo de amortización de 10 años para cada equipo. Además se ha tenido en cuenta la duración del proyecto (17 meses) y el número de personas que han utilizado cada equipo. Todas estas consideraciones quedan reflejadas en un factor de uso aproximado que, multiplicado por el precio del equipo, da una idea de los costes asociados (Tabla C.3).

Tabla C.3: Costes asociados a los equipos utilizados.

Equipo de laboratorio	Precio (€)	Factor de uso	Coste (€)
Expresión y purificación			
Congelador -80°C	4.000	0,1	400
Congelador -20°C	600	0,1	60
Máquina productora de hielo	4.000	0,01	40
Nevera 4°C	500	0,1	50
Estufa 37°C	697	0,1	69,7
Baño 37°C	565	0,1	56,5
Incubadora/Agitador 37°C + accesorios	8.900	0,1	890
Bunsen	42	0,1	4,2
Espectrofotómetro-UV	40.000	0,02	800
Lavavajillas material laboratorio	4.840	0,1	484
Autoclave	2.850	0,1	285
Purificador de agua	6.300	0,02	126
Sonicador	2.661	0,02	53,21
Escaner de gel Gel Doc XR	10.579	0,1	1057
ÄKTA Purifier GE Healthcare	38.330	0,1	3.833
Armario refrigerado FPLC	3.750	0,1	375
Jeringa Hamilton	58	0,1	5,8
Fuente eléctrica electroforesis	720	0,1	72
Cubetas electroforesis + accesorios	470	0,1	47
Microcentrífuga	1.000	0,1	100
Centrífuga	26.750	0,05	1.337
Rotor GSA	8.500	0,02	170
Rotor SS34	5.200	0,02	104
pH-metro	1.500	0,05	75
Balanza	1.000	0,02	20
Agitador magnético	200	0,1	20
Micropipetas	1.400	0,1	140
Subtotal (expresión y purificación)			10.675

Equipo de laboratorio	Precio (€)	Factor de uso	Coste (€)
Cristalografía¹			
Microscopio óptico	20.000	0,05	1.000
Nevera 4°C cámara fría	500	0,1	50
Material para congelación	250	0,1	25
Ordenadores procesado de datos	900	0,02	18
Subtotal (cristalografía)			1.093
Total (expresión y purificación + cristalografía)			11.768

¹Un aspecto importante en proyectos de cristalografía es el coste asociado a las instalaciones de sincrotrón, ya que suponen un elevado coste por sesión. En este caso se asistió de forma gratuita debido a la aceptación del proyecto debido a su importancia por parte del sincrotrón ALBA. Como referencia, 1 hora de sincrotrón costaría unos 8.000 euros. Para la plataforma cristalográfica del Parc Científic de Barcelona, la sesión (24 horas) costaría unos 900 euros.

- c) Personal: Se tienen en cuenta las horas imputadas en este proyecto por parte del investigador y de los directores (Tabla C.4).

Tabla C.4: Costes del personal implicados en este proyecto.

Categoría	Precio (€/h)	Horas	Coste (€)
Investigador	18	2.000	36.000
Director	32	100	3.200
Total			39.200 €

- d) Gastos generales: Estos gastos serían la electricidad, el agua, material básico de laboratorio y oficina, etc. Se ha tomado un valor de 10% de la suma de los costes anteriores.

Así, el coste total del proyecto se calcula sumando el valor total de cada uno de los conceptos (Tabla C.5).

Tabla C.5: Coste total desglosado del proyecto.

Concepto	Etapas / Categoría	Coste (€)
Reactivos	Expresión y purificación	534,4
	Cristalografía	214,6
Consumibles	Expresión y purificación	2.178
	Cristalografía	99,2
Equipos	Expresión y purificación	10.675
	Cristalografía	1.093
Personal	Investigador	36.000
	Director	3.200
Gastos generales	Todas las etapas del proyecto	5.400
Total		59.394

Así, el coste total del proyecto estaría estimado en unos 59.000 €. Aproximadamente un 60% de este coste viene asociado al sueldo del investigador, ya que se requiere de mucho tiempo para proyectos de purificación de proteína y cristalografía.

Por otra parte, un 10% del coste total viene asociado a los equipos, ya que se requieren máquinas muy específicas y precisas para garantizar la calidad de las tareas realizadas.

ANEXO D: ESTUDIO DEL IMPACTO AMBIENTAL

En este apartado se realiza un estudio del impacto ambiental que provoca este proyecto, siguiendo las recomendaciones de la guía “Consideraciones ambientales para los PFC” (ver bibliografía complementaria). Se entiende como impacto ambiental cualquier acción transformadora ocasionada directa o indirectamente por las actividades, productos o servicios de una organización en el medioambiente, sea perjudicial o no, donde medioambiente engloba al conjunto de personas, ecosistemas, bienes, cultura, estructura socioeconómica, etc. que conforman el marco de actuación en el que se lleva a cabo un proyecto.

Este proyecto se trata de una fase previa de investigación en laboratorio, por lo tanto, se ha considerado correcto incluir un apartado sobre el impacto ambiental producido durante la etapa de experimentación. Así, se distinguen dos bloques:

a) Evaluación del impacto ambiental de los resultados

Este proyecto se basa en un estudio de investigación que, en este caso, no es aplicable a escala industrial. Tanto las purificaciones como los ensayos cristalográficos realizados en este proyecto tienen como objetivo determinar la estructura tridimensional de los complejos entre secuencias de ADN con la proteína HMGB1($\Delta 7-164$). Este conocimiento puede resultar útil a la hora de desarrollar nuevos fármacos. Por lo tanto, no es posible evaluar el impacto ambiental de la posible aplicación futura de los resultados obtenidos en este trabajo. No obstante, sí que se podría afirmar que tendrían un potencial impacto social positivo, ya que contribuirían a nivel social en la investigación contra enfermedades como el cáncer, ya que la proteína estudiada está involucrada en diversos procesos patológicos.

b) Evaluación del impacto ambiental de la experimentación

El impacto ambiental durante esta etapa viene producido básicamente por la manipulación de sustancias químicas que podrían alterar la calidad del medio ambiente y la salud de las personas involucradas. En general siempre se trabaja en el laboratorio con bata y guantes para evitar la irritación de la piel con el contacto de determinados productos químicos. Además los guantes evitan la contaminación de las muestras. Los productos están almacenados en atmósferas libres de fuentes de ignición y calor y además están bien ventiladas. Por otra parte, las cantidades empleadas, sobre todo en cristalografía, son muy bajas y no suponen ni un gran consumo ni la generación de grandes cantidades de residuos.

Los procesos en los que han intervenido sustancias con mayor potencial de provocar un impacto ambiental negativo, además de un riesgo para la salud, son:

- *Cultivo de bacterias:* Antes de tirar los restos de cultivos líquidos y las placas de agar es necesario desinfectarlos con lejía para evitar la proliferación de bacterias.
- *Preparación de las muestras para electroforesis.* En la preparación de las muestras se utiliza mercaptoetanol, que contiene un grupo tiol (-SH). Aunque las concentraciones de trabajo son muy bajas, para su manipulación es necesaria la utilización de mascarilla, bata y guantes. Además, se trabaja en la campana de extracción de gases para evitar la dispersión de los malos olores.
- *Preparación de los geles de poliacrilamida.* En la preparación de los geles de poliacrilamida se disuelve acrilamida en polvo, un producto inflamable y que puede producir gases tóxicos, así como irritación en ojos, piel y aparato respiratorio. Además, se trata de una sustancia neurotóxica a la que hay que evitar exponerse prolongadamente. Por ello, es imprescindible el uso de mascarilla, gafas de protección, bata y guantes. Para minimizar la manipulación de acrilamida en polvo, inicialmente se prepara un estoc de disolución grande que se conserva en nevera. Además no se generan residuos posteriores ya que la acrilamida polimerizada deja de ser peligrosa.
- *Soluciones teñidora y desteñidora:* Las soluciones que se utilizan para teñir y desteñir los geles de poliacrilamida-SDS contienen ácido acético. En el caso de la solución teñidora, se reaprovecha para otras tinciones. En el caso de la solución desteñidora se le hace pasar por un filtro de carbón activo para volverla a usar.
- *Siliconado de los Falcon:* Se utiliza una campana extractora para evitar respirar los vapores que provienen de la solución de silanización (diclorometilsilano). Los vapores se emiten a la atmósfera provocando impacto ambiental. Sin embargo se utiliza puntualmente y un pequeño volumen.
- *Ensayos cristalográficos:* Aunque durante la realización de estos ensayos se utilizan algunos productos tóxicos, las concentraciones son tan pequeñas que sus efectos son despreciables. El único que se podría tener en cuenta es el precipitante MPD, el cual se deposita en contenedores especialmente destinados para disolventes orgánicos no clorados.

- *Congelación de cristales y difracción de rayos X*: Durante ambos procesos se utiliza nitrógeno líquido para la conservación de los cristales. Los gases inertes pueden ocasionar riesgo de asfixia a concentraciones altas. Es por ello que se trabaja en salas dotadas de un extractor de gases.

La empresa encargada de realizar la gestión de los residuos es EcoCat. Las pautas seguidas para la clasificación y separación de residuos se pueden consultar en la siguiente dirección:

<http://www.upc.edu/sostenible2015/ambits/la-gestio-interna/residus/gestio-de-residus-de-laboratori>.