

Trabajo Final de Máster
Máster Universitario en Ingeniería Química

**Ensayos cristalográficos de complejos de ADN con
proteínas HMG-box y fármacos**

MEMORIA

Autor: Fabiola Alejandra Gómez Jiménez

Director/es: Núria Saperas Plana/J. Lourdes Campos López.

Convocatoria: Junio 2016



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Industrial de Barcelona



Resumen

Las HMGB son proteínas nucleares que presentan el motivo “HMG-box”, con el que se unen al surco estrecho del ADN. Producen cambios estructurales en el mismo y están implicadas en diferentes enfermedades por lo que el estudio estructural de dichas proteínas unidas a ADN es de importancia en el desarrollo de estrategias terapéuticas. Por otra parte, los compuestos derivados de difenilo bisimidazolinio también se unen al surco estrecho del ADN, específicamente en zonas ricas en AT (adenina-timina). Por ello se estudian como potentes compuestos contra enfermedades tropicales causadas por la transmisión de parásitos cuyo genoma es rico en AT.

Mediante este proyecto se estudia la interacción con el surco estrecho del ADN, en zonas ricas en AT, de un fármaco derivado de difenilo bisimidazolinio y de proteínas HMGB (NHP6A y HMGB1 box B). Para ello se expresó y purificó la proteína NHP6A, se obtuvieron cristales de complejos de ADN con la proteína NHP6A, HMGB1 box B y el fármaco CRMV50; y se difractó mediante rayos X los cristales obtenidos.

La proteína NHP6A se obtuvo mediante la técnica del ADN recombinante, transformando la bacteria *Escherichia coli* (cepa BL21(DE3)pLysS) con el plásmido pRJ1228. Este plásmido contiene el gen que codifica la proteína NHP6A y un gen que le confiere a la bacteria resistencia a la ampicilina (lo que permitió su selección). La expresión de la proteína se indujo mediante la adición de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido). Una vez expresada la proteína, se rompió la célula mediante sonicación para extraerla de su interior; y se hizo un fraccionamiento inicial del extracto mediante la adición de TCA para retirar proteínas contaminantes. Luego, se realizó una serie de cromatografías para purificar la proteína. Particularmente, se utilizó una cromatografía de intercambio catiónico (separación por carga) y una de exclusión molecular (separación por tamaño).

Se realizaron ensayos cristalográficos de complejos proteína-ADN o fármaco-ADN, empleando la técnica de difusión de vapor en gota colgante, a diferentes condiciones de cristalización. Se obtuvieron cristales de buen tamaño y homogéneos a partir de NHP6A, HMGB1 box B y el fármaco CRMV50 (fármaco derivado de difenilo bisimidazolinio) con el oligonucleótido AATTTAAATT. Éstos fueron capturados, congelados y difractados mediante rayos X en el sincrotrón ALBA. Los datos obtenidos se procesaron mediante diferentes programas de ordenador para predecir las características básicas de cada estructura.

Sumario

RESUMEN	1
SUMARIO	3
1. GLOSARIO	7
2. PREFACIO	10
2.1. Origen del proyecto y motivación	10
3. INTRODUCCIÓN	11
3.1. Objetivos del proyecto	11
3.2. Alcance del proyecto	11
4. BASES TEÓRICAS	13
4.1. El ADN	13
4.1.1. Estructura del ADN	13
4.1.2. El ADN y su unión con proteínas	17
4.2. Las proteínas HMGB y su unión con el ADN	17
4.2.1. HMGB1	19
4.2.2. NHP6A	20
4.3. Unión del ADN con fármacos	22
4.3.1. Fármacos derivados de difenilo bisimidazolinio	25
4.4. Fundamentos de cristalografía de rayos X	26
4.4.1. Estructura cristalina	26
4.4.2. Difracción de rayos X	30
5. MATERIALES Y MÉTODOS	34
5.1. Expresión de la proteína NHP6A	35
5.1.1. Producción de ADN plasmídico	35
5.1.2. Célula anfitriona	36
5.1.3. Transformación, paso a medio líquido e inducción de la expresión	37
5.1.3.1. Transformación	37
5.1.3.2. Paso a medio líquido	38
5.1.3.3. Inducción de la expresión	39
5.1.4. Tratamiento del sedimento bacteriano	39
5.1.4.1. Ruptura celular	40
5.1.4.2. Fraccionamiento del extracto inicial	41
5.1.4.3. Diálisis	42
5.2. Purificación de la proteína NHP6A	44

5.2.1.	Cromatografía de intercambio iónico	44
5.2.2.	Cromatografía de exclusión molecular	48
5.2.3.	Concentración y diálisis de la proteína NHP6A.....	53
5.2.4.	Determinación de la concentración final de la proteína NHP6A.....	56
5.3.	Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE).....	57
5.4.	Ensayos cristalográficos	62
5.4.1.	Obtención de cristales.....	62
5.4.1.1.	Condiciones de cristalización	63
5.4.1.2.	Método de cristalización por difusión de vapor	64
5.4.2.	Captura de un monocristal	66
5.4.3.	Difracción de rayos X de cristales	67
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	70
6.1.	Optimización del método de expresión y tratamiento del sedimento bacteriano de la proteína NHP6A	70
6.1.1.	Elección de la cepa óptima de <i>Escherichia coli</i>	70
6.1.2.	Método de fraccionamiento del extracto inicial.....	72
6.2.	Expresión de la proteína NHP6A	74
6.3.	Tratamiento del sedimento bacteriano.....	76
6.4.	Purificación de la proteína NHP6A	78
6.4.1.	Cromatografía de intercambio catiónico.....	79
6.4.2.	Cromatografía de exclusión molecular	82
6.4.3.	Concentración y diálisis de la proteína purificada	86
6.5.	Ensayos cristalográficos	89
6.5.1.	Oligonucleótidos empleados	90
6.5.2.	Condiciones de cristalización	90
6.5.3.	Proteína HMGB1 Box B	92
6.5.4.	Proteína NHP6A	94
6.5.5.	Fármaco CRMV50	99
6.6.	Análisis de los resultados de difracción	105
6.6.1.	Proteína HMGB1 box B	106
6.6.2.	Proteína NHP6A	110
6.6.3.	Fármaco CRMV50	112
CONCLUSIONES	114
BIBLIOGRAFÍA	117
Referencias bibliográficas		117
Bibliografía complementaria		120
ANEXO A: OBTENCIÓN DE ADN PLASMÍDICO (MINIPREP)	122

ANEXO B: ENSAYOS CRISTALOGRÁFICOS	126
B.1 Soluciones de cristalización Matrix HR2-116.....	126
B.2 Soluciones de cristalización adaptadas.....	127
B.3 Ensayos cristalográficos con la proteína HMGB1 Box B	128
B.4 Ensayos cristalográficos con la proteína NHP6A.....	130
B.5 Ensayos cristalográficos con el fármaco CRMV50	133
ANEXO C: ASPECTOS ECONÓMICOS DEL PROYECTO	140
ANEXO D: EVALUACIÓN DEL IMPACTO AMBIENTAL DEL ESTUDIO	144

1. Glosario

Nomenclatura

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ARN: ácido ribonucleico.

AT: adenina-timina.

C-terminal: extremo carbonilo, final, de una proteína o polipéptido.

D: Dializado.

DO₆₀₀: densidad óptica medida a 600 nm.

EI: extracto inicial.

EMSA: *Electrophoretic Mobility Shift Assay*.

FPLC: *Fast Protein Liquid Chromatography*.

Fr: fracción recogida durante una cromatografía.

FT: filtrado.

HMG: *High Mobility Group*.

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

kADN: ADN del kinetoplasto. Red de ADN circular rico en zonas AT.

MDP: muestra de partida.

MWCO: *Molecular Weight Cut-Off* (masa molecular, en daltons, retenida en un 90% por una membrana).

MWM: *Molecular Weight Marker* (estándar para identificar el tamaño aproximado de las moléculas analizadas durante una electroforesis).

ND: no disuelto.

N-terminal: extremo amino, inicial, de una proteína o polipéptido.

o/n: *overnight* (toda la noche).

Oligo: oligonucleótido.

pb: par de bases.

pl: punto isoeléctrico.

Precip: precipitante.

rpm: revoluciones por minuto.

SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (electroforesis sobre un gel de poliacrilamida conteniendo dodecil sulfato de sodio).

TD: tesis doctoral.

TFM: trabajo de fin de máster.

Vol: volumen.

Compuestos químicos

AC: Acetato.

Amp: ampicilina.

Cac: cacodilato (ácido arsínico).

CHES: ácido N-ciclohexil-2-aminoetanosulfónico.

Cm: cloranfenicol.

DTT: ditioneitol (reactivo de Cleland – agente reductor).

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético (agente quelante).

HEPES: N-(2-hidroxietil)piperazina-N-(2-ácido etansulfónico).

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

LB: medio Luria-Bertani.

MES: ácido 4-morfolinoetanosulfónico.

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

mQ: agua ultrapura de tipo I obtenida a partir de agua potable con el sistema Milli-Q® de Millipore.

PEG: polietilenglicol.

PMSF: *phenylmethanesulfonyl fluoride* (fluoruro de fenilmetanosulfonilo – inhibidor proteolítico).

PSA: persulfato amónico.

RMN: resonancia magnética nuclear.

SA: sulfato amónico.

SPM: espermina.

TAE: Tris- acético-EDTA.

TCA: ácido tricloroacético.

TCEP: tris(2-carboxietil)fosfina (agente reductor).

TEMED: 1,2-bis(dimetilamino)etano (catalizador para la polimerización de acrilamida con persulfato amónico).

TME: tampón de muestras para electroforesis.

TMSDS: tampón de muestras para geles SDS.

Tris: tris(hidroximetil)aminometano.

TSDS: tampón de cubeta para geles SDS.

2. Prefacio

2.1. Origen del proyecto y motivación

Las HMGB son proteínas nucleares que se caracterizan por presentar el motivo “HMG-box”. A partir de esta región, de 75 aminoácidos, se unen al surco estrecho del ADN. Actúan como un factor de unión de la cromatina produciendo alteraciones estructurales en el ADN e interactuando con otras proteínas para facilitar diversos procesos celulares. Así, están implicadas en la transcripción, recombinación y reparación del ADN. También están implicadas en diferentes enfermedades por lo que el estudio estructural de dichas proteínas unidas a ADN es de importancia en el desarrollo de estrategias terapéuticas. En este proyecto se trabajará con la proteína NHP6A (con un dominio HMG-box) y con la proteína HMGB1 (con dos dominios HMG-box).

Adicionalmente, en estudios previos en el laboratorio del grupo MACROM, se han estudiado compuestos de difenilo bisimidazolinio (sintetizados por el Dr. C. Dardonville del Instituto de Química Médica de Madrid) como ligandos del ADN que se unen específicamente al surco estrecho en zonas ricas en AT (adenina-timina). Por ello se estudian como potentes compuestos contra enfermedades tropicales causadas por la transmisión de un parásito cuyo vehículo es un mosquito, como la malaria y la tripanosomiasis. La malaria es causada por *Plasmodium falciparum* cuyo genoma contiene grandes zonas de ADN rico en AT (aprox. 80%) y, en el caso de la tripanosomiasis, el kADN de *Trypanosoma brucei* tiene más del 70% de AT. Los fármacos utilizados para el tratamiento actual son de baja efectividad, alta toxicidad, efectos secundarios y rápida resistencia del parásito. El estudio de la estructura de fármacos derivados de difenilo bisimidazolinio con oligonucleótidos de secuencias ricas en AT, mediante ensayos cristalográficos, puede aportar información útil para el desarrollo de estrategias terapéuticas.

3. Introducción

3.1. Objetivos del proyecto

Mediante este proyecto se pretende estudiar la interacción con el surco estrecho del ADN, en zonas ricas en AT, de un fármaco derivado de difenilo bisimidazolinio y de proteínas HMGB, particularmente de la NHP6A y la HMGB1 box B, a través de cristalografía por difracción de rayos X.

Los principales objetivos del proyecto son:

- Obtención y purificación de la proteína NHP6A.
- Obtención de cristales de complejos de ADN con la proteína NHP6A, HMGB1 box B y un fármaco.
- Difracción de rayos X de los cristales obtenidos.
- Análisis de los datos obtenidos a partir de la difracción por rayos X.

3.2. Alcance del proyecto

El proyecto abarcará diferentes etapas, comenzando por una búsqueda bibliográfica inicial y terminando con la difracción y el análisis de los datos obtenidos. Las etapas cubiertas son:

- Expresión de la proteína NHP6A: mediante el empleo de técnicas de ingeniería genética, se introducirá en la bacteria *Escherichia coli* el plásmido que contiene el gen que expresa la proteína de interés. Este plásmido contiene además un gen que confiere resistencia a la ampicilina, que permitirá asegurarse de que el plásmido se ha introducido correctamente en la bacteria. Una vez obtenido un volumen suficiente de cultivo de la bacteria, se inducirá la expresión de la proteína mediante la adición de IPTG.
- Purificación de la proteína NHP6A: Una vez expresada la proteína, ésta se purificará hasta obtener muestras de elevada pureza para que se pueda cristalizar. En primer lugar se sonicarán las bacterias para extraer la proteína del interior de la célula. Se llevará a cabo un fraccionamiento inicial de las proteínas presentes para obtener un extracto enriquecido en la proteína de interés y se combinarán distintas técnicas cromatográficas para su purificación. Todas las etapas serán evaluadas por

electroforesis.

- Ensayos cristalográficos: se estudiará el complejo proteína-ADN (de la NHP6A obtenida y de la HMGB1 box B ya disponible pura en el laboratorio del grupo de investigación MACROM en la ETSEIB) y fármaco-ADN. Para ello se empleará la técnica de la gota colgante, con el fin de obtener cristales de gran calidad. Para encontrar las condiciones óptimas de cristalización se variarán los siguientes parámetros: solución de cristalización, pH, relación y concentración de complejos, entre otros. Las gotas se guardarán a baja temperatura y su evolución se monitorizará con un microscopio de luz polarizada.
- Recogida de datos y análisis: una vez se hayan obtenido buenos cristales, se pescarán y se congelarán en nitrógeno líquido. Posteriormente, se difractarán mediante rayos X en la línea BL13 de macromoléculas (XALOC) del Sincrotrón ALBA de Barcelona. Los datos obtenidos se procesarán mediante diferentes programas de ordenador para encontrar características básicas de las estructuras.

4. Bases teóricas

4.1. El ADN

El ADN, o ácido desoxirribonucleico, es una macromolécula que contiene las instrucciones biológicas para el desarrollo, funcionamiento y reproducción de cada especie. Estas instrucciones se almacenan en segmentos de secuencia llamados genes y se utilizan para la codificación de proteínas mediante los procesos conocidos como transcripción y traducción. El tamaño de los genes es muy variable y sólo representan alrededor del 2% de las secuencias de ADN. El resto del ADN es no codificante, es decir, no contiene la información necesaria para la síntesis de proteínas (aunque a menudo está involucrado en la regulación de tales procesos) [3].

Además de almacenar información, el ADN es capaz de replicarse. Esto ocurre previo al proceso de división celular y asegura que las células hijas contengan la misma información genética que la célula inicial [1].

En los organismos eucariotas, el ADN se encuentra dentro del núcleo celular en forma de cromatina, cuya unidad fundamental son los nucleosomas. En los nucleosomas el ADN se enrolla alrededor de un octámero de histonas. El ADN se desenrolla durante la replicación para que la información genética pueda ser copiada y se compacta en forma de cromosomas para transferirse a cada célula hija durante la división celular.

4.1.1. Estructura del ADN

El ADN está formado por unidades repetitivas denominadas nucleótidos (Figura 4.1). Cada nucleótido está constituido por un azúcar, una base nitrogenada y un fosfato. La unión del azúcar con la base nitrogenada se llama nucleósido [1].

En el ADN el azúcar es una pentosa, 2-desoxirribosa. Las bases nitrogenadas se clasifican en dos grupos: purinas y pirimidinas. Ambos son compuestos orgánicos aromáticos y heterocíclicos pero con varias diferencias. Las purinas están compuestas por dos anillos fusionados (uno de cinco átomos y el otro de seis), con un total de cuatro nitrógenos; y las pirimidinas son anillos de seis átomos y contienen dos nitrógenos. En el ADN encontramos las purinas adenina (A) y guanina (G), y las pirimidinas timina (T) y citosina (C) [1].

La unión covalente del azúcar con el fosfato se da mediante enlaces fosfodiéster que forman el esqueleto de la molécula. Se dan entre el tercer y el quinto átomo de carbono de azúcares adyacentes (Figura 4.1).

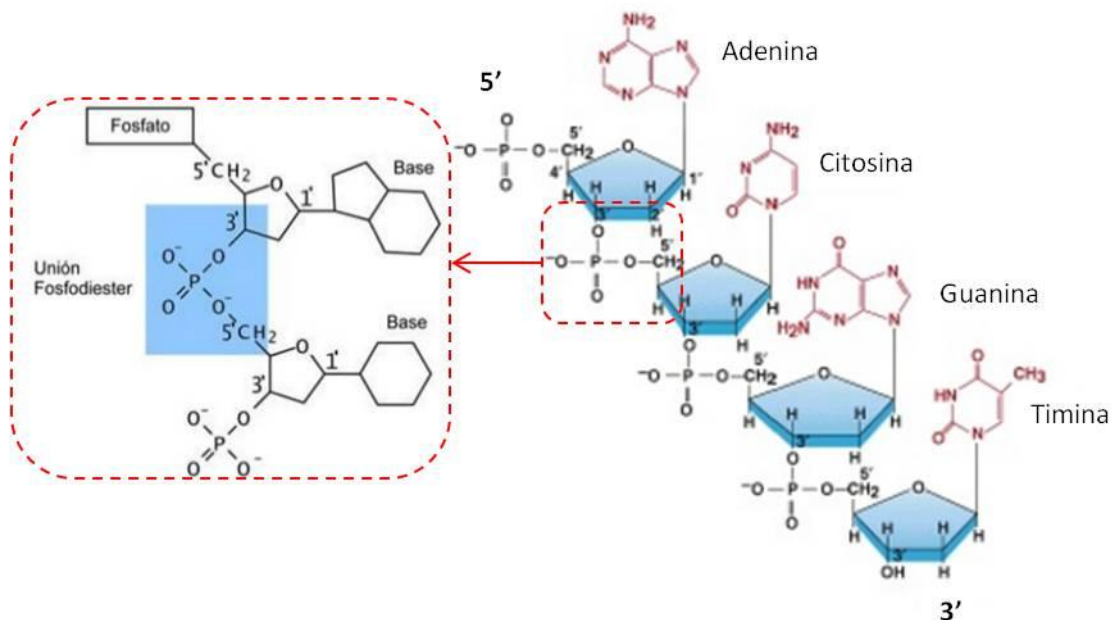


Figura 4.1. Estructura de los nucleótidos del ADN [2]

Dado que los nucleótidos sólo se diferencian en la base nitrogenada, la ordenación de los mismos en la cadena genera un código de cuatro letras, correspondiente a las cuatro bases químicas (A, G, T y C). El ADN humano consiste en aproximadamente 3 billones de bases y más del 99% es el mismo en todas las personas [2].

Las bases se unen entre ellas por puentes de hidrógeno. Las purinas se unen únicamente con su pirimidina complementaria, así la adenina se une a la timina mediante dos y la guanina se une a la citosina mediante tres puentes de hidrógeno [3]. Esta complementariedad permite la unión de dos hebras de ADN para dar su estructura secundaria de doble hélice, formada por dos cadenas antiparalelas (una en dirección 5'-3' y la otra en dirección 3'-5'), como puede verse en la Figura 4.2.

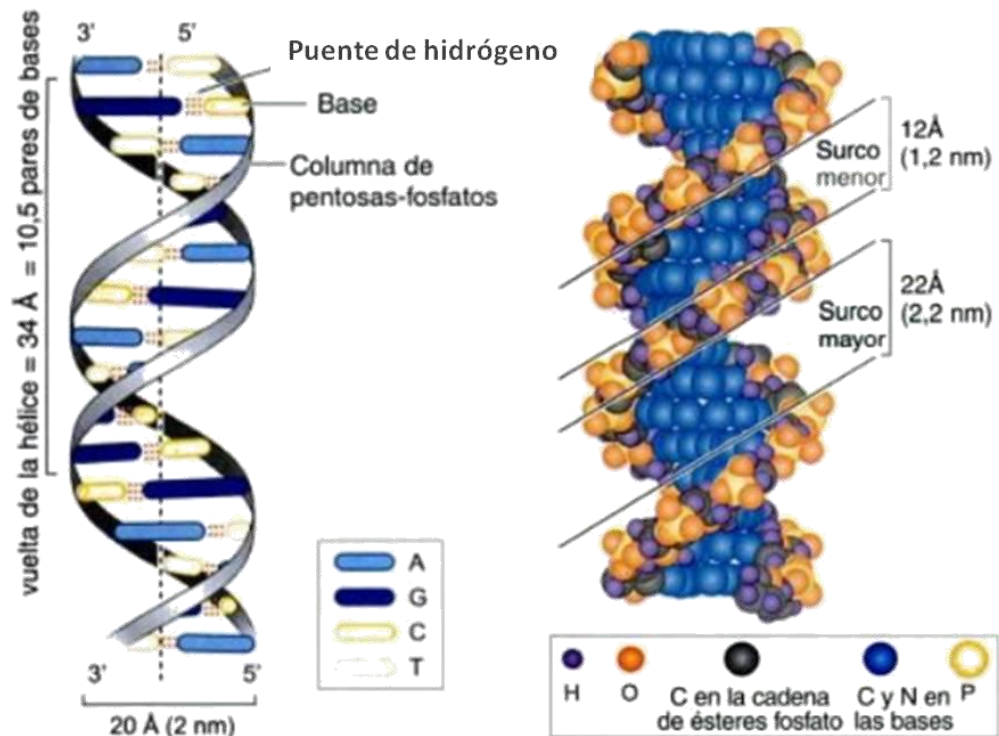


Figura 4.2. Doble hélice del ADN [1]

En la disposición helicoidal del ADN, dado que las hebras no se encuentran localizadas simétricamente entre ellas, aparecen dos surcos, uno mayor y otro menor (Figura 4.2). En el mayor, las bases son más accesibles y suele ser el punto de contacto de proteínas con el ADN.

Existen principalmente tres conformaciones del ADN: forma B, A y Z (Figura 4.3). La forma B fue descrita por Watson y Crick (1953) y es la más abundante en la célula [2]. Aparece en condiciones de humedad elevada, similar al ambiente fisiológico, tiene 10 pares de bases por vuelta, un surco mayor y uno menor. La forma A aparece en condiciones de humedad escasa y tiene 11 pares de bases por vuelta; su surco mayor es más estrecho y profundo que el de la forma B y su surco menor es más ancho y menos profundo. Esto le da una inclinación con respecto al eje central de la hélice y aparece un hueco central. La forma Z es una hélice levógira, tiene aspecto de zigzag y suele darse cuando hay una concentración elevada de iones de carga positiva en el medio que forman una barrera para los grupos fosfato [1].

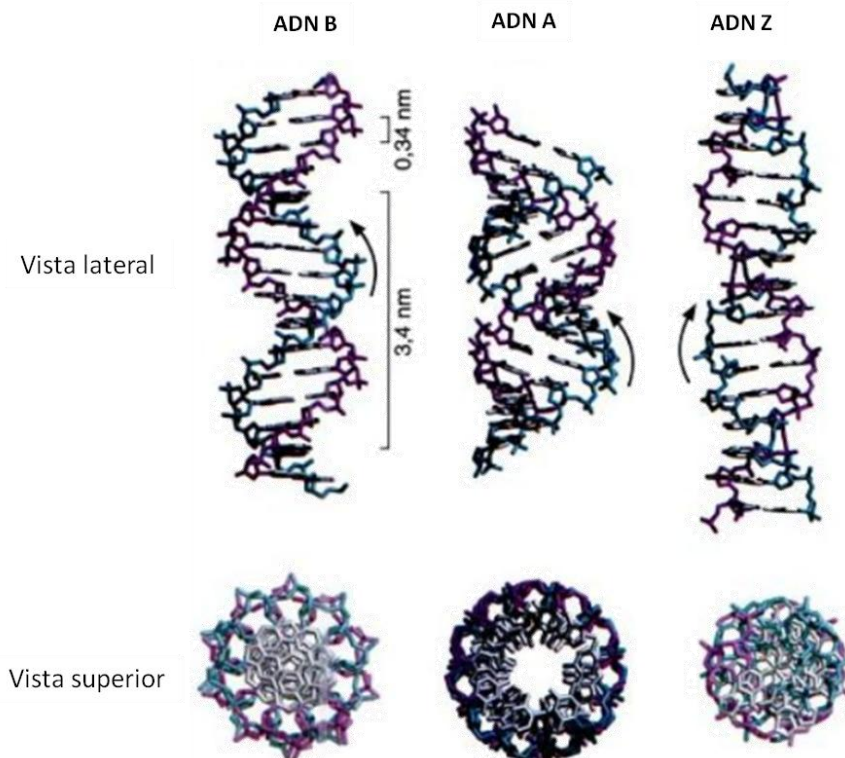


Figura 4.3. Modelos de las formas B, A y Z del ADN [1]

Las principales características de las diferentes conformaciones del ADN se resumen en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1 Comparación de las propiedades de los ADN A, B y Z según el análisis de rayos X de cristales individuales [1]

	Forma A	Forma B	Forma Z
Proporciones generales	Corta y ancha	Más larga y delgada	Alargada y fina
Alzada por par de bases	2,3 Å	3,32 Å	3,8 Å
Diámetro de compactación de la hélice	25,5 Å	23,7 Å	18,4 Å
Sentido de rotación de la hélice	Dextrógira	Dextrógira	Levógira
Pares de bases por repetición de la hélice	1	1	2
Pares de bases por vuelta de la hélice	~11	~10	12
Rotación por par de bases	33,6°	35,9°	-60° por 2 bp
Pendiente por vuelta de la hélice	24,6 Å	33,2 Å	45,6 Å
Inclinación de las normales de las bases con respecto al eje de la hélice	+19°	-1,2°	-9°
Mediana de la torsión en "hélice de aeroplano" de los pares de bases	+18°	+16°	-0°
Ubicación del eje de la hélice	Surco mayor	A través de los pares de bases	Surco menor
Proporciones del surco mayor	Muy angosto y profundo	Ancho y de profundidad intermedia	Aplanado sobre la superficie de la hélice
Proporciones del surco menor	Muy ancho y poco profundo	Angosto y de profundidad intermedia	Muy angosto y profundo
Conformación de los enlaces glucosídicos	<i>anti</i>	<i>anti</i>	<i>anti</i> en C, <i>sin</i> en G

Por otro lado, el ADN se puede encontrar no sólo en forma lineal sino también como cruciforme (*four-way junctions*), superenrollado (*supercoiled*), etc.

4.1.2. El ADN y su unión con proteínas

Las funciones del ADN dependen de su interacción con las proteínas. Estas interacciones pueden ser específicas, si la proteína se une a una secuencia única, o no específicas. Las proteínas con interacción específica pueden reconocer la secuencia de forma directa, a través de los puentes de hidrógeno de las bases y sus grupos metilo, o de forma indirecta detectando la estructura general dada por el esqueleto de fosfatos de la secuencia [4].

En general, las proteínas que interactúan con el ADN se denominan proteínas de unión al ADN. Entre ellas se encuentran las polimerasas, los factores de transcripción, las metilasas, ligasas, nucleasas, histonas, HMG, etc. Este tipo de proteínas suelen incorporar diferentes motivos estructurales que facilitan su unión con el ADN, como son: dedo de zinc, hélice-giro-hélice, cremallera de leucina, entre otros.

4.2. Las proteínas HMGB y su unión con el ADN

Aunque menos abundantes que las histonas, las proteínas HMG (*high mobility group*) son también muy importantes en la regulación de la cromatina. Estas proteínas son de interacción no específica con el ADN, reconociendo particularidades de la cromatina en vez de secuencias específicas, doblando tramos de nucleosomas y organizándolos para formar la estructura del cromosoma. Básicamente, su función genómica principal es activar y desactivar dominios de la cromatina haciéndola más o menos accesible a los factores de transcripción. Tienen funciones de control de la expresión de genes y contribuyen a modular la transcripción frente a rápidos cambios ambientales. Para lograr estas tareas, deben interactuar con nucleosomas, factores de transcripción e histonas [6].

La familia de las HMG se divide en tres grandes grupos de acuerdo a su motivo estructural característico de unión al ADN: HMGA, HMGB y HMGN (Figura 4.4). La HMGA tiene un motivo denominado *AT-Hook*, la HMGB tiene un motivo HMG-box y la HMGN tiene un motivo de unión a nucleosomas [7]. Las HMGB son las más abundantes, encontrándose aproximadamente 1 HMGB por cada 10-15 nucleosomas.

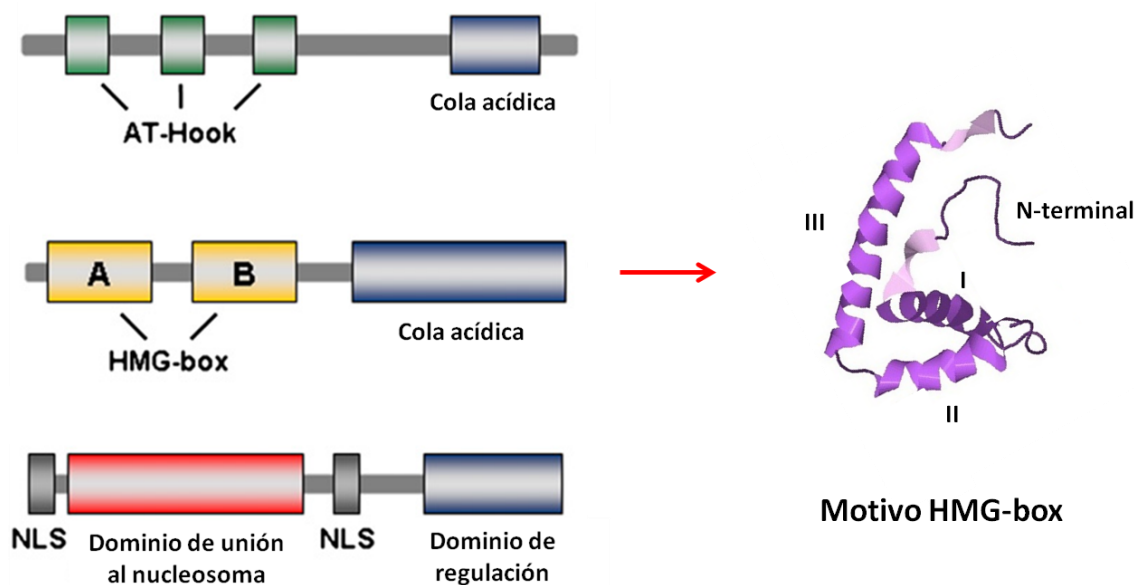


Figura 4.4. Estructura general de los grupos de proteínas de la familia HMG (izquierda) y estructura del motivo HMG-box (derecha) [7]

El motivo de unión al ADN característico de las HMGB es el HMG-box (Figura 4.4). Tiene forma de L compuesta por tres hélices α con un ángulo de 80° entre los brazos. Las hélices I y II forman el brazo corto y la hélice III, el brazo largo. El motivo HMG-box se une al surco menor del ADN doblándolo de 60° a 110° hacia el surco mayor [8].

También puede unirse al ADN en conformaciones distintas a la forma B, como puede ser doblado, enrollado o cruciforme con gran afinidad (Figura 4.5). También son capaces de distorsionar el ADN doblándolo, haciéndolo girar y desenrollándolo [8]. Esta distorsión depende de la intercalación del ADN y la complementariedad de su forma, y permite el acceso al ADN de los nucleosomas a los factores de transcripción o a otras proteínas de unión específica.

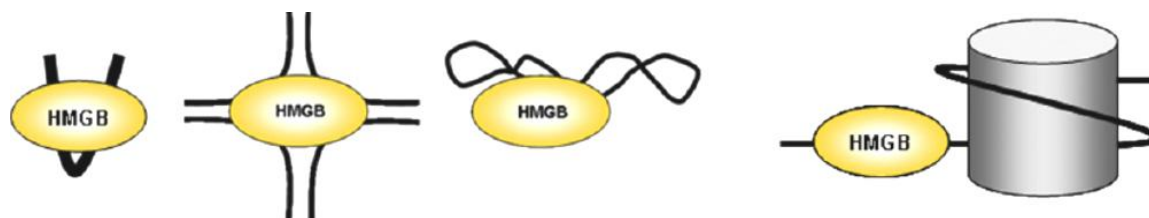


Figura 4.5. Sustratos de unión de las HMGB [7]

De izquierda a derecha presenta: ADN doblado, cruciforme, superenrollado y asociado a un nucleosoma.

Las proteínas HMGB canónicas contienen dos motivos HMG-box en tándem, box A y box B, una cola acídica C-terminal y comparten más del 80% de identidad. También existen HMGB

con un solo HMG-box o más de dos. La cola ácida consiste en tramos de residuos Glu/Asp colocados consecutivamente. Esto hace que sus propiedades de unión al ADN y funcionamiento también difieran [8].

En humanos, existen tres tipos de HMGB: HMGB1 (215 aminoácidos), HMGB2 (209 aminoácidos) y HMGB3 (200 aminoácidos). Se distribuyen uniformemente en el núcleo de las células y son capaces de actuar como citoquinas en la comunicación extracelular. Esto ocurre gracias a modificaciones postraduccionales que modulan las interacciones de las mismas con la cromatina y determinan su reubicación fuera del núcleo hacia el citoplasma y su secreción.

En este proyecto se estudian dos proteínas del grupo HMGB: la HMGB1 (específicamente su box B) y la NHP6A.

4.2.1. HMGB1

La HMGB1 (*high mobility group protein B1*) es una proteína intracelular que puede translocarse al núcleo, donde se une al ADN. Específicamente actúa como una chaperona del ADN, involucrándose en su replicación, transcripción, modelado de la cromatina, reparación del ADN y estabilidad del genoma [9].

Se conoce que está involucrada en la coordinación e integración de las respuestas inmune innata y adaptativa, a la vez que media la autofagia celular. En el ambiente intracelular tiene un efecto nocivo al actuar como molécula DAMP (*danger associated molecular pattern*), amplificando la respuesta inmune durante el daño de tejidos.

Es liberada al ambiente extracelular por células del sistema inmune, como macrófagos y monocitos, para que actúe como mediadora de inflamación. Puede unirse a ADN, nucleosomas, IL-1 beta, lipopolisacáridos y activa células al unirse a múltiples receptores de superficie [9]. Su sobreexpresión ha sido observada en enfermedades que involucran el daño y lesión a tejidos como: cáncer, artritis, lupus, sepsis, etc [10]. Por ello, ha sido propuesta como diana en la terapia contra el cáncer [11] [12].

La Tabla 4.2 muestra las características generales de la proteína HMGB1.

Tabla 4.2. Características generales de la proteína HMGB1

Característica	Descripción
Nombres	High mobility group protein B1
Código ExPASy	P09429 (Homo sapiens)
Nº aminoácidos	214
Masa molecular	24762,5 Da
pl teórico	5,60
Secuencia	<pre> 1 11 21 31 41 51 1 GKGDPKKPR GKSSYAFFV QTCREEHKKK HPDASVNFSE FSKKCSERWK TMSAKEKGF 60 61 EDMAKADKAR YEREMKTYIP PKGETKKKFK DPNAPKRPPS AFFLFCSEYR PKIKGEHPGL 120 121 SIGDVAKKLG EMWNNTAADD KQPYEKKA AK LKEYEKDIA AYRAKGPDA AKKGVVKA EK 180 181 SKKKKEEED EDEEDEEEE EDEEDEEEE DDDDE </pre>

Su estructura consiste en dos motivos HMG-box, box A y box B (Figura 4.6), cada uno con el plegamiento característico en forma de L [8].

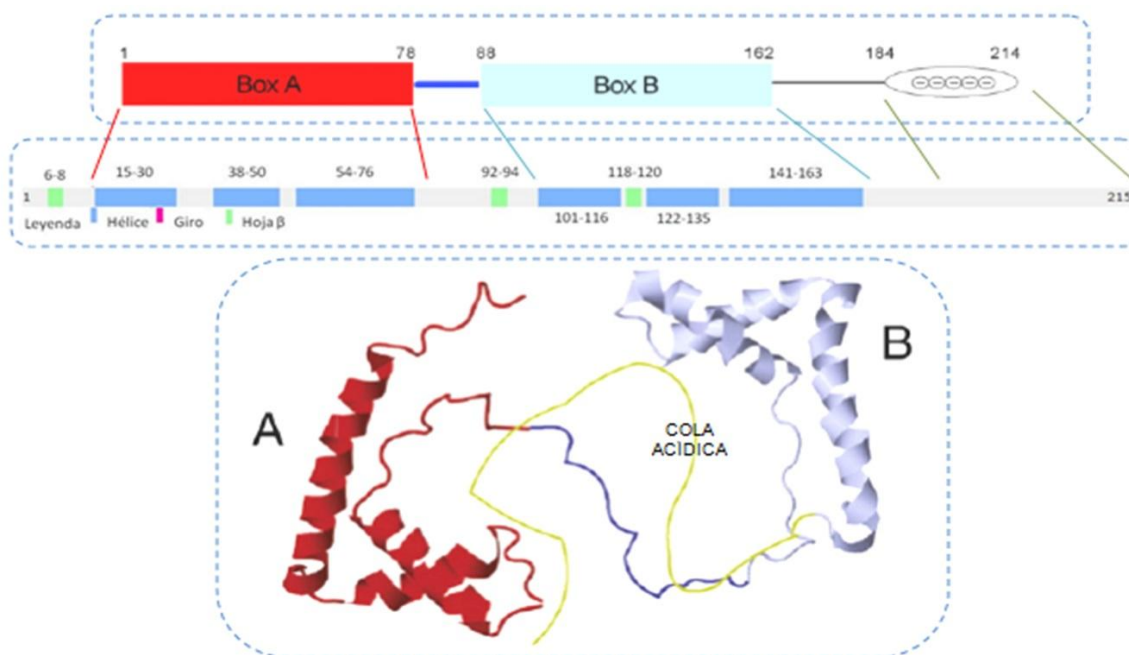


Figura 4.6. Estructura de la proteína HMGB1 [8]

Arriba: esquema de la estructura primaria y secundaria.

Abajo: estructura tridimensional (obtenida mediante RMN - resonancia magnética nuclear).

4.2.2. NHP6A

La proteína NHP6A (*non-histone chromosomal protein 6A*) es una proteína de la familia de las HMGB capaz de producir doblamientos severos en el ADN. Está involucrada principalmente en procesos de modelado de la cromatina y transcripción, al igual que en procesos de organización de nucleosomas, replicación, reparación de errores y aumento de

la fidelidad de la transcripción, regulación de la transcripción y formación de complejos para la actuación de ARN polimerasas [13].

A diferencia de la HMGB1, su estructura presenta un único motivo HMG-box, posee una secuencia N-terminal catiónica y no posee la cola ácida C-terminal. Su box adopta la forma de L característica del HMG-box y es muy similar al box B de la proteína HMGB1. Las hélices I y II forman el brazo corto y la hélice III el brazo largo (Figura 4.7).

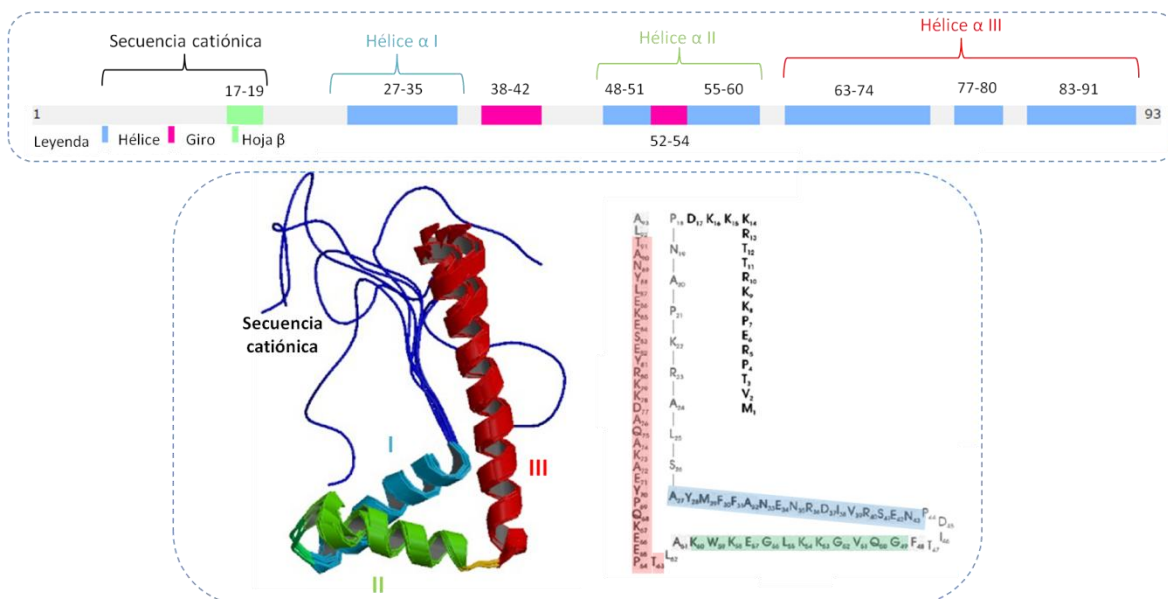


Figura 4.7. Estructura de la proteína NHP6A [14][16]

Arriba: estructura secundaria de cada tramo de la proteína.

Abajo: estructura tridimensional (obtenida mediante RMN) y los aminoácidos que la forman.

La Tabla 4.3 muestra las características generales de la proteína NHP6A.

Tabla 4.3. Características generales de la proteína NHP6A

Característica	Descripción
Nombres	NHP6A - Non-histone chromosomal protein 6A
Código ExPASy	P11632 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> - cepa ATCC 204508 / S288c)
Nº aminoácidos	93
Masa molecular	10802,3 Da
pI teórico	9,76
Secuencia	<p>10 20 30 40 50</p> <p>MVTPREPKKR TTRKKKDPNA PKRALSAYMF FANENRDIRV SENPDITFGQ</p> <p>60 70 80 90</p> <p>VGKKLGEKWK ALTPEEKQPY EAKAQADKKR YESEKELYNA TLA</p>

La actuación de la NHP6A sobre el ADN ocasiona su doblamiento en un amplio rango de ángulos y facilita la formación de estructuras de orden superior, mediante un mecanismo similar a una bisagra flexible. El motivo box B de la NHP6A se coloca en el surco menor del ADN y lo dobla acercando los laterales de su surco mayor (Figura 4.8). Los aminoácidos 29 (metionina) y 48 (fenilalanina) se intercalan con el ADN para lograr el doblamiento [15].

Se cree que la presencia de la secuencia catiónica es importante en la regulación de su habilidad para doblar el ADN [15]. Dicha secuencia estabiliza el complejo ADN-NHP6A porque lo envuelve desde el surco menor al mayor, proveyendo interacciones electrostáticas entre la proteína y el ADN, además de estabilizar las fuerzas de repulsión entre los fosfatos que ahora se acercan en el surco mayor del mismo.

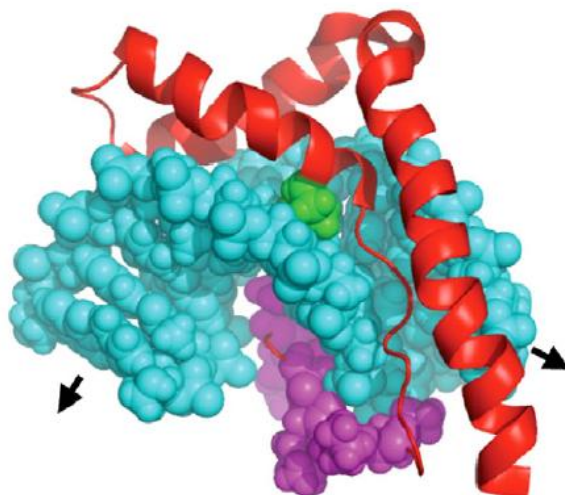


Figura 4.8. Actuación de la NHP6A sobre el ADN [15]

La secuencia catiónica de la NHP6A puede verse en color lila y los residuos intercalados en color verde. Estructura obtenida mediante RMN.

El estudio de la NHP6A ha resultado de particular interés porque contiene sólo el motivo HMG-box B y permite un enfoque más simple al estudio directo de la formación de complejos entre el ADN y la proteína HMGB1.

4.3. Unión del ADN con fármacos

Los procesos de transcripción y replicación comienzan con la unión de proteínas a una secuencia del ADN. Esta unión activa una señal que da inicio al proceso y puede ser imitada

o impedida por moléculas pequeñas que interactúen o se unan con el mismo. De esta manera, tales moléculas pueden actuar como fármacos activando o inhibiendo procesos del ADN con fines terapéuticos [17].

Estos ligandos pueden tener diversas estructuras y pueden unirse o interactuar con el ADN de diferentes maneras. Según su mecanismo de acción pueden clasificarse en:

- Moléculas de unión al surco estrecho (*minor groove binders*): Estas drogas se unen de forma no-covalente al surco menor del ADN y están constituidas por una serie de anillos aromáticos o heterocíclicos con libertad rotacional. Esto permite que la molécula se adapte al surco estrecho desplazando moléculas de agua. Ejemplo de este tipo de moléculas son la distamicina y la netropsina, que actúan como antivirales y antitumorales. Interactúan con regiones ricas en AT formando puentes de hidrógeno y mediante interacciones hidrofóbicas [17]. La unión distamicina-ADN puede verse en la Figura 4.9.

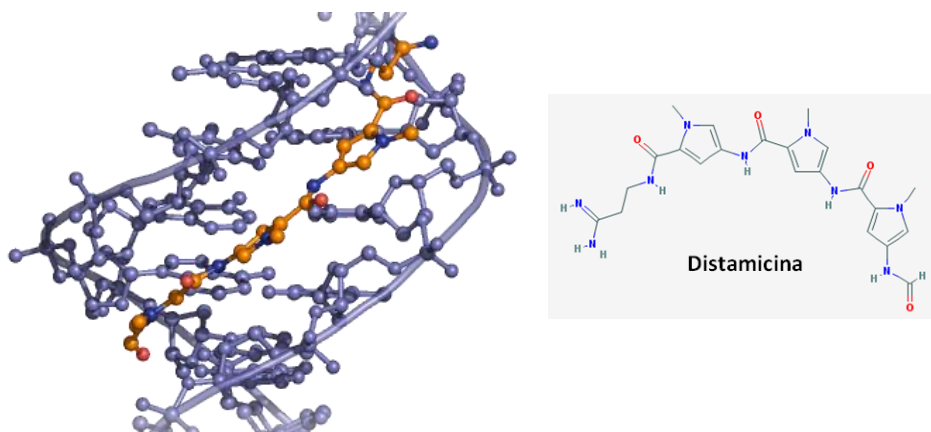


Figura 4.9. Estructura de un complejo de distamicina (naranja) y ADN con unión por el surco estrecho [17]

- Intercaladores: Compuestos aromáticos planos o moléculas heteroaromáticas que se deslizan entre pares de bases, intercalándose en el ADN y estabilizando el complejo por interacciones π - π sin afectar el apareamiento de bases. El efecto de la intercalación es: la elongación de la doble hélice alrededor de 3 Å por molécula intercalada, el desenrollamiento del ADN y la inhibición de la transcripción y replicación por topoisomerasas [17]. El complejo ternario formado entre el ADN, el intercalador y la topoisomerasa es letal para células en proliferación, por lo que se usan como antitumorales y antibacterianos. La actinomicina es un ejemplo de intercalador y su interacción con el ADN puede observarse en la Figura 4.10.

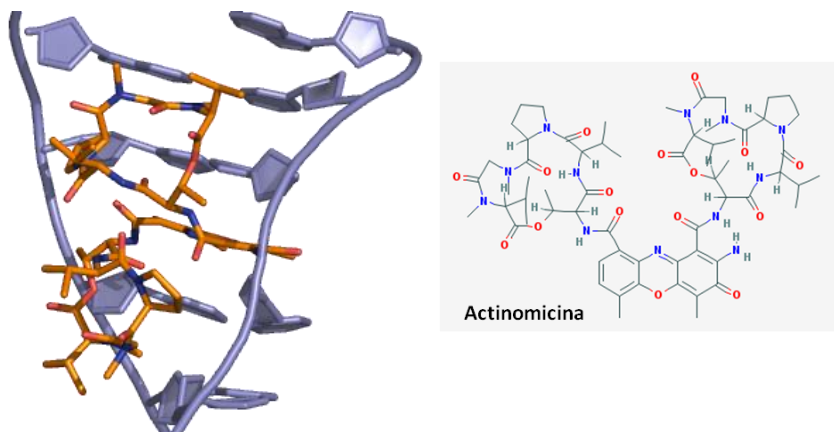


Figura 4.10. Estructura del complejo actinomicina (naranja) y ADN mediante intercalación [17]

- **Alquilantes:** Son compuestos altamente hidrofílicos que reaccionan con los grupos nucleófilos del ADN formando enlaces covalentes. Los productos resultantes son irreversibles e inhiben la transcripción y traducción. Los sitios más susceptibles son los sitios nucleofílicos y expuestos en los surcos de la doble hélice. Los diferentes tipos de alquiladores son: metasulfonatos, triazinas, nitrosoureas y compuestos de cisplatina [17]. Debido a que detienen los procesos celulares, se usan como anticancerígenos. En la Figura 4.11 puede observarse la unión de la cisplatina con el ADN.

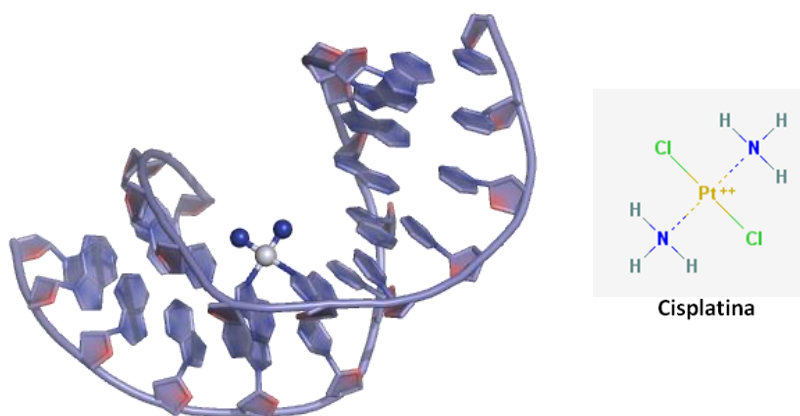


Figura 4.11. Estructura de la unión covalente de la cisplatina y el ADN por el interior de la cadena [17]

El enfoque de este trabajo estará centrado en el estudio de fármacos de unión al surco estrecho del ADN, específicamente compuestos difenilo bisimidazolinio.

4.3.1. Fármacos derivados de difenilo bisimidazolinio

Los fármacos del tipo difenilo bisimidazolinio son ligandos del ADN de unión al surco estrecho. Los compuestos más activos se unen de forma específica y muy fuerte a secuencias AT [18].

Este tipo de drogas presentan una potente actividad antiprotozoaria. Se usan para tratar enfermedades como la tripanosomiasis (específicamente la enfermedad del sueño) y la malaria. Los parásitos responsables de causar estas enfermedades, son *Trypanosoma brucei* (*gambiense* o *rhodesiense*) y *Plasmodium falciparum* respectivamente.

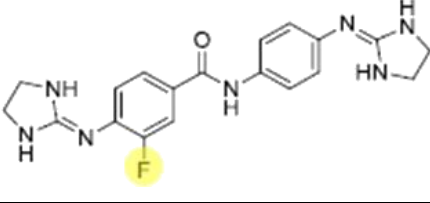
El género *Trypanosoma* pertenece a un grupo de protozoos denominados kinetoplastidos. Dichos parásitos, contienen una única mitocondria con un kinetoplasto. El kinetoplasto consiste en una red de ADN mitocondrial compuesta por miles de círculos de ADN topológicamente unidos en un arreglo en forma de disco plano. Esta red de ADN generalmente comprende dos tipos de ADN circular: un pequeño número de maxicírculos que codifican ARN ribosómico y proteínas mitocondriales y miles de minicírculos [19] [20] [21].

El ADN del kinetoplasto (kDNA) contiene numerosas secuencias AT, estrechamente espaciadas y escalonadas, que producen estructuras de doble hélice curva. Estas secuencias proveen un arreglo compacto de posibles dianas celulares para drogas que tienen unión específica a secuencias AT [19] [20] [21]. Por otro lado, *Plasmodium falciparum*, a pesar de no poseer kDNA, contiene un 80% de A-T en su genoma [22].

Los fármacos del tipo difenilo bisimidazolinio entran en las células parasitarias rápidamente y aparecen primero en el kinetoplasto. Este orgánulo se deteriora con el tiempo y desaparece de la mitocondria de las células tratadas. Esto ocurre debido a la actuación sobre las extensivas secuencias AT, induciendo cambios en los minicírculos, que causan una destrucción sinérgica de la red de ADN del kinetoplasto y la muerte celular [18].

En este trabajo se estudiará el fármaco del tipo difenilo bisimidazolinio denominado CRMV50 (Tabla 4.4) (derivado fluorado del fármaco FR60 y sintetizado por el Dr. C. Dardonville del Instituto de Química Médica en Madrid). Las secuencias de ADN escogidas para los ensayos de cristalización con el fármaco CRMV50 son ricas en AT.

Tabla 4.4. Características del fármaco derivado de difenilo bisimidazolinio CRMV50

CRMV50	
Estructura	
Masa molecular	609,5 Da
pKa¹	9,09 ± 0,10

¹ Medido por espectrofotometría de UV en agua (con 2 % v/v de DMSO) a 30 °C [23].

4.4. Fundamentos de cristalografía de rayos X

El diseño de fármacos se beneficia en gran medida del uso de la cristalografía, que nos permite obtener datos estructurales a nivel atómico. Los cristales, debido a la disposición regular de sus átomos, dispersan los rayos X sólo en algunas direcciones específicas. Mediante la determinación de estas direcciones y de la intensidad de los haces dispersados, se puede producir una imagen tridimensional de la estructura atómica del cristal [24]. Los conceptos necesarios para realizar ensayos de cristalografía se presentan a continuación.

4.4.1. Estructura cristalina

La materia puede clasificarse en tres estados: sólido, líquido y gaseoso. En el caso de los líquidos, la atracción entre las moléculas vecinas mantiene a las partículas casi en contacto, pero, gracias a la energía térmica, las partículas pueden salir del campo de atracción y fluir. Si se reduce el movimiento, las uniones entre las moléculas se vuelven más estables y se agrupan para formar un cuerpo rígido (al observarlo macroscópicamente). Las moléculas tienden a adoptar un patrón ordenado de baja energía conocido como estado cristalino [25].

Los materiales cristalinos contienen elementos constitutivos que se repiten de manera ordenada y paralela y cuya distribución en el espacio muestra ciertas relaciones de simetría. Así, la propiedad característica y definidora del medio cristalino es ser periódico. Es decir, a lo largo de cualquier dirección, y dependiendo de la dirección elegida, la materia que lo forma se halla a distancias repetitivas y orientada paralelamente. Las distancias repetitivas específicas son denominadas periodicidad traslacional [26].

Al estudiar la periodicidad traslacional en tres dimensiones, observando la geometría de la repetición en lugar del motivo que se repite, se obtiene la red cristalina. Esta red se puede

describir completamente por una secuencia periódica de puntos separados por intervalos a , b y c a lo largo de las tres direcciones. Una celdilla unitaria (Figura 4.12) es la unidad de volumen más pequeña que contiene toda la información estructural (la distribución de los átomos y del espacio que les rodea) y toda la información de simetría (planos, deslizamientos, ejes, centros de inversión) del cristal y que reproduce a éste por traslación repetida en las direcciones y longitudes de las aristas de la celda. Su tamaño viene determinado por la longitud de sus tres aristas (vectores a , b , c), y la forma queda definida por el valor de los ángulos entre dichas aristas (α , β , γ) [25] [26].

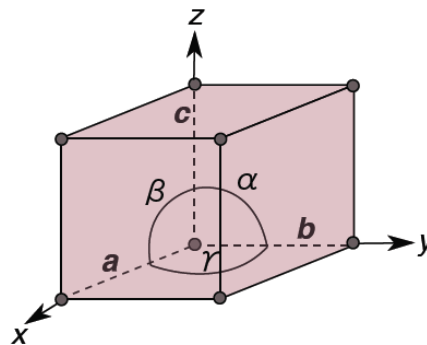


Figura 4.12 Celdilla unitaria [27]

Existen dos tipos de celdilla unitaria: primitiva y no primitiva. La celdilla primitiva contiene un solo punto de la red cristalina, formado por los puntos de la red en cada una de sus esquinas. Las celdillas no primitivas contienen puntos de la red cristalina adicionales, ya sea en una cara de la celdilla unitaria o dentro de ella, por lo que tienen más de un punto de la red por celdilla. En la Figura 4.13 se puede observar la comparación entre una celdilla primitiva y una no primitiva.

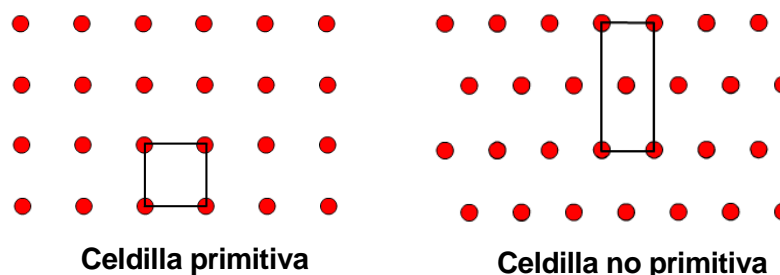
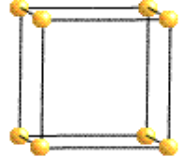
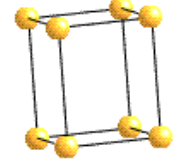
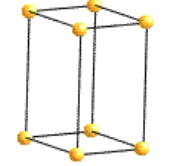
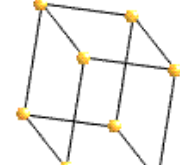
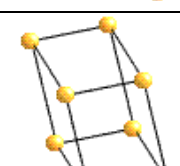
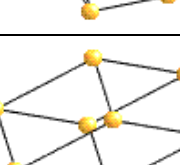
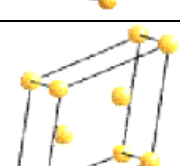


Figura 4.13. Celdilla unitaria primitiva y no primitiva [28]

El motivo que se repite en el cristal, es decir, el contenido de la celda unitaria, se denomina unidad asimétrica y representa la unidad de volumen que contiene toda la información estructural y que, por aplicación de las operaciones de simetría, puede reproducir la celdilla unitaria [27].

Los sistemas cristalinos son resultados de la presencia de constricciones impuestas por la simetría rotacional del cristal en la forma de la celdilla unitaria que se escoja para describir la estructura. Para que una celdilla unitaria por repetición pueda formar una red cristalina debe pertenecer a uno de los siguientes sistemas cristalinos, mostrados en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Características de la celdilla unitaria en los sistemas cristalinos [28]

Sistema	Longitudes	Ángulos	Forma
Cúbico	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	
Tetragonal	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	
Ortorrómbico	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	
Monoclínico	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \gamma = 90^\circ ; \beta \neq 90^\circ$	
Triclínico	$a \neq b \neq c$	$\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$	
Hexagonal	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = 90^\circ ; \gamma = 120^\circ$	
Trigonal / Romboédrica	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$	

Es importante destacar que cuando la red cristalina se forma por repetición de la celdilla unitaria, los bloques no quedan alienados perfectamente uno con otro y forman un mosaico. La mosaicidad hace referencia al grado de desorden interno del cristal, es decir, al grado de divergencia existente en la orientación de los bloques.

Existen 14 combinaciones únicas de los 7 sistemas cristalinos con los posibles tipos de redes primitivas y no primitivas denominadas redes de Bravais (Figura 4.14). En consecuencia, unas redes tienen los puntos reticulares ubicados en los vértices y otras tienen los puntos ubicados además en otras posiciones de la celdilla unitaria.

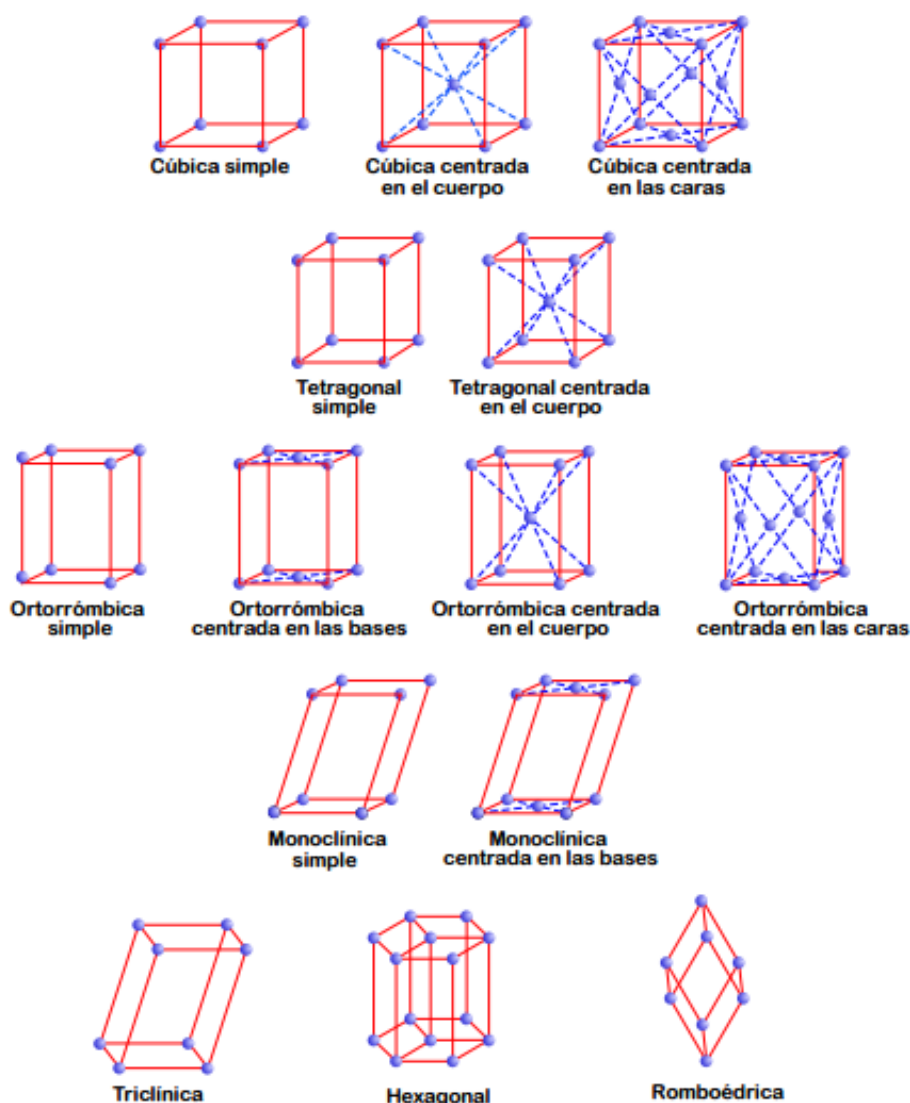


Figura 4.14. Redes de Bravais [27]

El grupo espacial es el conjunto de operaciones de simetría geométrica que se han de aplicar a la unidad asimétrica para generar la celda unitaria. De los 230 grupos espaciales

que existen, las macromoléculas sólo pueden tener 65 grupos, debido a que no generan enantiomería, es decir, no tienen planos de simetría ni centros de inversión.

Las operaciones de simetría que pueden aplicarse son: traslación, rotación, reflexión, centros de simetría y ejes de inversión (combinación de rotación y operaciones de simetría). Sólo existen 32 combinaciones permitidas de operaciones de simetría y se conocen como grupo puntual o de simetría.

La red de Bravais de un grupo espacial viene determinada por el sistema cristalino junto con la letra inicial de su nombre, la cual para los grupos no romboédricos es P, I, F o C que corresponden a primitiva, centrado en el cuerpo (dos puntos reticulares), centrado en las caras (cuatro puntos reticulares), o centrado en una cara (dos puntos reticulares). También se indican traslaciones dentro de la red en forma de hélices y planos de desplazamiento para completar la nomenclatura del grupo especial. Los grupos espaciales, organizados por sistema cristalino para macromoléculas, se muestran en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6. Grupos espaciales de macromoléculas

Sistema cristalino	Grupo espacial
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 2 ₁ , P3 ₁ 12, P3 ₂ 2 ₁ , 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, R3, R3 ₂

4.4.2. Difracción de rayos X

Los rayos X son un tipo de radiación electromagnética con longitudes de onda entre 0,1 Å y 100 Å, medida similar a las distancias interatómicas del cristal. Por este hecho, las estructuras de los cristales difractan este tipo de radiación.

La difracción de rayos X se utiliza para identificar fases por comparación con estructuras conocidas, orientación y parámetros estructurales (grupo espacial, coordenadas atómicas y

parámetros de la celdilla) [28].

Cuando los rayos X inciden sobre una muestra, éstos pueden ser transmitidos (con lo que continúan con su dirección original) o pueden ser difractados por los electrones de los átomos presentes en el material. El ángulo formado entre el rayo incidente y el rayo difractado es igual a 2θ , siendo θ el ángulo entre el rayo incidente y el conjunto de los planos sobre el que incide. Cuando dos rayos X incidentes son paralelos y la diferencia de longitud de camino es un número entero de longitudes de onda, forman una fuente de difracción coherente (en fase) a partir de dos planos adyacentes, denominada interferencia constructiva. Al ocurrir esto, las intensidades de las ondas se suman y forman una onda de mayor amplitud que puede ser capturada por un detector de rayos X. El fenómeno descrito puede explicarse por la ley de Bragg, cuya geometría está representada en la Figura 4.15.

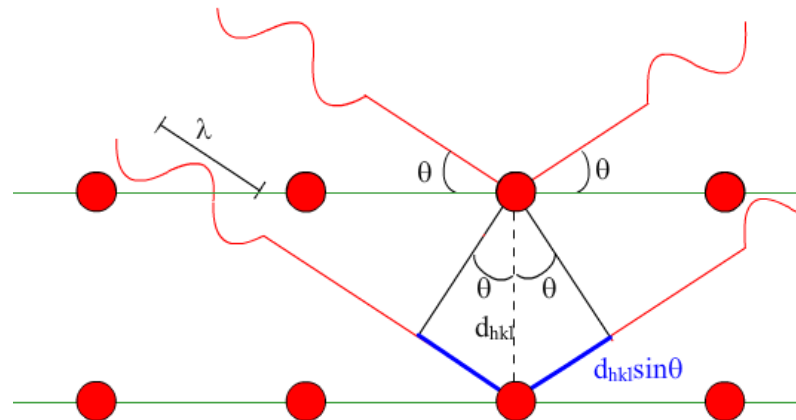


Figura 4.15. Ley de Bragg [28]

De acuerdo a la posición de los planos puede lograrse interferencia constructiva y obtener ondas detectables, por lo que resulta de gran utilidad al estudiar estructuras ordenadas como son los cristales.

La versión cristalográfica de la Ley de Bragg puede observarse en la Ecuación 4.1.

$$n \cdot \lambda = 2d \cdot \sin \theta \quad (\text{Ecuación 4.1})$$

donde:

n = número entero

λ = longitud de onda

d = distancia entre planos de difracción

θ = ángulo de difracción

Si no se cumplen las condiciones descritas para la ley de Bragg, las ondas resultantes de la difracción estarán desfasadas. Esto ocasiona la cancelación de las ondas difractadas, lo que se denomina interferencia destructiva.

Las familias de planos cristalográficos descritas en la ley de Bragg deben ser adecuadamente identificadas y para ello se usa un sistema de tres números enteros denotados con las letras h , k y l . Los índices de un sistema de planos idénticos y equidistantes se denominan índices de Miller [25] y se definen como los recíprocos de las intersecciones que el plano determina con los ejes (x , y , z) del sistema cristalino definido. Son números negativos (para indicar que el número es negativo se le coloca una barra encima) o positivos y primos entre sí. Se observan ejemplos de planos cristalográficos con sus respectivos índices de Miller en la Figura 4.16.

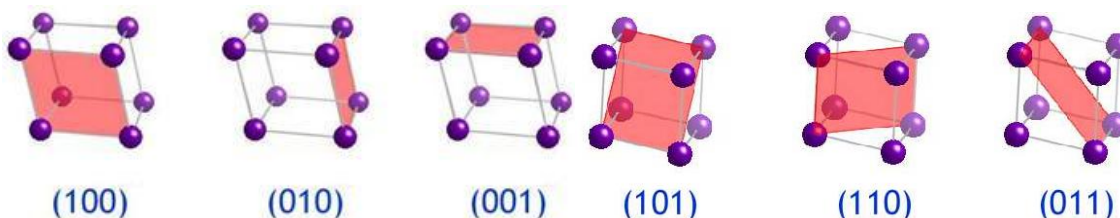


Figura 4.16. Ejemplos de planos cristalográficos con sus respectivos índices de Miller [28]

Para simplificar la representación gráfica de los experimentos de difracción se puede transformar cada familia de planos que obedecen la ley de Bragg en un punto único. Si se construyen vectores desde un origen arbitrario perpendicular a cada familia de planos, con longitudes equivalentes al recíproco de la distancia entre planos (d) de cada familia, se genera una nueva red en el espacio con dimensiones lineales del recíproco de la longitud. Las coordenadas de este espacio recíproco son h , k y l [29].

La red cristalina real y su red recíproca están relacionadas mediante una transformada de Fourier. Su utilidad es notable a partir de una representación gráfica de la ley de Bragg denominada esfera de Ewald. Ésta ilustra todas las posibles direcciones en que los rayos X pueden ser reflejados por el cristal.

En esta construcción, el rayo incidente entra por la izquierda y pasa a través del cristal, origen del espacio real. Una esfera cuyo radio es el recíproco de λ se construye desde este origen y el origen del espacio recíproco se toma con la intersección de la esfera con el rayo que atraviesa el cristal. La esfera de Ewald y la red recíproca se ilustran en la Figura 4.17.

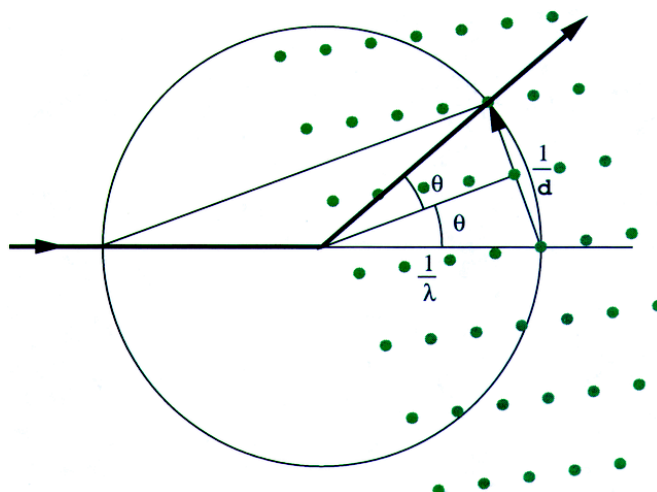


Figura 4.17. Red recíproca y Esfera de Ewald [29]

Si un punto de la red recíproca de coordenadas (h, k, l) se encuentra sobre la superficie de la esfera de Ewald, los planos de Miller con índices (h, k, l) darán lugar a un punto de difracción en la dirección definida por el centro de la esfera y ese punto de la red recíproca.

5.1. Expresión de la proteína NHP6A

La obtención de la proteína NHP6A se realizó a partir de la técnica del ADN recombinante. Esta técnica consiste en introducir el gen seleccionado en el interior de un vector (plásmido) y éste, a su vez, dentro de una célula. Al dividirse, las nuevas células formadas contienen el gen de interés. Aprovechando la maquinaria celular, el gen se expresa, sintetizándose así la proteína codificada en el gen.

5.1.1. Producción de ADN plasmídico

El ADN plasmídico de partida fue cedido por el Profesor Reid Johnson del *Department of Biological chemistry* de la *University of California*. El plásmido recibido lleva el nombre de pRJ1228 y contiene el gen que codifica la proteína NHP6A (gen diana) bajo la acción del promotor T7. El gen de la NHP6A fue obtenido por el método de reacción en cadena de la polimerasa a partir del ADN de *Saccharomyces cerevisiae* al que se le construyeron sitios de restricción para las enzimas NdeI y BamHI en los extremos 5' y 3' respectivamente. Los productos de la reacción fueron digeridos mediante estas enzimas y ligados en el plásmido pET-11a (Novagen), que puede verse en la Figura 5.2 [13].

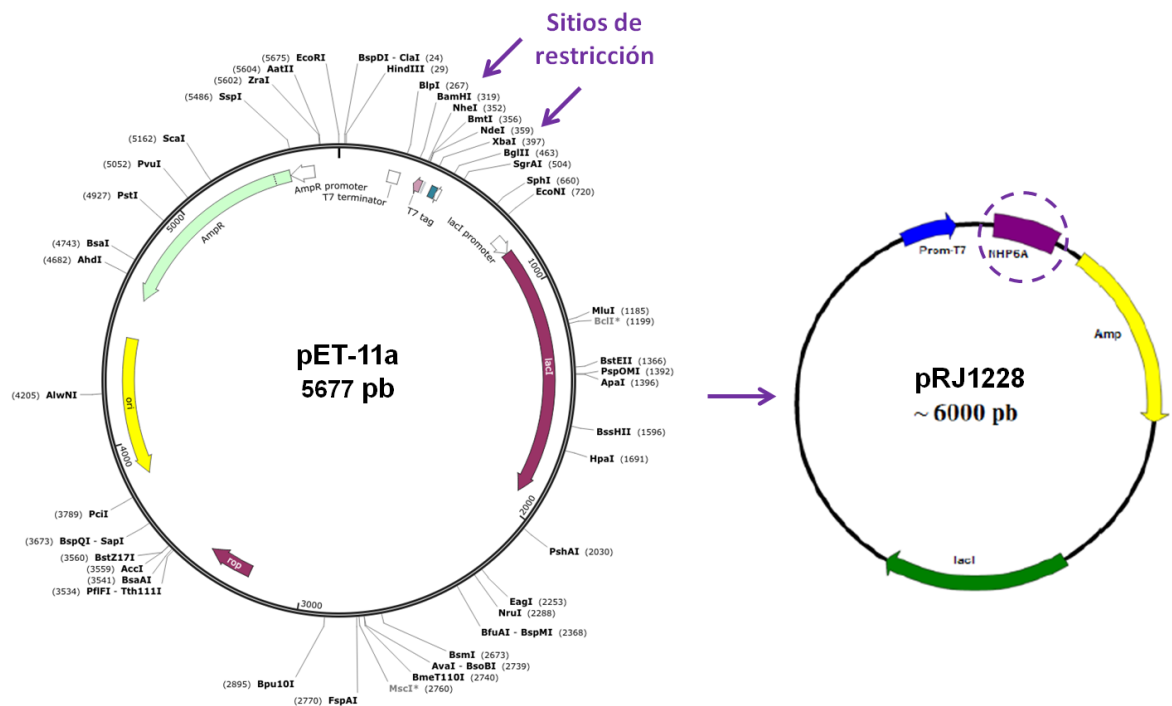


Figura 5.2. Mapa del plásmido pET-11a y esquema del plásmido pRJ1228 [30] [43]

Para producir el ADN plasmídico se partió de un cultivo de células competentes de la cepa

XL1-Blue de *Escherichia coli* a las que se le introdujo el plásmido pRJ1228 y se siguió el protocolo indicado en el *Illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare) para la rápida extracción y purificación de ADN plasmídico a partir de cultivos de *E. coli* a pequeña escala (“miniprep”). El procedimiento se basa en una lisis celular alcalina modificada, una membrana de sílice a la que se une el plásmido por la acción de sales caotrópicas y la elución por medio de un buffer de baja fuerza iónica [31].

La Figura 5.3 muestra el esquema general del procedimiento seguido.



Figura 5.3. Esquema del protocolo del *Illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit* (Adaptada de [31])

En nuestro caso se partió de 8 ml de cultivo, repartidos en dos *plasmidPrep Mini Spin* a realizar en paralelo, y, para obtener un stock concentrado, se realizó la elución con 50 μ l de buffer (ver información detallada en el Anexo A).

5.1.2. Célula anfitriona

Una vez se tiene a disposición el ADN plasmídico, se debe escoger la célula en la que se llevará a cabo la expresión de la proteína de interés, denominada célula anfitriona (*host*). El plásmido pRJ1228 contiene un marcador de selección, resistencia a la ampicilina, lo que permite identificar y seleccionar únicamente las células que hayan logrado incorporar el plásmido. La resistencia a la ampicilina viene dada por el gen Amp^R del pET-11a (Figura 5.2). Para poder utilizar este marcador de selección, las células usadas tienen que ser sensibles al antibiótico ampicilina.

La célula escogida, después de varios ensayos que se discutirán en el apartado 6.1.1, fue la cepa BL21(DE3)pLysS de la bacteria *Escherichia coli*, resistente al cloranfenicol (Cm) pero sensible a la ampicilina (Amp).

Como se ha explicado, el plásmido usado deriva de un plásmido pET. El sistema pET se basa en el control del promotor T7. El gen diana está clonado en el plásmido y su expresión

es inducida por la presencia de ARN polimerasa T7 en la célula anfitriona. Esta enzima es muy selectiva y activa, logrando que casi todos los recursos de la célula se dediquen a la expresión del gen diana. La expresión se induce por medio de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) [32].

En particular, las células pLysS proveen un control más estricto, ya que codifican la lisozima T7. Esta enzima actúa como un inhibidor natural de la ARN polimerasa T7, por lo que reduce su habilidad de transcribir genes diana en ausencia del inductor [32].

5.1.3. Transformación, paso a medio líquido e inducción de la expresión

La transformación consiste en la introducción del plásmido en la célula competente (capaz de incorporar el plásmido y mantenerlo estable durante la replicación), llevando a cabo un proceso químico o físico. Una vez transformadas, las células pasan a medio líquido donde crecen y, por último, se induce la expresión de la proteína de interés. Todos los procesos se realizan en condiciones que minimicen la contaminación por agentes externos, utilizando materiales estériles y procurando mantenerse en todo momento al lado de la llama.

El protocolo realizado para la transformación, paso a medio líquido e inducción de la expresión se presenta a continuación.

5.1.3.1. Transformación

- Preparar 2 litros de medio LB (Luria-Bertani), disolviendo en agua mQ (Milli-Q[®]): 20 g de triptona, 10 g de extracto de levadura y 20 g de cloruro de sodio. Esterilizar utilizando autoclave (30 minutos a 121 °C).
- Descongelar en hielo las células competentes de la cepa BL21(DE3)pLysS de *Escherichia coli*.
- Preparar dos tubos Eppendorf (1,5 ml) estériles y etiquetar uno como el control (-) y el otro como transformación (+). Añadir 100 μ l de células competentes a cada tubo.
- Agregar 1 μ l de una miniprep de plásmido pRJ1228 que codifica la proteína NHP6A al tubo identificado como transformación (+).
- Colocar los tubos en hielo durante 20 minutos.
- Realizar un choque térmico a las células colocando los tubos en un baño a 37 °C durante 5 minutos.
- Dejar a los tubos 2 minutos en hielo.
- Agregar 1 ml de medio LB a temperatura ambiente a cada uno de los tubos.

- Incubar durante 1 hora en un baño a 37 °C. Este tiempo les servirá a las células de período de recuperación ante los cambios de temperatura previos que facilitaron la incorporación del plásmido.
- Atemperar dos placas de agar (15 g por litro de LB) conteniendo medio LB, Amp en concentración de 50 µg/ml (resistencia del plásmido) y Cm en concentración de 34 µg/ml (resistencia de la cepa). Identificar una como el control (-) y la otra como transformación (+).
- Centrifugar a 1000 g durante 2 minutos para concentrar las células en el fondo del tubo y sembrar un volumen menor.
- Eliminar sobrenadante hasta dejar aproximadamente 100-200 µl y resuspender el sedimento con ayuda de una micropipeta.
- Sembrar las células sobre las placas usando el asa de siembra (espátula de Drigalsky) y procurando cubrir toda la superficie. Dejar reposar durante unos minutos para garantizar la absorción.
- Invertir las placas y colocarlas en la estufa a 37 °C o/n (*overnight* – hasta el día siguiente).

5.1.3.2. Paso a medio líquido

- Observar la placa de control (-) y verificar que no haya crecido ninguna colonia de bacterias. Las células de control, o no transformadas, no poseen el plásmido con el gen de resistencia a la ampicilina por lo que no deberían crecer en la placa.
- Picar dos colonias de las células transformadas (+), cada una sobre un tubo conteniendo 3 ml de medio LB, 3 µl de Amp a 50 mg/ml (para dar una concentración de 50 µg/ml) y 3 µl de Cm a 34 mg/ml (para dar una concentración de 34 µg/ml). Si se quisiera partir de un stock congelado de células transformadas en glicerol, se debe rascar la superficie con un asa de siembra y colocarlas dentro del tubo descrito.
- Incubar en agitación (250 rpm) y a 37 °C durante 5-6 horas. Al final de este período debe notarse turbidez en los tubos.
- Pasar los 3 ml de cultivo (del tubo con el mejor resultado) a un Erlenmeyer de 500 ml que contenga 150 ml de medio LB, 150 µl de Amp a 50 mg/ml (para dar una concentración de 50 µg/ml) y 150 µl de Cm a 34 mg/ml (para dar una concentración de 34 µg/ml).
- Incubar en agitación (250 rpm) y a 37 °C o/n.

5.1.3.3. Inducción de la expresión

- Atemperar 2 litros de medio LB en un baño a 37 °C y pasar cada litro de medio LB a un Erlenmeyer de 3 litros de capacidad. Agregar 1 ml de Amp a 50 mg/ml y 1 ml de Cm a 34 mg/ml a cada Erlenmeyer.
- Agregar un volumen de cultivo tal que la DO_{600} (densidad óptica/absorbancia medida a 600 nm) sea 0,1 - 0,2. Esto impide que el nuevo medio se sature. Leer DO_{600} en el espectrofotómetro.
- Incubar en agitación (250 rpm) y a 37 °C hasta alcanzar una DO_{600} de 0,6. Esto ocurre aproximadamente en menos de 2 horas (considerando a modo de referencia que durante la primera media no hay crecimiento y luego cada media hora ocurre una replicación). Leer DO_{600} en el espectrofotómetro. Tomar un control electroforético de 100 μ l.
- Inducir la expresión con IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) 1 mM (agregando 1 ml de IPTG 1 M a cada litro de cultivo).
- Incubar en agitación (250 rpm) y a 37 °C durante 3 horas. Leer DO_{600} en el espectrofotómetro. Tomar un control electroforético de 100 μ l.
- Centrifugar a 5000 g (5400 rpm en un rotor SLA-3000 SS34) durante 10 minutos para recuperar las bacterias en el sedimento. Eliminar sobrenadante.
- Congelar el sedimento bacteriano usando nitrógeno líquido y almacenar a -80 °C en un tubo Falcon.

Tratamiento de los controles electroforéticos: cada alícuota separada como control electroforético se centrifugará a 1000 g durante 5 minutos. El sobrenadante se eliminará y el sedimento se resuspenderá usando 40 μ l de TMSDS (tampón de muestra para electroforesis SDS-PAGE). Cada alícuota se almacenará a -20 °C. Normalmente, se cargan 10 μ l de cada muestra en un gel de 10 pocillos y 1,5 mm de grosor.

5.1.4. Tratamiento del sedimento bacteriano

La proteína NHP6A, al igual que la mayoría de las proteínas recombinantes, es un producto intracelular. Esto indica que para obtenerla se debe realizar la ruptura de las células que la contienen. Adicionalmente, debe separarse de los restos de la célula y otros productos de la bacteria para obtener un extracto enriquecido que facilite su purificación.

5.1.4.1. Ruptura celular

La ruptura celular se puede realizar mediante métodos mecánicos, que implican la disrupción de la membrana, y mediante métodos químicos o fisicoquímicos, que desestabilizan la membrana. Entre los métodos mecánicos, se encuentra el uso del sonicador que produce vibraciones ultrasónicas, promoviendo la formación de burbujas, cuyo colapso rompe las células.

El protocolo seguido se presenta a continuación.

- Pasar el sedimento bacteriano congelado a 2 tubos Falcon siliconados.
- Resuspender utilizando 50 ml de tampón de procesado (25 ml de tampón por cada litro de cultivo). El tampón de procesado contiene: 50 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM DTT y media pastilla de inhibidor de proteasas (*Complete protease inhibitor tablets* de Roche) a pH 8,0. El proceso debe hacerse pipeteando en hielo.
- Sonicar el sedimento resuspendido durante 8 ciclos de 30 segundos, al 45 % de potencia máxima del equipo (Bandelin SONOPULS HD2200 – **Figura 5.4**). El proceso debe hacerse en hielo para evitar que la sonicación aumente la temperatura de la muestra.



Figura 5.4. Sonicador Bandelin SONOPULS HD2200 [33]

- Centrifugar a 12000 rpm (en un rotor SLA-3000 SS34) a 4 °C durante 45 minutos. Descartar sedimento (compuesto de restos celulares) y tomar un control electroforético del sobrenadante (25 μ l + 25 μ l de TMSDS 2x [2 veces concentrado]). El sobrenadante se identificará como extracto inicial (EI).

5.1.4.2. Fraccionamiento del extracto inicial

Después de la sonicación y centrifugación realizada se obtiene una solución de la proteína NHP6A acompañada de muchas otras proteínas bacterianas. Una de las formas más comunes de separar algunas de ellas es por diferencias de solubilidad, fraccionando diferentes subpoblaciones de proteína (por ejemplo, precipitando selectivamente mediante la adición de sales o con el cambio de pH). Algunos de los métodos más usados son la precipitación por la adición de sulfato amónico y el fraccionamiento con TCA (ácido tricloroacético).

La precipitación por la adición de sulfato amónico se basa en los fenómenos de *salting in* y *salting out*. A baja concentración, la solubilidad de una proteína aumenta con la adición de sales, siendo el anión sulfato el de mayor efecto sobre dicha solubilidad, lo que se conoce como *salting in*. A medida que se agrega más sal, la solubilidad de la proteína disminuye, lo que se conoce como *salting out*. De esta forma, el método de separación de sulfato amónico consiste en agregarlo justo por debajo del punto de precipitación de la proteína de interés y separar por centrifugación proteínas contaminantes. Ensayos de precipitación con sulfato amónico se pueden encontrar en el apartado 6.1.2.

Un método ampliamente utilizado para el fraccionamiento de proteínas es la adición de ácido tricloroacético (TCA) a bajas concentraciones. Durante este trabajo, éste ha sido el método elegido para obtener un extracto enriquecido en NHP6A (apartado 6.1.2).

El mecanismo molecular por el que el TCA induce la precipitación de proteínas no es bien conocido. Se ha propuesto que el proceso ocurre debido a cambios conformacionales en la proteína por la naturaleza acídica del TCA o por la remoción de la capa de agua que rodea a la proteína [42]. A concentraciones hasta el 5%, la cantidad de proteína precipitada aumenta con la concentración de ácido usada. El máximo de precipitación de proteína se obtiene en el rango entre 5-45%; a concentraciones mayores al 45% ocurre un súbito descenso de la cantidad de proteína precipitada, dejando de precipitar casi por completo a concentraciones mayores al 60%.

Yen, Wong y Johnson [44] realizan una primera precipitación al 2% de TCA para eliminar proteínas contaminantes y una segunda precipitación al 10% de TCA para recuperar la proteína NHP6A (reportan que no se desnaturaliza y conserva su actividad al ser precipitada). En el caso de este estudio, se trabajó con una concentración del 2% para

retirar proteínas contaminantes en el precipitado y recuperar la proteína NHP6A en el sobrenadante (sin precipitarla a modo de precaución).

El protocolo seguido se muestra a continuación:

- Medir exactamente el volumen del EI obtenido.
- Pasar el EI a un Erlenmeyer de 100 ml.
- Agregar TCA 100% hasta alcanzar un 2% de concentración en la solución.
- Dejar 30 minutos en hielo.
- Centrifugar a 12000 rpm a 4 °C durante 30 minutos, repartiendo la solución en dos tubos.
- Reservar el sobrenadante. Redisolver el sedimento con 5 ml de buffer de equilibrado (5 ml por tubo). El buffer de equilibrado contiene: 100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM DTT a pH 7,9.

Nota: Seguido de la precipitación con TCA, se espera encontrar la proteína en el sobrenadante. Sin embargo, se trata el sobrenadante y el sedimento, hasta que se pueda verificar si se ha logrado separar la proteína adecuadamente.

5.1.4.3. Diálisis

Luego de la adición de TCA como precipitante, la proteína se encuentra en medio ácido, por lo que es conveniente neutralizar rápidamente para minimizar el riesgo de desnaturalización. Esto se realiza mediante un proceso de diálisis frente al buffer (ver siguiente página) requerido para iniciar la purificación de la proteína.

La diálisis es un fenómeno que permite que las moléculas grandes (como la proteína NHP6A) y las moléculas pequeñas (las sales y proteínas de baja masa molecular) de una disolución puedan separarse por difusión selectiva a través de una membrana semipermeable. Como consecuencia, se puede cambiar la composición de la solución en la que se encuentra la proteína.

De esta manera, el proceso de diálisis prepara a la proteína, colocándola en una disolución adecuada para comenzar la purificación. El esquema general del proceso de diálisis se muestra en la Figura 5.5.

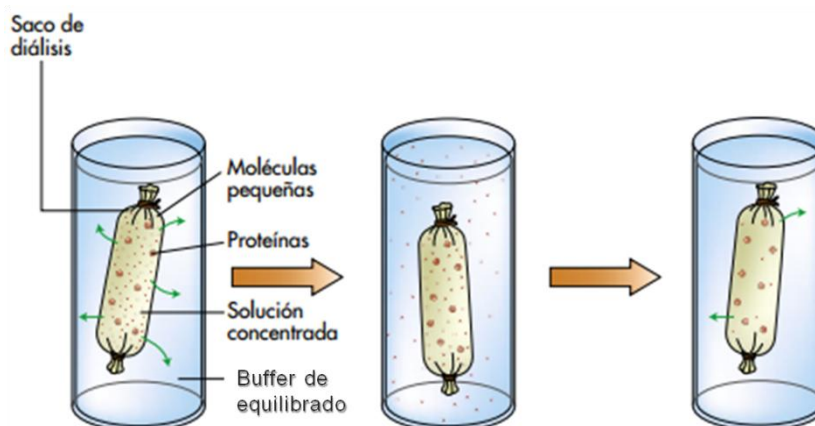


Figura 5.5. Esquema del proceso de diálisis [34]

Las moléculas más pequeñas que el MWCO de la membrana salen hacia la solución de buffer de equilibrado. La renovación de solución de diálisis permite aumentar el gradiente de concentración y que el proceso avance más rápidamente.

El protocolo seguido se presenta a continuación:

- Hidratar dos membranas de celulosa regenerada Spectra/Por® de 3500 MWCO (*molecular weight cut-off*) en un vaso de precipitados conteniendo agua mQ, durante media hora. El tamaño de cada sección de membrana debe calcularse considerando el valor de volumen por cm de cada membrana y agregando 4 cm adicionales para colocar las pinzas.
- Colocar una pinza en uno de los extremos de cada bolsa de diálisis, asegurándose de que se encuentra firme.
- Colocar el sobrenadante proveniente de la precipitación con TCA en una bolsa de diálisis y el sedimento resuspendido de dicha precipitación en la otra bolsa.
- Cerrar cada bolsa de diálisis con una pinza, de modo que la superficie de la bolsa quede tensa.
- Sumergir las bolsas de diálisis en un vaso de precipitados conteniendo 2 litros de buffer de equilibrado (100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM DTT a pH 7,88), durante 4 horas.
- Transferir las bolsas de diálisis a otro vaso conteniendo 4 litros de buffer de equilibrado y mantenerlas de esta forma o/n.
- Transferir las bolsas de diálisis a un vaso de precipitados conteniendo 1 litro de buffer de equilibrado, durante 3-4 horas.
- Tomar 24 µl como control electroforético de cada bolsa y almacenar las soluciones dializadas a -20 °C.

Una vez finalizada la diálisis, si el contenido de las bolsas presentara material no disuelto (ND), debe centrifugarse a 12000 rpm (a 4 °C) durante 10 minutos, previo al almacenamiento.

Tratamiento de los controles electroforéticos: cada alícuota separada como control electroforético se mezclará con 8 µl de TMSDS 4x (4 veces concentrado) y se almacenará a -20 °C.

5.2. Purificación de la proteína NHP6A

Después del proceso de diálisis, se tiene una mezcla de proteínas producidas por la bacteria, entre las cuales se encuentra la NHP6A, que puede separarse de acuerdo a sus propiedades. Para ello, se realizó una secuencia de cromatografías.

La cromatografía es una técnica de purificación de proteínas que permite separarlas en función de sus propiedades físico-químicas. Este proceso ocurre en una columna empacada con una matriz (fase estacionaria) por la cual se hace pasar una solución en la que se encuentra la proteína (fase móvil). Las proteínas se separan de acuerdo a diferentes tipos de uniones entre la fase móvil y la fase estacionaria, consecuencia del tipo de matriz usada. Estas uniones hacen que las proteínas se desplacen a diferentes velocidades por la fase estacionaria. Por último, las proteínas unidas a la matriz son eluidas mediante una solución de las mismas características que la fase móvil o mediante una solución modificada.

En la purificación de la proteína NHP6A se utilizó la cromatografía de intercambio iónico y exclusión molecular. De esta forma, la proteína se separa en base a su carga y a su tamaño, respectivamente.

5.2.1. Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico se basa en la afinidad de los iones en solución por los sitios de polaridad opuesta que se encuentran en la fase estacionaria. De esta forma, separa a las moléculas en base a las cargas netas de sus superficies [35].

La carga neta de una proteína viene dada por el tipo de aminoácidos que tiene en su superficie y por el ambiente químico en el que se encuentra. Así, la separación de diferentes sustancias se lleva a cabo porque éstas tienen diferentes grados interacción con el intercambiador iónico debido a diferencias en sus cargas, densidades de carga y

distribuciones de carga en su superficie. Estas interacciones pueden ser controladas variando condiciones como la fuerza iónica y el pH [35].

De acuerdo al grupo cargado que contenga la matriz del intercambiador se diferencian dos tipos de cromatografía: intercambio aniónico (matriz con grupos funcionales positivos) e intercambio catiónico (matriz con grupos funcionales negativos (Figura 5.6)). La proteína NHP6A tiene una carga neta positiva por lo que se utiliza una cromatografía de intercambio catiónico.

Los grupos cargados de la matriz se asocian a contraiones móviles. Estos contraiones pueden intercambiarse reversiblemente a otros iones de la misma carga sin alterar la matriz.

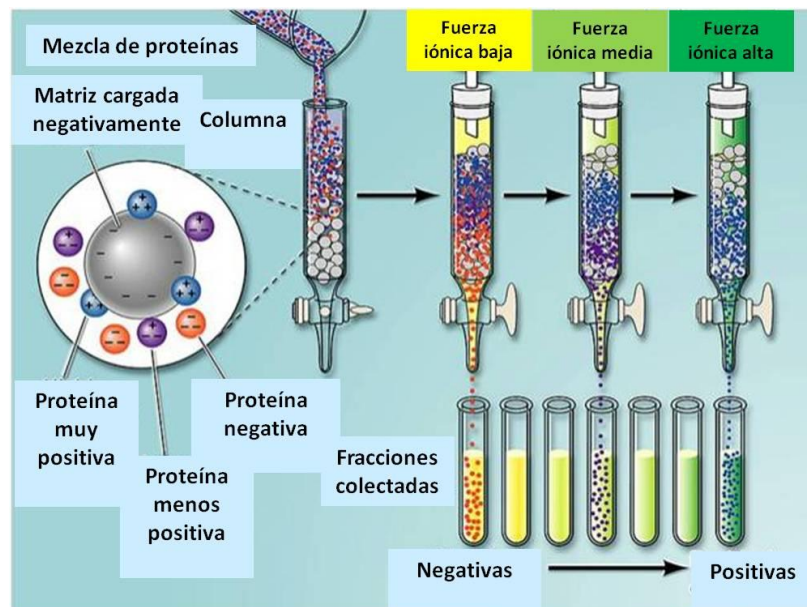


Figura 5.6. Esquema del proceso de cromatografía de intercambio catiónico [36]

Al iniciar la cromatografía, los grupos de la fase estacionaria están unidos a contraiones. Al cargar la muestra, las proteínas cargadas positivamente desplazan a los contraiones y se unen reversiblemente a la columna. Al comenzar a eluir a condiciones de fuerza iónica baja, se colectan fracciones de moléculas negativas que no se unieron a la columna. Al aumentar la fuerza iónica, se recogen fracciones de las proteínas positivas con uniones débiles a la columna; y por último, se recogen fracciones de las proteínas positivas con uniones fuertes a la columna.

Las cromatografías de intercambio iónico se llevan a cabo en 5 etapas generales [35]:

1. **Equilibrado:** el intercambiador iónico se encuentra en las condiciones apropiadas de pH y fuerza iónica, lo que permitirá la unión de las moléculas de soluto. En este

estado inicial, los grupos que se intercambiarán están asociados con sus respectivos contraiones.

2. Carga de la muestra y adsorción: las moléculas del soluto llevan a cabo el apropiado desplazamiento de carga de los contraiones y se unen reversiblemente al gel. Las sustancias que no se unen son eluidas del intercambiador usando el buffer inicial de equilibrado.
3. Desorción de la muestra: las condiciones de elución cambian, al desfavorecer la formación del enlace iónico de las moléculas de la muestra y el intercambiador. Esto normalmente se logra aumentando la fuerza iónica del buffer de elución o cambiando su pH.
4. Remoción de sustancias no eluidas.
5. Re-equilibrado: se regresa a las condiciones iniciales para la siguiente purificación.

Se utilizó una columna HiTrap SP FF de GE Healthcare, de 5 ml de resina (Figura 5.7). Esta columna contiene como matriz sefarosa con el grupo sulfopropil (SP) como intercambiador catiónico fuerte.

La cromatografía de intercambio catiónico usada para purificar la proteína NHP6A se realizó en un equipo FPLC (*fast protein liquid chromatography*) ÄKTA Purifier 10 de GE Healthcare (Figura 5.7). Este equipo permite la ejecución y monitorización automática de todas las etapas de la cromatografía.

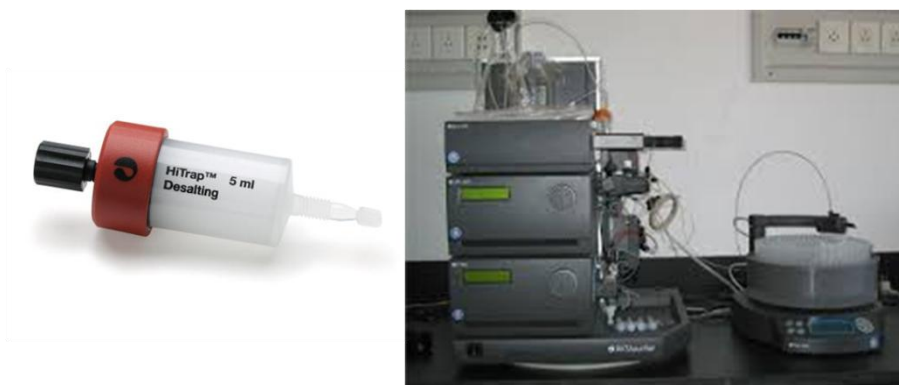


Figura 5.7. Columna HiTrap SP FF (izquierda) y FPLC ÄKTA Purifier 10 (derecha) de GE Healthcare [37]

Las soluciones utilizadas fueron las siguientes:

- Buffer de equilibrado: 100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM DTT a pH 7,9.
- Buffer de elución: 1 M NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM DTT a pH 7,9.

- Etanol 20%.

Nota: todas las soluciones se filtraron (0,22 μ m) y se desgasificaron antes de usar para evitar la entrada de aire o partículas al equipo.

El protocolo seguido se muestra a continuación:

Preparación del equipo

- Realizar un prelavado con etanol 20% durante 5 minutos.
- Conectar *loop* de 10 ml (depende del volumen de muestra a tratar) y lavar manualmente con 4 volúmenes de etanol 20% (40 ml).
- Con bajo flujo de etanol, conectar la columna HiTrap SP FF.
- Lavar la columna con 2 volúmenes de etanol 20% (10 ml).
- Lavar los tubos del equipo haciendo pasar 4 volúmenes de agua (20 ml).
- Encebar los tubos del equipo con el buffer correspondiente utilizando la herramienta *Pump Wash Basic*.
- Lavar la columna con un volumen de buffer de equilibrado.
- Lavar la columna con 5 volúmenes de buffer de elución.

Equilibrado

- Equilibrar con 10 volúmenes de buffer de equilibrado.
- Lavar el *loop* manualmente con 3 volúmenes de buffer de equilibrado.

Preparación y carga de la muestra

- Descongelar la muestra en hielo.
- Centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos y colocar sobrenadante en un vaso de precipitados de 20 ml. Tomar ND y 10 μ l de sobrenadante como controles electroforéticos. El sobrenadante será denominado MDP (muestra de partida).
- Inyectar la MDP en el *loop*, con ayuda de una jeringa de 10 ml, mientras se hace pasar buffer de equilibrado por la columna.
- Cargar (*load*) muestra a la columna, haciendo pasar 20 ml de buffer equilibrado por el *loop* y hacia la columna.

Ejecución del programa

- Programar la lectura de absorbancia a 220 nm (enlace peptídico), 260 nm (ADN contaminante) y 280 nm (grupos aromáticos de las proteínas). El cromatograma obtenido permitirá detectar la elución de la proteína de interés.
- Poner en funcionamiento la recolección de muestras, programando al equipo para tomar fracciones de 2 ml.
- Ejecutar un gradiente continuo de 90 ml desde 100 mM de NaCl (buffer de equilibrado) hasta 1 M de NaCl (buffer de elución).
- Hacer pasar un volumen de buffer de elución.
- Observar en el cromatograma las fracciones correspondientes al pico de absorbancia a 280 nm y colocarlas en hielo (debidamente identificados). En ellos debe encontrarse la proteína NHP6A. Tomar 5 μ l de cada uno como control electroforético.

Re-equilibrado

- Si se desea volver a utilizar la columna, lavar los tubos del equipo con 10 volúmenes de buffer de equilibrado.

Lavado final

- Lavar la columna con 5 volúmenes de agua mQ.
- Lavar la columna con 10 volúmenes de etanol 20% y almacenarla en frío.
- Lavar manualmente el *loop* con 40 ml volúmenes de agua mQ seguidos de 40 ml de etanol 20%.

Tratamiento de los controles electroforéticos: la muestra de ND se resuspenderá con 30 μ l de agua mQ. De esta solución se tomarán 5 μ l y se añadirán 5 μ l de TMSDS 2x (2 veces concentrado); y el resto se almacenará a -20 °C.

La MDP se mezclará con 10 μ l de TMSDS 2x.

Los controles de fracciones se mezclarán con 5 μ l de TMSDS 2x.

5.2.2. Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel se basa en la habilidad de materiales de porosidad controlada para separar los componentes de una mezcla de

acuerdo al tamaño de las moléculas [35].

La capacidad separadora reside en el gel, cuya matriz consta de un gran número de esferas porosas microscópicas. Estas esferas están constituidas por largas cadenas de polímeros unidas entre sí por enlaces químicos para formar una red tridimensional [38].

En el interior de una columna de cromatografía pueden distinguirse varios volúmenes (Figura 5.8): El volumen total, que es el volumen que ocupa el cilindro de gel hidratado; el volumen de vacío, o el volumen existente entre las esferas del gel; y el volumen ocupado por las esferas del gel, que se expresa como la diferencia entre los dos volúmenes anteriores.

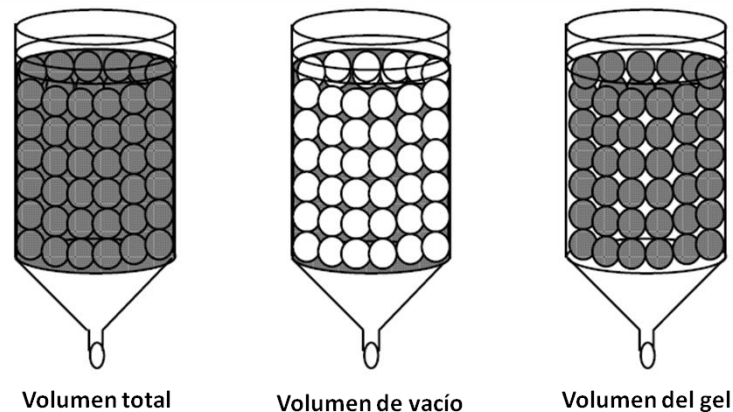


Figura 5.8. Volúmenes de una columna cromatográfica de exclusión molecular [38]

Cuando una mezcla de moléculas de diferentes tamaños se hace pasar a través de la columna de gel, las moléculas de tamaño muy pequeño penetran en el interior de las esferas que componen el gel y no son extraídas de la columna hasta que no ha pasado a través de ella un volumen de líquido igual a su volumen total. Sin embargo, aquellas moléculas cuyo tamaño es mayor que el de los poros de las esferas del gel, no pueden penetrar en su interior y atraviesan la columna recorriendo únicamente el volumen vacío, siendo las primeras en salir de la columna. El resto de las moléculas, de tamaño intermedio, presentan una mayor o menor facilidad para difundir al interior de las esferas en función de su tamaño, siendo extraídas de forma fraccional con volúmenes que están comprendidos entre el volumen total y el de vacío [38]. Este proceso se observa en la Figura 5.9.

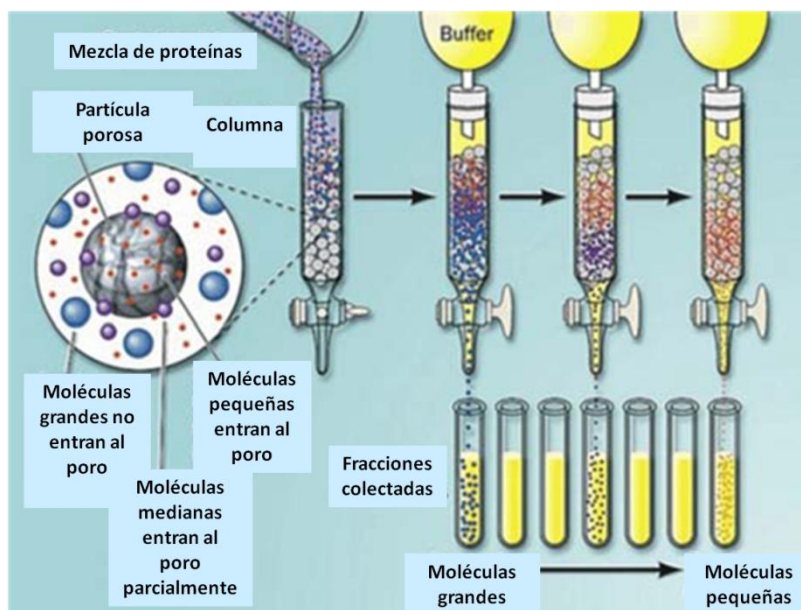


Figura 5.9. Esquema del proceso de cromatografía de exclusión molecular [36]

Cuanto mayor es una molécula, menor capacidad tiene para acceder al interior de las esferas del gel y, por tanto, menor es el volumen de líquido que se requiere para extraerla de la columna. Teniendo en cuenta que para las proteínas globulares el tamaño está, en general, relacionado con la masa molecular, esta cromatografía separa las sustancias en función de dichas masas moleculares, obteniéndose primero las mayores [38].

La resolución de la cromatografía depende de la longitud de la columna, del flujo de elución, del volumen de muestra a tratar y del empaquetado del gel de la columna. Las mejores resoluciones se obtendrán a grandes longitudes de columna, bajos flujos de elución, volúmenes de muestra menores al 5% del volumen total y empaquetamiento homogéneo de la columna.

Se utilizó una columna HiLoad Superdex 75 10/300 GL de GE Healthcare, con 24 ml de columna ya empaquetada (Figura 5.10). La matriz contiene agarosa y dextrano entrecruzado. Esta columna se recomienda para purificar proteínas con un rango de masa molecular de 3000 a 70000 Da. La proteína NHP6A, con una masa molecular de 10802,3 Da, puede ser separada mediante esta columna cromatográfica. Sin embargo, se debe cargar un volumen de muestra menor a 500 μ l y una concentración de proteína en la muestra inferior a 10 mg, por lo que requerirá una etapa previa de concentración de la MDP.

La cromatografía de exclusión molecular se realizó en un equipo FPLC (*fast protein liquid chromatography*) ÄKTA Purifier 10 de GE Healthcare (Figura 5.7).



Figura 5.10. Columna HiLoad Superdex 75 10/300 GL de GE Healthcare [37]

Las soluciones utilizadas fueron las siguientes:

- Buffer Superdex 200 (150 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1 mM DTT a pH 7,4). Se utilizará una única solución para el equilibrado de la columna y la elución.
- Etanol 20%.

Nota: todas las soluciones se filtraron (0,22 μ m) y se desgasificaron antes de usar para evitar la entrada de aire o partículas al equipo.

El protocolo seguido se muestra a continuación:

Preparación del equipo

- Lavar los tubos del equipo con agua mQ usando la herramienta *Pump Wash Basic*.
- Conectar *loop* de 500 μ l y lavar manualmente con 5 ml de agua mQ
- Con bajo flujo de etanol, conectar la columna HiLoad Superdex 75 10/300 GL.
- Lavar los tubos del equipo haciendo pasar 4 volúmenes de agua (48 ml).
- Encebar los tubos del equipo con buffer Superdex 200 usando la herramienta *Pump Wash Basic*.

Equilibrado

- Equilibrar con dos volúmenes de buffer Superdex 200.
- Lavar manualmente el *loop* con 5 ml buffer Superdex 200.

Preparación y carga de la muestra

- La MDP debe concentrarse hasta un volumen y contenido de proteína adecuado para ser cargado en la columna HiLoad Superdex 75 10/300 GL (menor a 500 μ l y

10 mg de proteína, respectivamente). El procedimiento realizado se puede encontrar en el apartado 5.2.3.

- Colocar la MDP concentrada en un tubo eppendorf de 1,5 ml. Tomar 7,5 µl para control electroforético.
- Inyectar la MDP en el *loop*, con ayuda de una jeringa Hamilton de 1 ml, mientras se hace pasar buffer de equilibrado por la columna.
- Cargar (*load*) la muestra a la columna, haciendo pasar 2 ml de buffer equilibrado por el *loop* y hacia la columna.

Ejecución del programa

- Programar la lectura de absorbancia a 220 nm (enlace peptídico), 260 nm (ADN contaminante) y 280 nm (grupos aromáticos de las proteínas). El cromatograma obtenido permitirá detectar la elución de la proteína de interés.
- Poner en funcionamiento la recolección de muestras, programando al equipo para tomar fracciones de 0,5 ml (colectadas en tubos eppendorf).
- Hacer pasar un volumen de buffer de elución (24 ml).
- Observar en el cromatograma las fracciones correspondientes al pico de absorbancia a 280 nm y colocarlas en hielo (debidamente identificados). En ellos debe encontrarse la proteína NHP6A. Tomar 7,5 µl de cada uno como control electroforético.

Re-equilibrado

- Si se desea volver a utilizar la columna, lavar los tubos del equipo con 2 volúmenes de buffer Superdex 200.

Lavado final

- Lavar el equipo y la columna con 2 volúmenes de agua mQ seguidos de 2 volúmenes de etanol 20%.
- Lavar manualmente el *loop* con 5 ml de agua mQ seguidos de 5 ml de etanol 20%.

Tratamiento de los controles electroforéticos: La MDP y las fracciones se mezclarán con 2,5 µl de TMSDS 4x.

5.2.3. Concentración y diálisis de la proteína NHP6A

La concentración de una proteína tiene como objetivos disminuir el volumen de muestra a tratar y aumentar la concentración de la misma.

El proceso se lleva a cabo en dispositivos llamados concentradores, donde se realiza la concentración mediante ultrafiltración. Éstos están compuestos por un compartimiento superior, que contiene la muestra, y un compartimiento inferior, separado por una membrana semipermeable del MWCO apropiado. Al centrifugar, el solvente pasa a través de la membrana, dejando la muestra más concentrada en el compartimiento superior. El tipo de concentradores utilizados tienen dos membranas verticales idénticas, agilizando la concentración y minimizando la obstrucción, y pueden ser utilizados en una centrífuga de ángulo fijo.

Los concentradores utilizados en este estudio son los Vivaspin® (Figura 5.11A) y Amicon Ultra (Figura 5.11B). El tipo específico de concentrador utilizado se elige en función del volumen de muestra a procesar y a la masa molecular de la proteína. En el caso de la NHP6A, fue necesario trabajar con un Vivaspin® de 6 y 20 ml, así como con un concentrador Amicon Ultra-0,5 ml. En cuanto al MWCO, dado que la masa molecular de la NHP6A es 10802 Da se escogió trabajar con concentradores de 3000 Da.



Figura 5.11. Concentradores Vivaspin® y Amicon Ultra [37][39]

A: Concentradores Vivaspin® 6 (izquierda) y Vivaspin® 20 (derecha).

B: Concentrador Amicon Ultra-0,5 ml

Las especificaciones técnicas de los concentradores utilizados se presentan en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Especificaciones técnicas de los concentradores

Concentradores	Capacidad	MWCO	Máxima fuerza centrífuga*	Límite de volumen final
Vivaspin 6	6 ml	3000	10000 g	30 μ l
Vivaspin 20	20 ml		8000 g	50 μ l
Amicon Ultra – 0.5 ml	0,5 ml		15000 g	5 μ l

*Rotor de ángulo fijo

En este estudio se concentraron las siguientes muestras:

- MDP de la columna HiLoad Superdex 75 10/300 GL, para así cumplir con las restricciones de volumen máximo de carga de la misma.
- Fracciones que contienen la proteína NHP6A pura, provenientes de la última etapa de cromatografía.

Los concentradores permiten, además, realizar diálisis o diafiltración de la muestra. Durante este proceso se puede cambiar la solución en la que se encuentra la proteína, disminuyendo la cantidad de sales y moléculas contaminantes de masa molecular menor al MWCO del concentrador.

En este estudio se le realiza un proceso de diálisis a las muestras finales de proteína NHP6A concentrada, mediante tres lavados con buffer final (50 mM NaCl, 25 mM HEPES, 1 mM DTT a pH 7,4). La muestra dializada finalmente se puede concentrar hasta el volumen deseado.

El protocolo seguido para la concentración y diálisis de las muestras se detalla a continuación:

Hidratar la membrana del concentrador

- Agregar un volumen adecuado de agua mQ y centrifugar, por debajo de la velocidad máxima recomendada, el tiempo que sea necesario para que se filtre al menos la mitad del volumen cargado. En la Tabla 5.2 se pueden ver las condiciones recomendadas para cada concentrador.

Tabla 5.2. Condiciones de hidratación de los concentradores

Concentradores	MWCO	Volumen de agua mQ	Fuerza centrífuga	Tiempo
Vivaspin 6	3000	4 ml	9500 g	10 minutos
Vivaspin 20		10 ml	7500 g	15 minutos
Amicon Ultra-0,5 ml		0,5 ml	14322 g	10 minutos

- Descartar el agua contenida en el compartimiento inferior y superior.

Nota: en el caso de utilizar un concentrador previamente usado y almacenado, manteniendo las membranas hidratadas con agua mQ en ambos compartimientos, no es necesario volverlas a hidratar.

Acondicionar la membrana del concentrador

- Agregar un volumen adecuado de buffer de equilibrado (100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM DTT a pH 7,9).
- Centrifugar, por debajo de la velocidad máxima recomendada, el tiempo que sea necesario para que se filtre al menos la mitad del volumen cargado. Utilizar las mismas condiciones de operación recomendadas para la hidratación de la membrana (Tabla 5.2).
- Descartar el buffer contenido en el compartimiento de arriba y abajo.

Concentración de la muestra

- Poner la muestra a concentrar en el compartimiento superior del concentrador y centrifugar durante el tiempo que sea necesario para llegar al volumen deseado. Utilizar la misma fuerza centrífuga indicada en las etapas anteriores del protocolo de concentración.
- Recuperar el filtrado para posterior análisis.
- Recuperar la muestra concentrada: En el caso de los Vivaspin®, utilizar una micropipeta para extraer la muestra del compartimiento superior.
En el caso de los Amicon Ultra, debe voltearse el concentrador y usar un tubo nuevo para recoger la muestra concentrada. Centrifugar durante 2 minutos a 1000 g.

Diálisis de la muestra

- En un Vivaspin® de 6 ml, realizar tres lavados con buffer final (50 mM NaCl, 25 mM HEPES, 1 mM DTT a pH 7,4). Cada lavado será de 4 ml y se debe centrifugar a 9500 g hasta que el volumen del compartimiento superior sea menor a 1 ml. En cada lavado se debe recuperar el filtrado (hasta la verificación final).
- Concentrar hasta el volumen deseado, centrifugando a 9500 g por el tiempo que sea necesario. Recuperar el filtrado.
- Utilizar una micropipeta para extraer la muestra concentrada y dializada del compartimiento superior. Utilizar una pipeta de 100 µl para cuantificar el volumen de proteína obtenido.
- Alicuotar en tubos eppendorf y congelar con nitrógeno líquido. Almacenar a -80 °C.

5.2.4. Determinación de la concentración final de la proteína NHP6A

La concentración final de la proteína NHP6A se determinará mediante la ley de Beer-Lambert (Ecuación 5.1), que es una relación empírica que relaciona la absorción de luz con la concentración de la muestra analizada.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad \text{(Ecuación 5.1)}$$

donde:

A = absorbancia

ε = coeficiente de extinción molar a la longitud de onda del análisis [l/mol.cm]

c = concentración de la muestra [M]

l = longitud de la cubeta [cm]

De esta manera, mediante la medición de la absorbancia de las muestras finales y conociendo el coeficiente de extinción molar, se pueden estimar sus concentraciones. El coeficiente de extinción molar a 280 nm de la proteína NHP6A es 10810 l/mol.cm y el paso de cubeta utilizado es de 1 cm.

El protocolo seguido para la lectura de la absorbancia y el cálculo de la concentración se muestra a continuación:

- Ajustar la longitud de onda del espectrofotómetro a 280 nm (longitud de onda a la que absorben los grupos aromáticos de las proteínas).

- Utilizar como blanco 800 μl de la solución en la que se encuentra la proteína, en una cubeta de cuarzo. En el caso de las muestras finales, utilizar buffer final; y en el caso de muestras muy diluidas, usar agua mQ.

Muestras diluidas

- Lavar la cubeta con agua mQ.
- Agregar 800 μl de la muestra.
- Leer la absorbancia.
- Calcular la concentración mediante la ecuación de Beer-Lambert.

Muestras concentradas

- Agregar 1 μl de muestra en los 800 μl de buffer usado como blanco.
- Homogeneizar mediante la inversión de la cubeta alrededor de 10 veces.
- Leer la absorbancia.
- Agregar 1 μl de muestra adicional.
- Homogeneizar mediante la inversión de la cubeta alrededor de 10 veces.
- Leer la absorbancia.
- Calcular la concentración de las dos diluciones realizadas, mediante la ecuación de Beer-Lambert y obtener la media.

5.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE)

La electroforesis en gel es un método para la separación y análisis de macromoléculas biológicas de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica. Las moléculas migran bajo la acción de un campo eléctrico a través de un gel poroso, a una velocidad inversamente proporcional a sus tamaños [40]. En general, 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.

El campo eléctrico se aplica de forma que uno de los extremos del gel tenga una carga positiva y el otro extremo una carga negativa. Así, las moléculas cargadas negativamente migran del extremo negativo del gel al positivo, formando bandas a diferentes alturas (que representan moléculas de diferentes tamaños) [40].

Los elementos necesarios para realizar una electroforesis son: una fuente de alimentación,

que proporcione una diferencia de potencial, un gel de soporte, un tampón de electroforesis y una cubeta. El esquema de un montaje típico puede verse en la Figura 5.12.



Figura 5.12. Esquema de un montaje de electroforesis vertical [41]

Los geles de soporte están constituidos por polímeros que forman una malla, matriz o red tridimensional, a través de la cual deben avanzar las moléculas de la muestra, que queda embebida en el medio de soporte electroforético [41]. En este trabajo se utilizaron geles de poliacrilamida, resultado de la polimerización química de una mezcla de acrilamida y bisacrilamida. La acrilamida forma polímeros lineales y la bisacrilamida introduce uniones cruzadas entre cadenas de acrilamida. Esta reacción está catalizada por PSA (persulfato amónico), que inicia la polimerización mediante la generación de radicales libres, y TEMED (1,2-bis(dimetilamino)etano), que cataliza la polimerización.

En el análisis de mezclas de moléculas cargadas negativamente, como el ADN y el ARN, éstas son atraídas hacia el extremo positivo del gel. Sin embargo, las proteínas no poseen necesariamente una carga negativa. Para conferir carga negativa a las proteínas, se mezclan el detergente SDS (*sodium dodecyl sulfate* - dodecil sulfato de sodio). Este tratamiento despliega (desnaturaliza) a las proteínas y las cubre con una carga negativa neta proporcional a su masa. De este modo, las distintas proteínas migrarán hacia el extremo positivo del gel con una movilidad que depende primordialmente de su masa molecular [40].

Para mejorar la resolución del gel, obteniendo bandas más compactas, se emplea la electroforesis discontinua. En esta clase de electroforesis, en el gel existen dos partes que se preparan por separado:

- Gel acumulador o concentrador (*stacking gel*): se encuentra en la parte superior y

tiene como efecto concentrar o apilar la muestra en una banda estrecha. Esto se ve favorecido por la menor concentración de acrilamida que posee, ofreciendo menor resistencia al paso de moléculas [41].

- Gel separador (resolving gel): ocupa la mayor parte del gel, presenta un mayor porcentaje de acrilamida y en él tiene lugar la separación de los componentes en función de su masa molecular [41].

En este estudio se utilizaron geles de poliacrilamida SDS para verificar la presencia y grado de pureza de la proteína NHP6A, tanto después de la expresión por la bacteria como después de cada etapa de purificación.

El protocolo seguido se muestra a continuación:

Preparación de las muestras

- Agregar a cada muestra TMSDS (Tabla 5.3), en la proporción adecuada. El glicerol le da densidad a la muestra, el β -mercaptoetanol reduce puentes disulfuro de la proteína y el colorante azul de bromofenol permite observar el avance del frente de migración.

Tabla 5.3. Tampón de muestras para SDS-PAGE 4x

Reactivo	Cantidad (10 ml)
Tris 2 M pH 6,8	1,25 ml
Glicerol	4 ml
SDS	0,8 g
β -mercaptoetanol	2 ml
Agua mQ	Hasta 10 ml
Azul de bromofenol	Punta de espátula

- Colocar las muestras en agua hirviendo durante 5 minutos. La temperatura favorece la desnaturalización de la proteína y facilita que el SDS la recubra de cargas negativas.

Preparación del montaje

- Limpiar dos placas de vidrio con etanol y secar. Estas placas servirán para preparar el molde donde se polimerizará el gel.
- Rodear la placa de esquinas redondeadas con una goma, cubriendo sus laterales y parte inferior. Colocar dos separadores de 1,5 mm (para obtener geles de 1,5 mm de

grosor).

- Posicionar la otra placa de vidrio encima y sostener con tres pinzas (dos en los laterales y una en la parte inferior).
- Comprobar que no existen pérdidas agregando agua entre las placas. Secar con cuidado, usando papel de filtro.
- Preparar el *resolving gel* (15% acrilamida, 0,4% bisacrilamida, 0,375 M Tris, 0,1% SDS) (Tabla 5.4) en un tubo Falcon de 15 ml y mezclar suavemente por inversión varias veces. Verterlo entre las dos placas hasta alcanzar aproximadamente 0,5 cm por debajo del nivel que alcanzará el peine (ver siguiente página).

Tabla 5.4. Composición de geles de poliacrilamida SDS (10 cm x 15 cm x 1,5 mm)

Reactivos	<i>Resolving gel</i> (10 ml)	<i>Stacking gel</i> (3 ml)
Solución A (30% acrilamida, 0,8% bisacrilamida)	5 ml	0,6 ml
Solución B (1,5 M Tris-HCl pH 8,8)	2,5 ml	-
Solución C (10% SDS)	100 μ l	30 μ l
Solución D (0,5 M Tris-HCl pH 6,8)	-	0,75 ml
Agua mQ	2,35 ml	1,59 ml
PSA 10%	75 μ l	30 μ l
TEMED*	4,5 μ l	3 μ l

* Agregar TEMED al final.

- Agregar unas gotas de isopropanol por encima del *resolving gel* para obtener una interfaz recta y evitar contacto con el oxígeno.
- Una vez que el *resolving gel* polimerice, retirar el isopropanol, lavar con agua tres veces y secar con papel de filtro.
- Preparar el *stacking gel* (6% acrilamida, 0,16% bisacrilamida, 0,125 M Tris, 0,1% SDS) (Tabla 5.4) en un tubo Falcon de 15 ml y mezclar suavemente por inversión varias veces. Verterlo entre las dos placas y colocar rápidamente un peine de 1,5 mm de grosor.
- Llenar la parte inferior de la cubeta de electroforesis con tampón de cubeta (TSDS) 1x preparado a partir de un stock 5x (Tabla 5.5).

Tabla 5.5. Tampón de cubeta gel SDS-PAGE 5x

Reactivo	Cantidad (2 litros)
Glicina	288 g
Tris	60 g
SDS	10 g
Agua mQ	Hasta 2 litros

* 2 litros de TSDS 1x: 400 ml de TSDS 5x + 1600 ml de agua mQ

- Una vez polimerizado el *stacking gel*, retirar las pinzas y la goma. Colocar el montaje en la cubeta de electroforesis (procurando no formar burbujas en la parte inferior) y fijar con dos pinzas.
- Llenar la parte superior con suficiente tampón de cubeta 1x para cubrir los pozos. Retirar el peine de forma recta, cuidando de no dañar los pozos.
- Con ayuda de una pipeta Pasteur, lavar los pozos con el tampón de cubeta.
- Cargar las muestras en los pozos usando una jeringa Hamilton, lavada con agua mQ entre cada carga.
- Conectar los electrodos y aplicar un voltaje entre 100-130 V.
- Finalizar la electroforesis cuando el marcador de avance (azul de bromofenol) se encuentra a 0,5-1 cm del fondo del gel. Apagar la fuente de alimentación.

Detección de las bandas de proteínas: teñido y desteñido del gel

- Retirar el gel de la cubeta y despegar las placas de vidrio del molde.
- Colocar el gel en un recipiente con solución teñidora (Tabla 5.6) y mantener en agitación durante una hora. Esta solución permitirá fijar las proteínas al gel y teñirlas para que puedan ser visualizadas.

Tabla 5.6. Soluciones teñidora y desteñidora de SDS-PAGE

Reactivos	Solución teñidora (1 litro)	Solución desteñidora (2 litros)
Azul de Coomassie (G-250)	2,5 g	-
Isopropanol	250 ml	200 ml
Ácido acético	100 ml	200 ml
Agua mQ	Hasta 1 litro	Hasta 2 litros

- Retirar el gel de la solución teñidora y colocar en un recipiente con solución desteñidora (Tabla 5.6). Mantener en agitación o/n. Esto retirará el exceso de colorante no unido a las proteínas. Renovar la solución desteñidora si es necesario.
- Una vez el gel sea transparente y las bandas azules de proteína se aprecien

claramente, se debe fotografiar el gel. Para ello se utiliza el equipo Gel-Doc XR de Bio-Rad, con un transiluminador de luz visible.

Conservación del gel

- Colocar una placa rectangular de metacrilato o vidrio para que sirva de soporte.
- Humedecer un rectángulo de papel celofán sumergiéndolo en un recipiente con agua corriente y colocarlo sobre el soporte (evitando burbujas y arrugas).
- Colocar el gel sobre el soporte con el papel celofán húmedo.
- Colocar agua corriente alrededor del gel y entre sus pozos.
- Humedecer otro rectángulo de papel celofán sumergiéndolo en un recipiente con agua corriente y colocarlo sobre el gel (evitando burbujas y arrugas).
- Colocar pinzas por los cuatro lados para sostener el montaje.
- Secar al menos cuatro días a temperatura ambiente.

5.4. Ensayos cristalográficos

La cristalografía es el principal método de análisis estructural de proteínas y otras macromoléculas orgánicas. Para llevar a cabo ensayos cristalográficos se requiere la obtención de un cristal de alta calidad y su posterior difracción. El proceso seguido para la realización de ensayos cristalográficos se presenta en los siguientes apartados.

5.4.1. Obtención de cristales

En los métodos más comunes de obtención de cristales de proteína, la proteína purificada se disuelve en una solución acuosa que contiene un precipitante (por ejemplo, sulfato de amonio o polietilenglicol) a una concentración menor a la necesaria para que precipite la proteína. Luego, mediante evaporación controlada, se remueve agua para aumentar las concentraciones de proteína y precipitante, resultando en la precipitación de la proteína. Cuando la precipitación ocurre de forma lenta, las probabilidades de obtener cristales grandes es más alta, mientras que procesos rápidos de precipitación ocasionan la aparición de muchos cristales pequeños o sólidos amorfos [45].

La precipitación ocurre cuando la combinación de la concentración de la proteína y el precipitante excede ciertos valores límite. La formación de cristales ocurre en dos etapas: nucleación y crecimiento. La nucleación, formación inicial de agrupaciones moleculares a partir de las cuales crecen los cristales, requiere concentraciones de proteína y precipitante

más altas que las necesarias para la precipitación lenta (Figura 5.13a, región azul). Adicionalmente, si las condiciones de nucleación persisten, se generan numerosos núcleos y, como consecuencia, aparecen muchos cristales pequeños o precipitado amorfo [45].

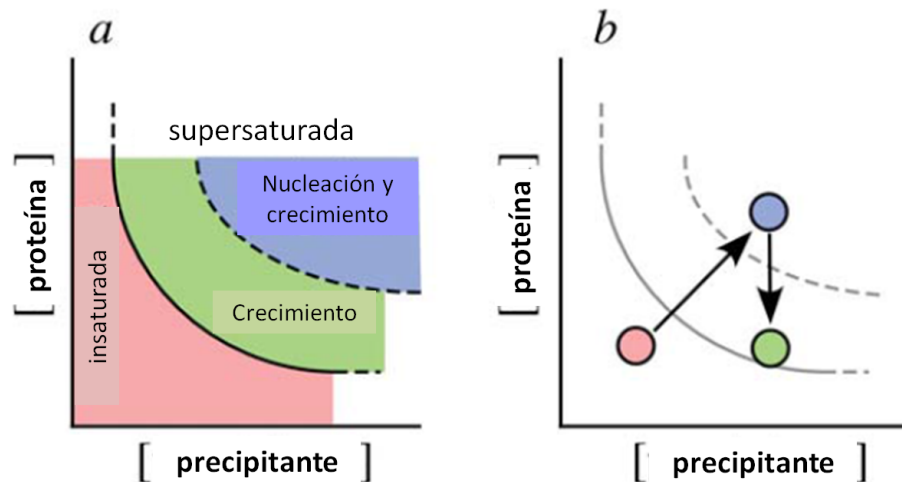


Figura 5.13. Diagrama de fases de cristalización por medio de un precipitante [45]

a: La región roja representa las concentraciones de proteína y precipitante (precip) en las que la solución no está saturada con proteína, por lo que no ocurre nucleación o crecimiento. Las regiones verde y azul representan las zonas inestables supersaturadas con proteína. Las condiciones en la región azul promueven la nucleación y el crecimiento, mientras que las condiciones de la región verde promueven sólo el crecimiento de cristales.

b: Estrategia ideal para la obtención de cristales.

Una estrategia ideal (Figura 5.13b) sería empezar con las condiciones correspondientes a la región azul del diagrama de fase y moverse a la región verde cuando aparezcan los núcleos. De esta forma, los cristales crecerían y no ocurriría nucleación adicional. Sin embargo, para poder encontrar las condiciones que favorecen la cristalización de una proteína, se requiere de múltiples ensayos previos [45].

En este trabajo, se ha perseguido la cristalización de complejos de proteína-ADN, así como de fármaco-ADN

5.4.1.1. Condiciones de cristalización

Los dos parámetros más importantes para realizar con éxito un ensayo cristalográfico son la cantidad y calidad de la muestra que se quiere estudiar. La utilización de muestras de baja pureza resultará en cristales de baja calidad, pudiendo ocurrir lo mismo con muestras de alta pureza si las condiciones de cristalización no son las adecuadas [45].

Existen numerosas variables involucradas en la formación de cristales de macromoléculas. Los parámetros de mayor impacto son:

- Pureza de la muestra (proteína/fármaco y el ADN): las impurezas dificultan el crecimiento de los cristales y aportan irregularidades, por lo que deben utilizarse muestras de alta pureza.
- Concentración de la muestra: se requiere que la proteína/fármaco y el ADN se encuentren en altas concentraciones para llegar a la sobresaturación y obtener cristales.
- Naturaleza y concentración del precipitante.
- Fuerza iónica.
- pH.
- Temperatura.

Sin embargo, parámetros como la limpieza del área de trabajo, presencia de vibraciones y sonido, la fuente y la antigüedad de la muestra de proteína y la presencia de ligandos, tienen también un impacto sobre la obtención de cristales [45].

5.4.1.2. Método de cristalización por difusión de vapor

La difusión de vapor es una de las técnicas más comúnmente usadas para realizar ensayos de cristalización. En esta técnica se permite que una solución de proteína y precipitante se equilibre, en un recipiente cerrado, con un volumen mayor de solución acuosa de precipitante (en concentración óptima para la formación de cristales). El tipo de difusión de vapor utilizado en este estudio es el método de la gota colgante.

En el método de la gota colgante (Figura 5.14), se mezcla proteína purificada (o el fármaco de interés) con el ADN y con solución de cristalización con menor concentración que la necesaria para la cristalización del complejo. Esta solución se suspende como una gota en la parte interna de la tapa de una cápsula, que se coloca sobre la base con reservorio y se cierra [45].

Debido a que el precipitante es el mayor soluto presente, la difusión de vapor (evaporación y condensación) en este sistema cerrado resulta en la transferencia neta de agua desde la solución de complejo (proteína/fármaco y ADN) en la gota hacia el reservorio. Esto ocurre hasta que las concentraciones de precipitantes son iguales en ambas soluciones. Dado que el reservorio tiene un volumen mucho mayor que la solución de complejo, la concentración

final de precipitante en la gota es aproximadamente igual a la del reservorio [45].

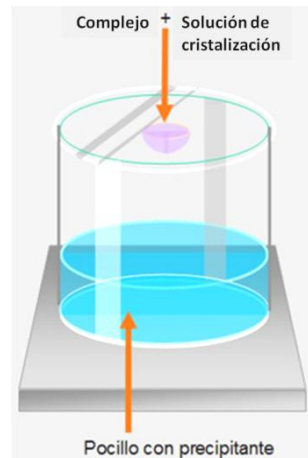


Figura 5.14. Esquema de un pocillo de cristalización con el método de la gota colgante [46]

En este momento, la reducción en el volumen de la gota ha aumentado las concentraciones de complejo y precipitante hasta llegar a la región de nucleación del diagrama de fases (Figura 5.13). La concentración de precipitante en la solución de complejo se mantendrá estable debido al equilibrio de presiones de vapor. Cuando se empiezan a formar los núcleos, la concentración de proteína disminuye y las condiciones de la gota se mueven hacia la región de crecimiento del diagrama de fases (Figura 5.13) [45].

El protocolo seguido en los ensayos de cristalización por difusión de vapor en gota colgante se muestra a continuación:

- Preparar el complejo en la cantidad y concentración adecuada para el ensayo que se va a realizar. Para ello se mezcló el ADN, proteína o fármaco y cacodilato de sodio (NaCac). En caso de trabajar con proteína, incubar o/n en hielo (cámara fría a 4 °C). Si se trabaja con fármaco, incubar en hielo durante al menos 3 horas (en una cámara fría a 4 °C). El tiempo de incubación favorece que el complejo se forme.
- De acuerdo a si se requiere preparar una gota de volumen final 3 o 4 μl , colocar 1 o 2 μl respectivamente, de solución de cristalización en la parte interior de la tapa de la cápsula. Las soluciones de cristalización empleadas contienen sales, precipitantes y buffers a diferentes valores de pH (Anexo B.1 y Anexo B.2).
- Sobre la gota de solución de cristalización, añadir 2 μl de complejo.
- Agregar 800 μl de solución precipitante en la base de la cápsula (pozo). Inicialmente se empezará con concentraciones bajas de precipitante (20-30%) y se irán aumentando progresivamente.

- Cerrar la cápsula y observar gota en un microscopio de luz polarizada.
- Mantener las cápsulas a temperatura controlada. En el caso de fármacos, almacenar a 13 °C, y en el caso de proteínas, a 4 °C. Debido a que los oligonucleótidos empleados son ricos en secuencias AT, son especialmente sensibles a la temperatura y se degradan fácilmente por encima de 20 °C.
- Revisar periódicamente el avance de las gotas en un microscopio con luz polarizada. De acuerdo a su evolución, modificar la concentración del precipitante del pozo como sigue:
 - o Precipitados amorfos: disminuir la concentración de precipitante del pozo.
 - o Gota clara: aumentar concentración de precipitante del pozo (3-4%).
 - o Núcleos: aumentar lentamente la concentración de precipitante del pozo (1%).
 - o Cristales: comprobar tamaño, uniformidad, geometría y birrefringencia.

5.4.2. Captura de un monocristal

Una vez se ha obtenido un cristal de tamaño apropiado, uniforme, de geometría bien definida y alta birrefringencia, se pasa a su captura para su posterior análisis por difracción de rayos X.

El cristal se debe extraer de la gota en la que se formó usando un *cryo-pin* (Figura 5.15). Este instrumento está compuesto por un *loop* muy delgado, unido a un microtubo y sujeto a una base magnética. El *loop* se usa para capturar el cristal y se sumerge en nitrógeno líquido inmediatamente. Seguidamente, se introduce en un *cryo-vial* lleno de nitrógeno líquido y el conjunto se almacena en nitrógeno líquido.

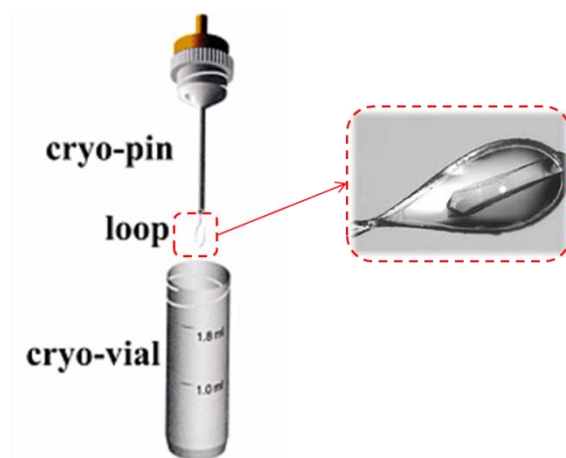


Figura 5.15. Instrumentos para la captura de cristales [47] [48]

Para prevenir el daño de cristales de complejo debido a la formación de cristales de hielo, se deben agregar crioprotectores. En el caso de este estudio, los agentes precipitantes utilizados actúan como crioprotectores a altas concentraciones. En el momento de la captura de los cristales, la concentración de precipitante en la gota es alta por lo que no se requiere realizar ningún procedimiento adicional [45].

5.4.3. Difracción de rayos X de cristales

La difracción de rayos X de los cristales capturados provee información valiosa que puede llevar a la determinación de los parámetros estructurales del complejo estudiado.

Los rayos X que más interesan en el campo de la cristalografía son aquellos que disponen de una longitud de onda alrededor de 1 Å, pues ese valor es muy próximo a las distancias entre los átomos, pudiendo interactuar con éstos y dar información sobre los mismos. Este tipo de radiación se produce en laboratorios de cristalografía y sincrotrones [46].

Los sincrotrones son las fuentes de rayos X más utilizadas debido a que producen diagramas de difracción más puros y completos que otras fuentes. Además, poseen rayos de mucha mayor intensidad, por lo que la recolección de los datos se realiza en un tiempo mucho menor. En este estudio se utilizó la línea XALOC, especial para cristalografía de macromoléculas, del sincrotrón ALBA, ubicado en Barcelona.

Una instalación sincrotrónica (Figura 5.16) contiene un anillo, del orden de kilómetros, por el que se hacen circular electrones a muy alta velocidad, en el interior de canales rectilíneos, que de vez en cuando se quiebran para adaptarse a la curvatura del anillo. A estos electrones se les hace cambiar de dirección para pasar de un canal a otro usando campos magnéticos de gran energía. Durante el cambio de dirección, los electrones emiten una radiación muy energética denominada radiación sincrotrónica. Esta radiación es la aprovechada para los experimentos de cristalografía [46].

Las estaciones experimentales del sincrotrón tienen tres partes: la cabina óptica, en donde se focalizan y filtran los rayos X mediante espejos y monocromadores; la cabina experimental, en donde se sitúa el equipo de medida con la muestra y se realiza el experimento de difracción; y la cabina de control, en donde se supervisa y se evalúa el experimento [46]. Se controlan variables como la longitud de onda, el tiempo de exposición, la distancia entre el cristal y el detector, el ángulo de rotación de cada imagen, el ángulo total del experimento y el número de imágenes capturadas.

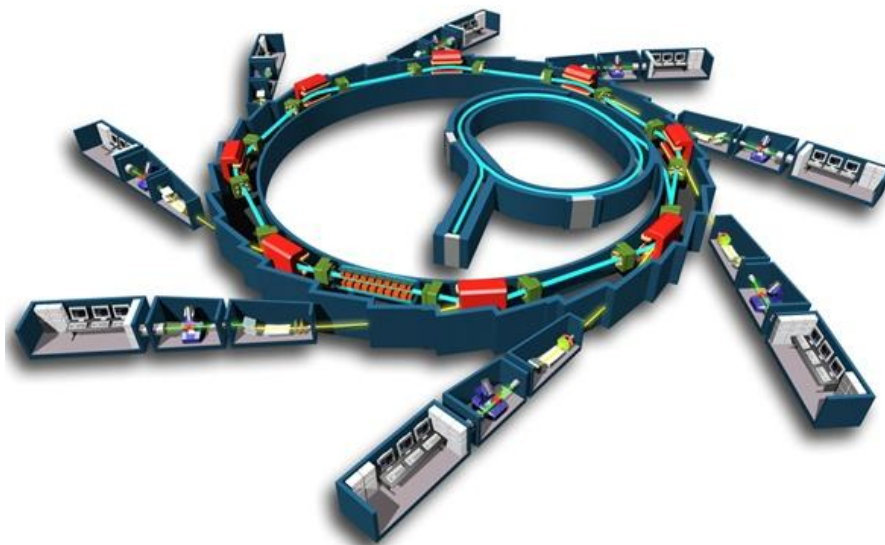


Figura 5.16. Esquema de la instalación de un sincrotrón [46]

Esquema de un sincrotrón en donde se distinguen el acelerador lineal y el acelerador circular en el centro, el anillo exterior de almacenamiento y las líneas de medida, tangentes al anillo de almacenamiento.

El procedimiento seguido para difractar los cristales se presenta a continuación:

- Insertar las tenazas (tipo de pinzas que ayudan a mantener el cristal congelado) en el nitrógeno líquido hasta que el burbujeo cese (30-60 s). Mantener el *cryo-pin* totalmente sumergido en nitrógeno líquido durante este paso y los dos siguientes.
- Abrir las tenazas, asir el *cryo-pin* y retirar la parte plástica del *cryo-vial*, con la ayuda de una varilla magnética.
- Ajustar la base del *cryo-pin* al cabezal del goniómetro usando las tenazas. 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 inciden sobre el cristal.
- Centrar el goniómetro para que los rayos X incidan correctamente sobre la muestra en todos los ángulos de giro, como se muestra en la Figura 5.17.

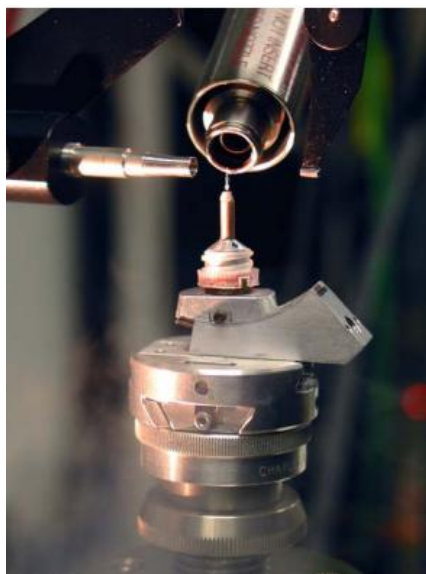


Figura 5.17. Cristal colocado adecuadamente en el cabezal del goniómetro y enfriado por una corriente de nitrógeno líquido [49]

Una vez se obtienen datos de difracción de buena calidad, los diagramas de difracción pueden analizarse para encontrar datos acerca de la estructura de la molécula. El proceso de análisis generalmente consta de las siguientes fases:

- Indexado, integración, procesado y escalado.
- Reemplazamiento molecular.
- Refinamiento.
- Obtención de mapas de densidad electrónica.
- Validación (resolución de la estructura).

6. Resultados y discusión

6.1. Optimización del método de expresión y tratamiento del sedimento bacteriano de la proteína NHP6A

Previo al desarrollo de los protocolos indicados en los apartados 5.1 y 5.2, se realizaron una serie de pruebas destinadas a optimizar la expresión y purificación de la proteína NHP6A.

6.1.1. Elección de la cepa óptima de *Escherichia coli*

Tomando como base una adaptación del protocolo de expresión y purificación de la NHP6A presentado por Yen, Wong y Johnson [44], se empezó la expresión con la cepa BL21(DE3) de la bacteria.

En primera instancia, se inició un cultivo partiendo de células ya transformadas (almacenadas en glicerol a -80 °C) que habían sido utilizadas con éxito para expresar la proteína de interés [43]. El cultivo se incubó hasta 1 litro y se indujo la expresión de la proteína mediante la adición de IPTG 1 mM (ver 5.1.3.3). Sin embargo, se obtuvo un muy bajo nivel final de expresión (Figura 6.1A).

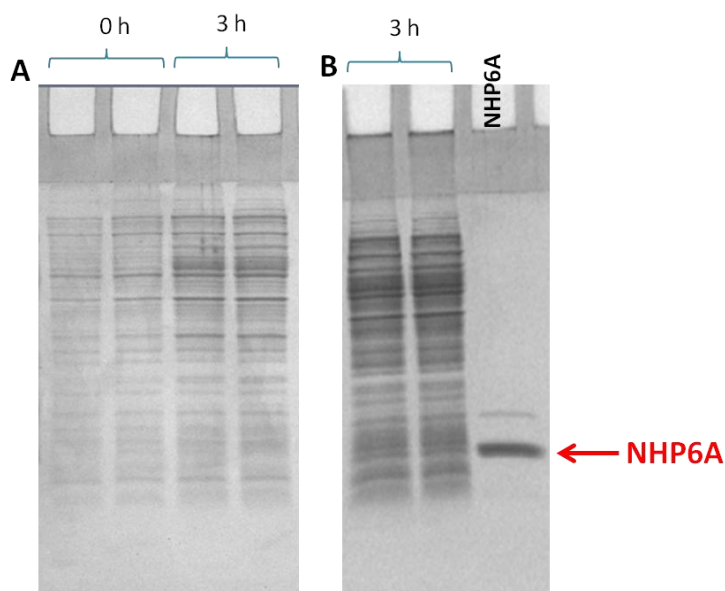


Figura 6.1. Prueba de expresión de NHP6A en la cepa BL21 (DE3)

A: Expresión a partir de células ya transformadas.

B: Expresión a partir de células transformadas de nuevo.

Se indican los tiempos de la inducción en la parte superior.

Debido a esto, se decidió partir de células competentes BL21 (DE3) y transformarlas de nuevo con el plásmido conteniendo el gen de la NHP6A (pRJ12228). Así, 100 μ l de células BL21 (DE3) se transformaron utilizando 1 μ l del plásmido (48,2 ng/ μ l), siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5.1.3.1. El resultado obtenido fue, nuevamente, muy bajos niveles de expresión de la proteína. Esto puede verse en la Figura 6.1B.

Dado que la cepa propuesta no arrojaba los resultados esperados, se realizaron tres transformaciones en paralelo para verificar los niveles de expresión de la proteína en tres cepas diferentes de *Escherichia coli*. Se partió de células competentes BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS y Rosetta(DE3)pLysS (almacenadas a -80 °C), y plásmido NHP6A (stock 37,4 ng/ μ l). Se incorporó de nuevo la cepa BL21(DE3) para corroborar los resultados de la expresión anterior.

Una vez se completó la transformación, se realizó una prueba a pequeña escala (cultivo o/n de volumen final 30 ml) con cada una de las tres cepas. Además, para cada cepa el cultivo se realizó tanto en presencia de IPTG como sin IPTG. 100 μ l de cada uno de los cultivos se procesaron como se describe en el apartado 5.1.3.3 y se analizaron electroforéticamente (Figura 6.2).

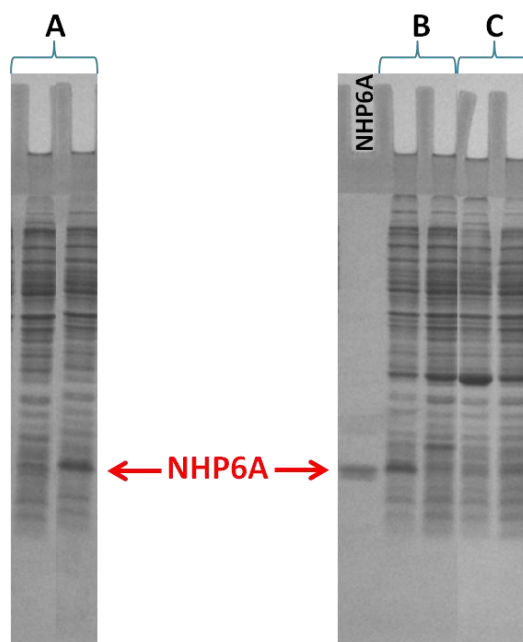


Figura 6.2. Verificación de la expresión de NHP6A en las cepas BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS y Rosetta(DE3)pLysS

- A:** BL21(DE3) inducida con IPTG (izquierda) y sin inducir (derecha).
- B:** BL21(DE3)pLysS inducida con IPTG (izquierda) y sin inducir (derecha).
- C:** Rosetta(DE3)pLysS inducida con IPTG (izquierda) y sin inducir (derecha).

De las tres cepas ensayadas, la cepa BL21(DE3)pLysS presenta un buen nivel de expresión y la producción de la proteína puede inducirse de forma controlada mediante IPTG. Debido a esto, la expresión final de la proteína NHP6A, para su posterior purificación, se realizó con esta cepa.

Es importante destacar que al escalar el experimento de 30 ml a 1 litro de volumen de cultivo final, la inducción con IPTG o/n no resulta en altos niveles de expresión de proteína. Se obtienen mejores resultados realizando la inducción del cultivo de 1 litro durante 3 horas. Estos resultados pueden verse en la Figura 6.3.

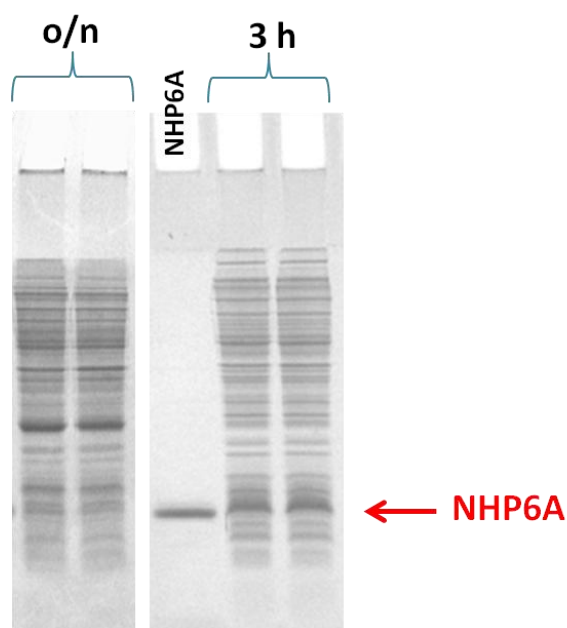


Figura 6.3. Prueba de duración de la inducción mediante IPTG

6.1.2. Método de fraccionamiento del extracto inicial

Una vez elegida la cepa para expresar la proteína, se pasó a optimizar el método de fraccionamiento del extracto inicial. Estas pruebas se realizaron sobre el cultivo a pequeña escala (30 ml) utilizado previamente. Se contempló el fraccionamiento mediante la adición de sulfato amónico (SA) y/o TCA, basándonos en datos previos [43] [44].

Se probó la adición de TCA hasta concentraciones del 2%, 10% y 25% secuencialmente, para encontrar el equilibrio adecuado entre la remoción de contaminantes sin la precipitación de la proteína. Por otro lado, se probó la adición de SA hasta concentraciones de saturación del 35% y 100% (un *screening* previo demostró que el mejor compromiso entre rendimiento y pureza se encontraba a 35%. El 100% se usa como control. Por último, se probó agregar

TCA hasta un 2% de concentración a la muestra previamente tratada con 35% de saturación de sulfato amónico. Las diferentes pruebas se encuentran en la Figura 6.4.

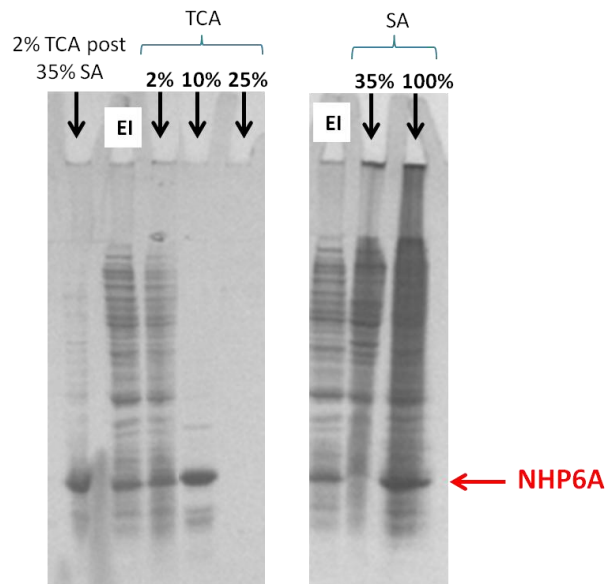


Figura 6.4. Pruebas de métodos de fraccionamiento del extracto inicial (precipitados)

En la Figura 6.4 se observa como el precipitado obtenido con 2% de TCA contiene gran cantidad de proteínas bacterianas, así como parte de NHP6A. Cuando la fracción soluble se lleva hasta el 10% de TCA, se produce la precipitación de una gran cantidad de proteína NHP6A y algunas otras pocas proteínas bacterianas. Esto indica que el sobrenadante del 2% de TCA contiene NHP6A en alta concentración y con pocos contaminantes. Al llevar la parte que permanece soluble al 10% de TCA, hasta el 25% no se origina la precipitación de nuevas proteínas.

Por otra parte, el fraccionamiento usando 35% de saturación de SA retira una gran cantidad de proteínas contaminantes, pero se obtiene una muestra de menor pureza que al usar TCA. Si a la fracción soluble al 35% de saturación de SA, se le añade TCA hasta el 2%, la proteína NHP6A pierde su solubilidad y se recupera en el precipitado junto con bastantes proteínas contaminantes.

Por tanto, se escogió finalmente el método de fraccionamiento mediante la adición de 2% de TCA al extracto inicial para eliminar la mayoría de las proteínas contaminantes y continuar la purificación con la fracción soluble al 2% de TCA (ver 6.3).

6.2. Expresión de la proteína NHP6A

La proteína NHP6A se ha obtenido finalmente a partir de un cultivo de *Escherichia coli* (cepa BL21(DE3)pLysS) mediante la técnica del ADN recombinante. El plásmido pRJ1228 (stock de 37,4 ng/μl), que contiene el gen que codifica la proteína NHP6A, fue el utilizado para transformar a la célula anfitriona de la cepa BL21(DE3)pLysS (ver 5.1.3.1).

NOTA: El stock de plásmido pRJ1228 fue renovado mediante el desarrollo del protocolo *Illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare), con el que se obtuvo 100 μl de plásmido con una concentración de 128,4 ng/μl (ver información más detallada en el Anexo A).

Las células anfitrionas habían sido previamente tratadas con cloruro de calcio para hacerlas competentes y así facilitar la entrada del plásmido.

Las células competentes se incuban junto con el plásmido y se someten a un choque térmico para facilitar la transformación. Después de esto, se les permite a las células un período de recuperación ante los cambios de temperatura previos (ver 5.1.3.1).

El proceso de transformación no es 100% efectivo, por lo que se procedió a la selección de las células transformadas. Esto se realiza agregando ampicilina al medio y cultivando las células o/n sobre una placa de agar con medio LB. Las células tratadas son sensibles a la ampicilina, por lo que sólo crecerán aquéllas que hayan incorporado el plásmido pRJ1228 (que les confiere la resistencia a la ampicilina mediante el gen Amp^R). Adicionalmente, se agrega cloranfenicol al medio, al que son resistentes las bacterias usadas, para tener mayor control sobre el cultivo.

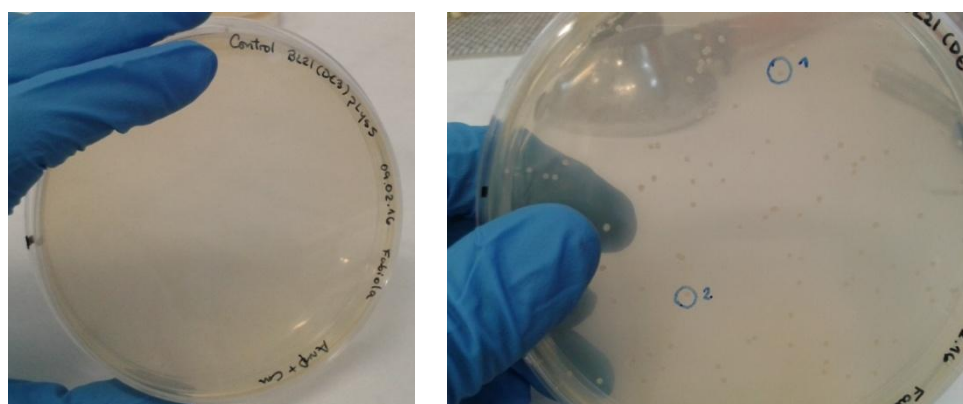


Figura 6.5. Cultivo control (izquierda) y cultivo de células transformadas (derecha)

En el proceso de selección se usó como control un cultivo de células competentes sin plásmido, al que se le agregó ampicilina y cloranfenicol, y en el que no existió crecimiento de células (Figura 6.4). Esto verifica que las colonias de células obtenidas en el ensayo de transformación son realmente transformadas.

Se escogieron dos colonias del cultivo de células transformadas (Figura 6.4) y se pasaron a medio líquido (ver 5.1.3.2). Cada una de ellas, se incubó en 3 ml de medio LB (con ampicilina y cloranfenicol) durante 5 horas, en agitación, y a una temperatura de 37 °C. Estas condiciones permiten el crecimiento de la bacteria, lo que se traduce visualmente en la turbidez de la muestra. Se escogió el tubo proveniente de la colonia identificada como n° 2, de ambos cultivos de células transformadas, ya que presentaba mayor turbidez.

El cultivo de 3 ml se agregó a 150 ml de medio LB (con ampicilina y cloranfenicol) y se incubó o/n. Al día siguiente se inoculó sobre 1 litro de medio LB (con ampicilina y cloranfenicol) un volumen de cultivo tal que la DO_{600} fuese de 0,1 - 0,2; lo que supuso 22 ml de cultivo. Esto se realizó por duplicado (cultivo 1 y cultivo 2) para obtener un volumen final de 2 litros de cultivo.

Se incubaron los cultivos, en agitación, a una temperatura de 37 °C durante 2 horas. Después de este período se hizo una lectura de absorbancia para verificar que la DO_{600} se encontrara alrededor de 0,6 (valor apropiado para la inducción con IPTG) (Tabla 6.1). Después de corroborar que se tenía la absorbancia adecuada, se hizo la inducción mediante la adición de 1 ml de IPTG 1 M a cada cultivo de 1 litro, para una concentración final de 1 mM (ver 5.1.3.3).

Se continuó incubando en agitación a una temperatura de 37 °C durante 3 horas. Después de este tiempo se hizo una nueva lectura de absorbancia (Tabla 6.1).

Tabla 6.1. Lectura de absorbancia de los cultivos antes y después de la inducción

Tiempo	DO_{600} Cultivo 1	DO_{600} Cultivo 2
0 h	0,692	1,418
3 h	0,83	1,51

El control electroforético del proceso de inducción se realizó en un gel SDS-PAGE (Figura 6.6). Se observa claramente como después del tiempo de inducción, la banda correspondiente a la proteína NHP6A aparece en el carril de ambos cultivos (1 y 2).

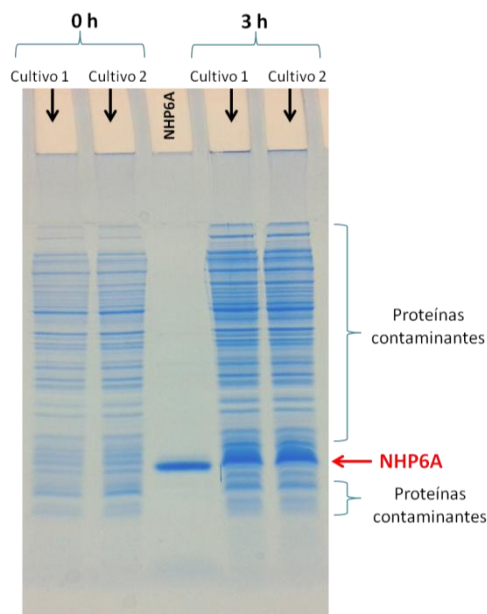


Figura 6.6. Análisis electroforético en un gel SDS-PAGE del proceso de inducción

Una vez verificado que la proteína de interés ha sido expresada y es mayoritaria con respecto al resto de las proteínas bacterianas contaminantes, se procedió al tratamiento del sedimento bacteriano.

6.3. Tratamiento del sedimento bacteriano

La proteína NHP6A es un producto intracelular de la bacteria, es decir, no es secretada por la misma. Debido a esto, para recuperarla se debe empezar por romper las células. Este proceso se realizó mediante sonicación (ver 5.1.4.1) y permitió que la proteína pasara al medio manteniéndose soluble. Al centrifugar, las moléculas insolubles y los restos de la bacteria, sedimentan (son eliminados); mientras que la proteína de interés se mantiene en el sobrenadante. Dicho sobrenadante es ahora denominado extracto inicial (EI) 1 y 2, de acuerdo al cultivo del que proviene (Figura 6.7).

Los extractos iniciales se mezclaron, obteniéndose un volumen de 46,5 ml. Se almacenó a -20 °C una fracción de 0,5 ml y los 46 ml restantes pasaron a ser tratados con TCA (ver 5.1.4.2).

Se agregó 0,939 ml de TCA 100% al extracto inicial para dar una concentración del 2% en la solución. Al momento de agregar el TCA, se observó turbidez. Después de dejar la solución 30 minutos en hielo, se centrifugó obteniendo un sobrenadante de color amarillento (donde se espera encontrar la proteína NHP6A) y un sedimento compacto. Ambos, sobrenadante y

sedimento, se siguieron procesando hasta comprobar la ubicación de la proteína de interés.

Para minimizar el riesgo de desnaturalización de la proteína, se neutralizó la solución de sobrenadante mediante un proceso de diálisis frente al buffer de equilibrado a usar en la etapa de cromatografía posterior (100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM DTT a pH 7,9). En el caso del sedimento, el proveniente de uno de los tubos de 50 ml (que corresponde a la mitad del sedimento total obtenido), fue resuspendido en 5 ml de buffer de equilibrado; y posteriormente fue dializado ante el mismo buffer.

Una vez dializadas las muestras, se tomaron controles electroforéticos para verificar los resultados del tratamiento del sedimento bacteriano. El control electroforético se realizó en un gel SDS-PAGE (Figura 6.7), donde se comparan las diferentes fracciones obtenidas.

Se observa que el sobrenadante (fracción soluble en TCA 2%) presenta una banda claramente definida correspondiente a la proteína NHP6A. Adicionalmente, apenas se observan proteínas contaminantes. Al comparar con el sedimento resuspendido, la cantidad de NHP6A que parece haber precipitado es considerable y se encuentra contaminada con otras proteínas, pero en mucha menor proporción que las presentes en los extractos iniciales (EI 1 y EI 2).

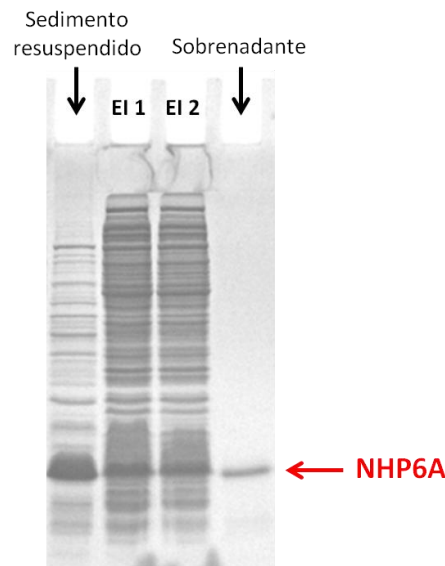


Figura 6.7. Análisis electroforético en un gel SDS-PAGE del fraccionamiento mediante TCA 2% Se muestran el sobrenadante (fracción soluble) y el sedimento obtenidos comparados con el extracto inicial de partida (EI).

Así pues, y a diferencia de lo que se observó en la prueba a pequeña escala (ver 6.1.2), la mayoría de la proteína NHP6A aparece en la fracción insoluble.

A partir de estos resultados, se decidió purificar tanto la NHP6A presente en el sobrenadante como la presente en el sedimento resuspendido, mediante una secuencia de cromatografías.

6.4. Purificación de la proteína NHP6A

Así como la NHP6A recuperada del sedimento resuspendido aparece con gran cantidad de proteínas contaminantes, la proteína NHP6A que se recupera en el sobrenadante presenta una pureza aparente considerable. Debido a esto, la secuencia de cromatografías para estas muestras será diferente (Figura 6.8).

El sobrenadante pasó directamente a una cromatografía de exclusión molecular, porque parecía presentar pocas proteínas contaminantes y todas de menor tamaño que la NHP6A (mayor avance en el gel de electroforesis - Figura 6.7). Los resultados luego mostraron necesaria la realización de una cromatografía de intercambio catiónico para remover proteínas que no se observaron previamente (probablemente por la baja concentración de la muestra cargada en el gel - Figura 6.7).

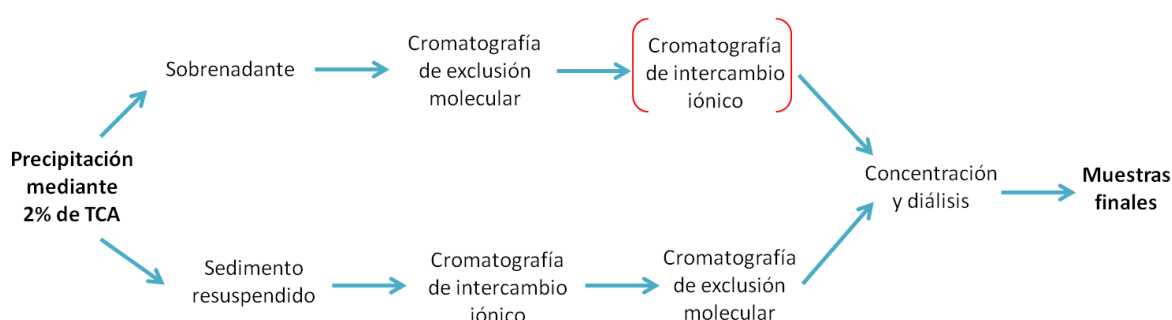


Figura 6.8. Esquema del proceso de purificación seguido para las muestras post fraccionamiento con 2% de TCA

En cambio, el sedimento resuspendido, pasó en primera instancia a una cromatografía de intercambio catiónico, para separar las proteínas contaminantes en base a su carga. Esta cromatografía suele usarse como primera etapa de purificación porque remueve una gran cantidad de contaminantes. Luego, se realizó la cromatografía de exclusión molecular como afinamiento.

Por último, las muestras resultantes de ambas secuencias de purificación fueron concentradas y dializadas, para su almacenamiento y posterior uso en ensayos cristalográficos (apartado 6.5.4).

6.4.1. Cromatografía de intercambio catiónico

Las cromatografías de intercambio catiónico, se realizaron usando una columna HiTrap SP FF de GE Healthcare, en el equipo FPLC ÄKTA Purifier 10 (ver 5.2.1). Esta columna, cuya matriz posee una carga negativa, retuvo la proteína NHP6A (catiónica), mientras que las proteínas con carga neutra o carga negativa no se retienen. Para eluir la proteína de interés, se utilizó un gradiente de concentración creciente de sodio, que desplazó la proteína retenida en la matriz.

Como se comentó previamente (Figura 6.8), las muestras a las que se les realizó una cromatografía de intercambio catiónico son: el sedimento resuspendido de la precipitación con TCA (MDP 1 en Figura 6.9) y la fracción sobrenadante después de ser tratada mediante una cromatografía de exclusión molecular (MDP 2 en Figura 6.9), (ver también 6.4.2). Las condiciones de operación empleadas durante las cromatografías se presentan a continuación (Tabla 6.2).

Tabla 6.2. Condiciones de operación para las cromatografías de intercambio catiónico

Parámetro	MDP 1	MDP 2
Columna	HiTrap SP FF de GE Healthcare	
Volumen de resina	5 ml	
Presión máxima admisible	0,3 MPa	
Tamaño del <i>loop</i>	10 ml	
Muestra	72,347 mg en 4 ml (buffer de equilibrado)	23,25 ml (en buffer de equilibrado)
Inyecciones de muestra	2 inyecciones (4 ml y 90 μ l)	3 inyecciones (2 de 8,5 ml y 1 de 6,25 ml)
Flujo	2 ml/min	1 ml/min
Elución	Buffer de equilibrado a buffer de elución (100 mM NaCl a 1 M NaCl) en 90 ml	
Volumen de fracciones	2 ml	
DO medida a λ	220 nm, 260 nm y 280 nm	

La Figura 6.9 presenta los cromatogramas obtenidos durante las cromatografías de intercambio catiónico. En el caso de la MDP 1, se observa un pico de absorbancia a 280 nm entre 45% y 55% de la solución de elución, lo que corresponde aproximadamente al rango 500-600 mM de NaCl. Las fracciones (Fr) correspondientes al pico de absorbancia, Fr 29 a Fr 38, se colectaron para su posterior análisis mediante un gel de electroforesis (Figura 6.10). Para la MDP 2, se observa un pico de absorbancia a 280 nm entre 45% y 60% de la solución de elución, lo que corresponde aproximadamente al rango 500-650 mM de NaCl.

Las fracciones correspondientes al pico de absorbancia, Fr 33 a Fr 42, se colectaron para su posterior análisis mediante un gel de electroforesis (Figura 6.10).

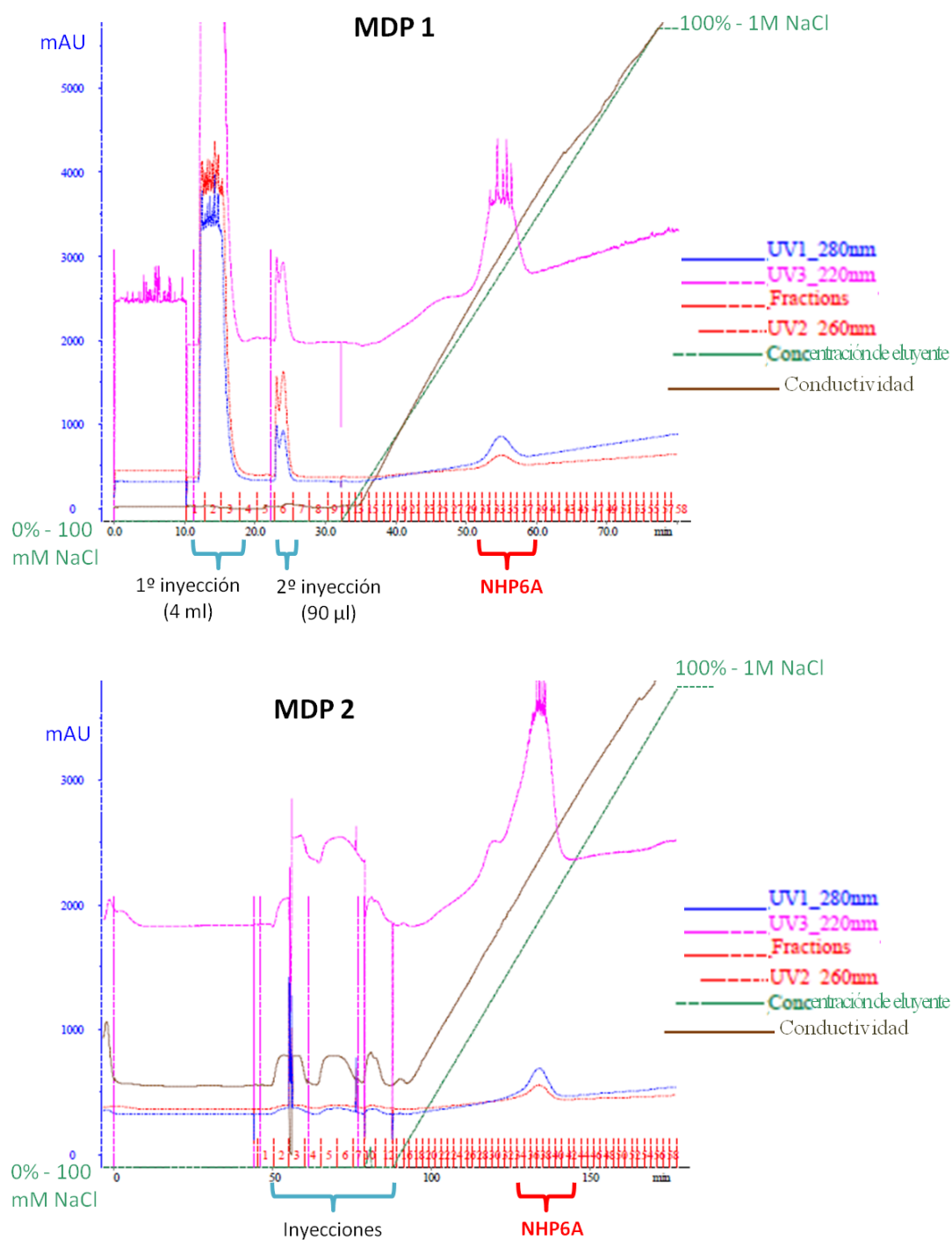


Figura 6.9. Cromatogramas de la columna HiTrap Sp FF para las muestras MDP 1 (arriba) y MDP 2 (abajo)

El análisis electroforético (Figura 6.10) mostró presencia de la proteína NHP6A en las

fracciones colectadas, con la mayor concentración de proteína y la menor proporción de contaminantes en el punto más alto del pico de absorbancia (280 nm). Esto se cumple para las muestras MDP 1 y MDP 2. También se observa que durante la centrifugación de MDP 1, previa a su inyección en la columna, se eliminaron gran número de proteínas contaminantes que se quedaron en el sedimento (ND).

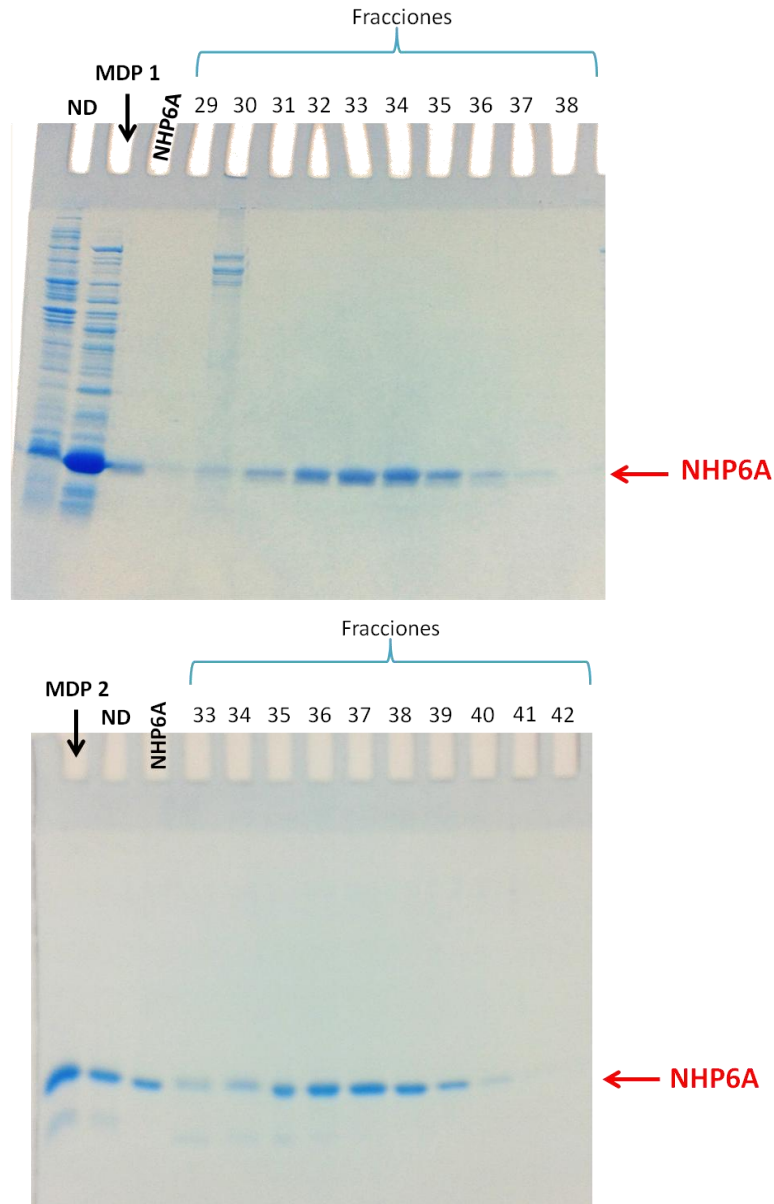


Figura 6.10. Gel SDS-PAGE correspondiente a las fracciones de la columna HiTrap SP FF para las muestras MDP 1 (arriba) y MDP 2 (abajo)

En el caso de la MDP 1, la fracción 30 contiene proteínas contaminantes y la fracción ya 38 no presenta niveles observables de NHP6A. Debido a esto, se escogió continuar purificando las fracciones 31-37.

En el caso de la MDP 2, para la cual la columna HiTrap SP FF representaba la última etapa de cromatografía, se descartaron las fracciones 33-36 por no ser suficientemente puras. Se decidió tomar la Fr 37 y las fracciones 38-40 para concentrar y dializar. Estos dos grupos de fracciones se mantuvieron por separado porque la Fr 37 (desde este momento M4) presentó una leve banda por debajo de la NHP6A, mientras que las fracciones 38-40 (en adelante M3) tenían mayor grado de pureza.

6.4.2. Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular separa las macromoléculas presentes en las soluciones de acuerdo a su tamaño y, generalmente, constituye la última etapa de una secuencia de cromatografías, usándose como afinamiento.

Para la muestra proveniente del sobrenadante de la precipitación al 2 % de TCA (Figura 6.8) esta cromatografía es la primera de su secuencia. Como se comentó previamente, se consideró que esta muestra tenía un grado de pureza suficientemente alto (Figura 6.7) para ser tratada directamente con una cromatografía de exclusión molecular.

Por otro lado, las fracciones provenientes de la cromatografía de intercambio catiónico de la MDP 1 (Fr 31-37 en la Figura 6.10) se mezclaron en un tubo Falcon de 15 ml, que se colocó en hielo. A dicha muestra se le identificó como “Muestra 31-37” y se le determinó la absorbancia para comprobar que el contenido de proteína no excediera el valor límite. El cálculo se llevó a cabo utilizando la ley de Beer-Lambert (ver 5.2.4) como se muestra a continuación:

$$C = \frac{A}{\varepsilon \cdot l} = \frac{0,4805}{10810 \frac{1}{cm \cdot M} \cdot 1 cm} = 4,445 \cdot 10^{-5} M$$

$$4,445 \cdot 10^{-5} \frac{mol}{l} \cdot 10802 \frac{g}{mol} \cdot 14 ml = 0,00672 g = 6,72 mg$$

Una vez verificado el contenido de proteína, se concentró la muestra hasta un volumen apropiado para ser cargado en la columna. El volumen máximo recomendado para obtener cromatogramas de buena resolución es de 500 μ l. Los volúmenes iniciales y finales de la concentración de las muestras se muestran en la Tabla 6.3.

Tabla 6.3. Características de la concentración de las muestras previo a la cromatografía de exclusión molecular

Muestra de partida	Volumen inicial	Volumen final
Sobrenadante de la precipitación al 2% de TCA	46 ml	720 μ l
Muestra 31-37	14 ml	220 μ l

El proceso de concentración se llevó a cabo usando un Vivaspin® 20 de MWCO 3000, cuyo volumen máximo recomendado es de 14 ml. En el caso de muestras de volumen mayor, se concentraba hasta disminuir el volumen lo suficiente como para rellenar la parte superior del concentrador con muestra, hasta lograr concentrarla en su totalidad. La absorbancia de los filtrados de la concentración fue leída y se comprobó que no se perdió proteína.

La muestra constituida por el sobrenadante de la precipitación al 2 % de TCA se concentró hasta un volumen mayor a 500 μ l. Debido a esto, se dividió en dos alícuotas (360 μ l cada una) y se realizaron dos cromatografías consecutivas (*Run 1* y *Run 2* en Figura 6.11).

En el caso de la muestra proveniente de la cromatografía de intercambio iónico, sólo se requirió realizar una cromatografía por cumplir con los requerimientos de volumen y cantidad de proteína.

Las condiciones de operación empleadas durante las cromatografías se presentan a continuación (Tabla 6.4).

Tabla 6.4. Condiciones de operación para las cromatografías de exclusión molecular

Parámetro	Sobrenadante de la precipitación al 2% de TCA		Muestra 31-37
	<i>Run 1</i>	<i>Run 2</i>	
Columna	HiLoad Superdex 75 10/300 GL de GE Healthcare		
Volumen de resina	24 ml		
Presión máxima admisible	1,75 MPa		
Tamaño del <i>loop</i>	500 μ l		
Muestra	360 μ l	360 μ l	220 μ l (6,72 mg de NHP6A)
Flujo	0,5 ml/min		
Elución	Composición constante – Buffer Superdex 200 (150 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1 mM DTT a pH 7,4)		
Volumen de fracciones	0,5 ml		
DO medida a λ	220 nm, 260 nm y 280 nm		

En la cromatografía de exclusión molecular el proceso de equilibrado y el programa de

cromatografía se realizan utilizando el mismo buffer (Superdex 200 - 150 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1 mM DTT a pH 7,4).

La Figura 6.11 presenta los cromatogramas obtenidos durante las cromatografías de exclusión molecular para el sobrenadante de la precipitación al 2% de TCA (*Run 1* y 2), así como para la Muestra 31-37.

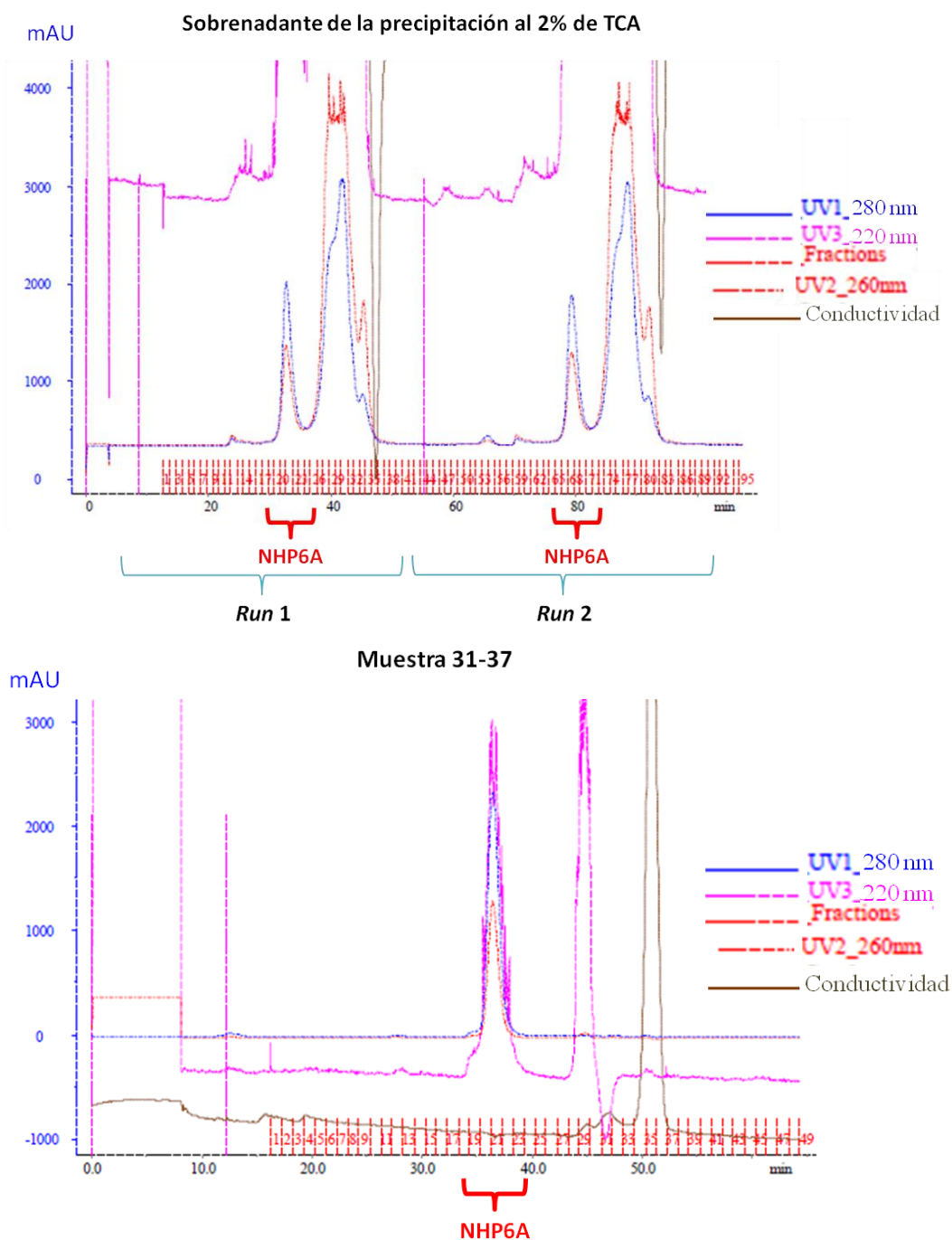


Figura 6.11. Cromatogramas de la columna HiLoad Superdex 75 10/300 GL para el sobrenadante de la precipitación al 2% de TCA (arriba) y la Muestra 31-37 (abajo).

En el caso del *Run 1* de la cromatografía para el sobrenadante de la precipitación al 2% de TCA, la proteína se recogió en las fracciones Fr 19 a Fr 23, tal y como se comprobó tras su análisis mediante un gel de electroforesis (Figura 6.12). Análogamente, la NHP6A se recuperó en las fracciones Fr 65 a Fr 70 del *Run 2* (Figura 6.12).

Se observa que en el caso del *Run 1* y el *Run 2*, todas las fracciones colectadas en los picos de elución de la proteína contienen NHP6A, en mayor o menor proporción, pero también presentan numerosas proteínas contaminantes que no eran visibles cuando la concentración de la solución era menor (Figura 6.7). Debido a esto, todas las fracciones colectadas se sometieron a una cromatografía de intercambio catiónico, para intentar remover las proteínas contaminantes por diferencia de carga (ver 6.4.1). Las fracciones 19-23 del *Run 1* y 65-70 del *Run 2* se reunieron, y para ajustarlas a las condiciones iniciales de la columna de intercambio catiónico, se adicionó 18 ml de una solución 10 mM Tris, 1 mM EDTA y 1 mM DTT. De esta forma, se llevó el contenido de NaCl a aproximadamente 100 mM. A esta muestra final se le llamó MDP 2.

Como se ha comentado anteriormente, la MDP de esta columna presentaba un color amarillento. A lo largo de la cromatografía se observó el avance de una sección amarillenta que acabó eluyendo entre las fracciones 25-35 del *Run 1* y 72-82 del *Run 2*. Dichas fracciones, no obstante, no presentaron muestra de NHP6A sino de otras proteínas de mayor masa molecular (ver Figura 6.12, derecha).

Respecto a la cromatografía de la Muestra 31-37, las fracciones correspondientes al pico de absorbancia a 280 nm que se analizaron electroforéticamente, fueron las Fr 19 a Fr 24. Estas fracciones se analizaron electroforéticamente (Figura 6.12).

Se observa que las Fr 18 y Fr 19 contienen la proteína de interés en baja concentración y su grado de pureza es bajo, mostrando bandas de proteínas contaminantes. Estas fracciones se descartaron. La Fr 20 presenta un alto nivel de NHP6A pero algunas proteínas contaminantes de mayor tamaño. Las Fr 21 a Fr 23 contienen la proteína de interés y un mayor grado de pureza. Debido a esta diferencia de pureza, la Fr 20 (desde este momento M1) se procesará por separado de las Fr 21-23, que se mezclarán (la muestra resultante se llamará M2).

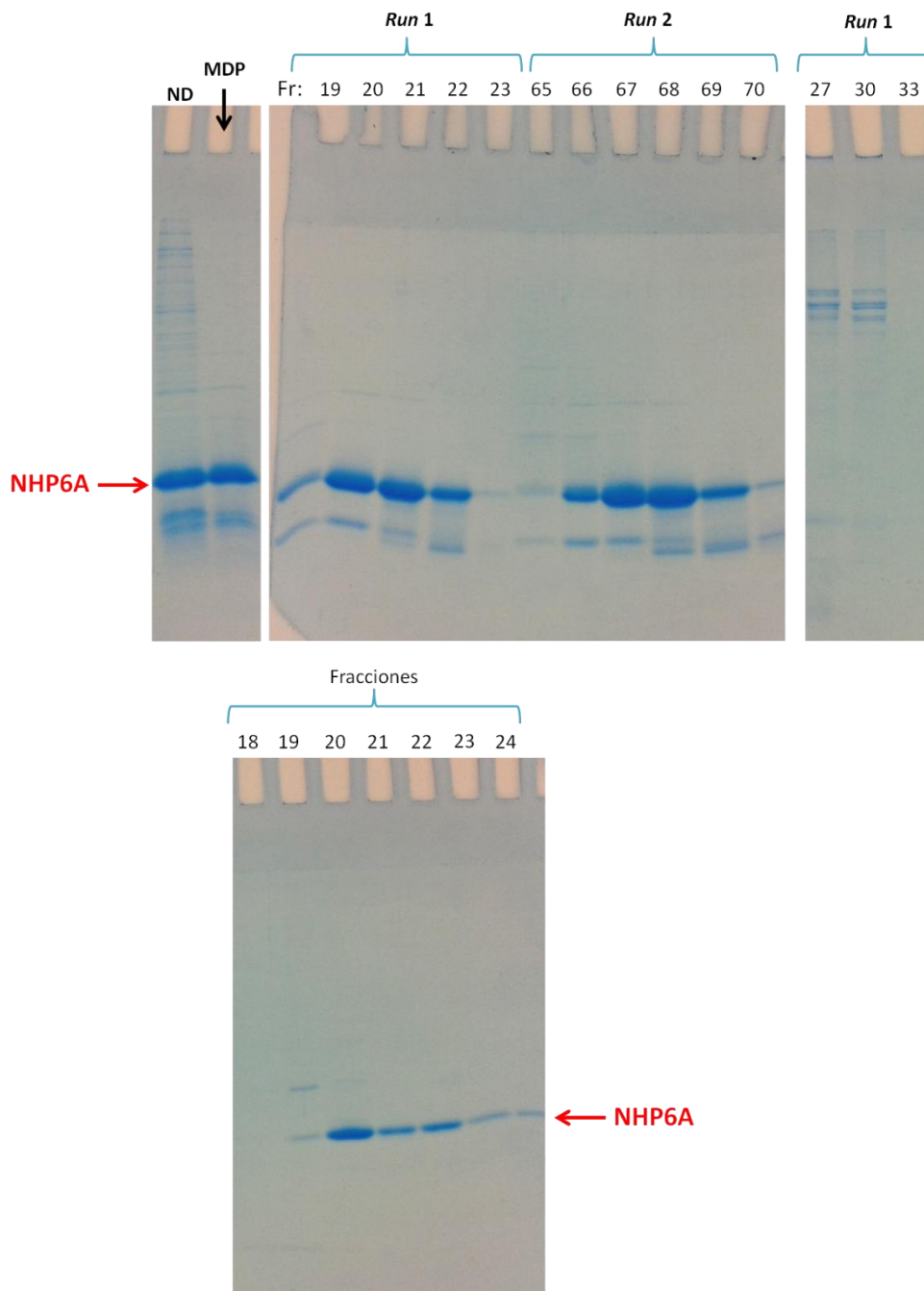


Figura 6.12. Gel SDS-PAGE correspondiente a las fracciones de la columna Hiloal Superdex 75 10/300 GL para el sobrenadante de la precipitación al 2% de TCA (arriba) y la Muestra 31-37 (abajo).

6.4.3. Concentración y diálisis de la proteína purificada

De acuerdo a los resultados obtenidos en el proceso de purificación de la proteína NHP6A, se juntaron las fracciones de las respectivas etapas de cromatografías según su grado de pureza (Tabla 6.5).

Tabla 6.5. Fracciones de las cromatografías unidas de acuerdo al grado de pureza

Muestra	Última etapa de cromatografía	Muestra de origen	Fracciones
M1	Exclusión molecular	Muestra 31-37	20
M2			21, 22 y 23
M3	Intercambio iónico	MDP 2	38, 39 y 40
M4			37

Una vez juntadas las fracciones obtenidas de las cromatografías, éstas se concentraron y dializaron utilizando los dispositivos Vivaspin® 6 de MWCO 3000 (ver 5.2.3). En este momento, las muestras se encontraban disueltas en el buffer de la última etapa de cromatografía que se les realizó, lo que les daba un medio con alto contenido de sales. De esta manera se pasó la proteína al buffer final (50 mM NaCl, 25 mM HEPES, 1 mM DTT a pH 7,4) para realizar los ensayos de cristalografía.

Las muestras se concentraron hasta alcanzar un volumen menor a 1 ml, momento en el cual se comenzaron los lavados con buffer final para dializarlas. Finalmente, se concentraron y se les calculó la concentración, mediante la lectura de absorbancia (Tabla 6.6) y la aplicación de la ley de Beer-Lambert. De igual manera, los filtrados de todas las concentraciones (FT) y diálisis (D) se conservaron, se les leyó la absorbancia y calculó la concentración (Tabla 6.7).

Tabla 6.6. Contenido de proteína de las muestras M1, M2, M3 y M4

Muestra	Volumen inicial (ml)	Volumen final (µl)	Concentración (mM)	NHP6A (mg)
M1	0,5	300	0,1798	0,5827
M2	1,5	250	0,0558	0,1508
M3	6	45	0,1054	0,0513
M4	2	60	0,3348	0,217

Tabla 6.7. Contenido de proteína de los filtrados y dializados de las muestras M1, M2, M3 y M4

Muestra	Volumen (ml)	Concentración (mM)	NHP6A (mg)
FT1	0,5	0,0004	0,0025
D1	14	0,0031	0,4756
FT2	1,5	0,0277	0,4488
D2	14	0,0031	0,4756
FT3	6	0,0192	1,2411
D3	12	0,0079	1,0312
FT4	2	0,0193	0,4180
D4	12	0,0072	0,9353

Al comparar los valores de concentración de proteína obtenidos (Tabla 6.6) con las

estimaciones preliminares realizadas (ver 6.4.2), se sabe que se ha perdido proteína durante el proceso de concentración y diálisis. Esto se corrobora al analizar las concentraciones de proteína presentes en los filtrados y dializados (Tabla 6.7). A pesar de que el MWCO del Vivaspin® 6 (3000 Da) es considerablemente menor a la masa molecular de la NHP6A (10802,3 Da), parte de ésta ha logrado pasar a través de la membrana hacia los filtrados y dializados.

En vista de que las muestras se desean destinar a ensayos cristalográficos, se requiere que sean concentradas, ya que se trabaja con volúmenes muy pequeños. En general, se considera una muestra apta si su concentración final es mayor a 2 mM de proteína. Dado que la concentración de las muestras M1, M2, M3 o M4 era insuficiente, se retomó el proceso de concentración, pero esta vez con los filtrados dializados (mayor presencia de proteína).

Se decidió seguir concentrando la muestra FT2 y también unir las muestras FT3, D3, FT4 y D4 (cuya mezcla se denominará MF1) para su concentración. Para ello, se utilizaron concentradores Vivaspin® 20, con los que previamente se obtuvieron buenos resultados (ver 6.4.2). Se siguió el procedimiento detallado en el apartado 5.2.3 para realizar la concentración. Se recogieron los filtrados para posterior lecturas de absorbancia.

Debido a que el volumen límite de concentración del Vivaspin® 20 es de 50 µl, al alcanzar un volumen de aproximadamente 230 µl, la concentración de la muestra MF1 se continuó en un concentrador Amicon Ultra-0,5 ml. Se recogió el filtrado para posterior lectura de absorbancia.

Las concentraciones finales de las muestras FT2, MF1 y sus respectivos filtrados pueden verse en la Tabla 6.8.

Tabla 6.8. Contenido de proteína de las muestras FT2, MF1 y sus filtrados

Muestra	Volumen inicial (ml)	Volumen final (µl)	Concentración (mM)	Masa NHP6A (mg)
FT2	1,5	266	0,0496	0,1426
Filtrado de FT2	1,5	1,5	0,0121	0,1963
MF1	32	42	2,6698	1,2112
Filtrado de MF1	0,458	0,458	0,0557	0,2760

Al analizar los valores de la Tabla 6.8, se constata que se ha perdido proteína de nuevo. Parece que el uso del concentrador Amicon Ultra-0,5 ml reduce la pérdida de proteína por la membrana pero no la elimina.

Al tener las muestras concentradas, se requiere saber si cumplen con los requerimientos de pureza. La muestra MF1 tiene una concentración adecuada para su uso en ensayos cristalográficos, por lo que es de particular interés conocer su grado de pureza. Este análisis se realiza mediante una electroforesis SDS-PAGE. En la Figura 6.13 se muestra el análisis electroforético tanto de las muestras M1, M2, M3 y M4, como de las obtenidas tras el nuevo proceso de concentración (MF1 y FT2).

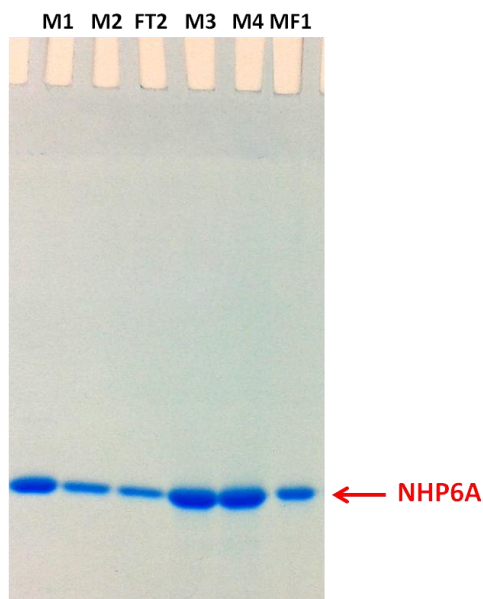


Figura 6.13. Gel SDS-PAGE de las fracciones finales concentradas de la proteína NHP6A

Los ensayos cristalográficos finalmente se llevaron a cabo con la muestra MF1 de la proteína NHP6A, por presentar un elevado grado de pureza y una concentración suficiente (2,67 mM).

6.5. Ensayos cristalográficos

Los ensayos cristalográficos realizados en este proyecto buscan estudiar la interacción con el surco estrecho del ADN, en zonas ricas en AT, de un fármaco derivado de difenilo bisimidazolinio y de proteínas HMGB, particularmente de la NHP6A y la HMGB1 box B.

Para ello, se buscó cristalizar complejos de la proteína NHP6A y HMGB1 box B, o de un fármaco derivado de difenilo bisimidazolinio, con diferentes oligonucleótidos, para su difracción mediante rayos X.

A continuación se resumen las condiciones de los 106 ensayos cristalográficos realizados y

los resultados obtenidos. En ellos se detallan los oligonucleótidos empleados y las condiciones de la gota (relación molar proteína/fármaco-oligonucleótido y sus concentraciones, las sales utilizadas, pH y tipo de precipitante). Para ver una descripción más detallada de cada gota, ver Anexo B.

Nota: Los resultados reportados corresponden al período de monitoreo: 17-12-2015 al 08-06-2016. Sin embargo, es importante destacar que todas las gotas siguen siendo supervisadas regularmente.

6.5.1. Oligonucleótidos empleados

Los oligonucleótidos utilizados en los ensayos de cristalización se encontraban preparados y disponibles en el laboratorio del grupo de investigación MACROM en la ETSEIB. Sus características se presentan a continuación en la Tabla 6.9.

Tabla 6.9. Oligonucleótidos empleados en los ensayos de cristalización

Secuencia	Masa Molecular (Da)	Coefficiente Extinción (l/mmol.cm)	Concentración (mM)	Nº ensayos realizados
AATTTAAATT	6050,20	105,2	3,787	36
ATAATATTAT	6050,20	109,2	2,515	8
ATTAATTAAT	6050,20	107,2	5,275	10
ATTTATAAAT	6050,20	107,2	5,614	12
AATAATTATT	6050,20	107,2	5,220	12
GGGAAATTTCCC	7290,00	114,9	2,750	28

Las secuencias utilizadas son ricas en AT, debido a que el fármaco a analizar está destinado a actuar frente a enfermedades como la malaria (el genoma del *Plasmodium falciparum* es 80% AT) y la tripanosomiasis (el kADN de *Trypanosoma brucei* es más de 70% AT) (ver 4.3.1).

6.5.2. Condiciones de cristalización

Las condiciones generales de cristalización escogidas provienen de ensayos exitosos realizados anteriormente por el grupo MACROM con fármacos y proteínas similares. Las condiciones utilizadas son las presentadas a continuación:

- Temperatura: las gotas fueron realizadas en un cuarto de temperatura controlada a 20 °C. Las gotas de fármacos se almacenaron a 13 °C, mientras que las de proteínas se guardaron a 4 °C. Durante el monitoreo de las mismas, se tomaron

precauciones, como mantenerlas en hielo y revisarlas en cuartos de temperatura controlada, para evitar que fuesen afectadas por cambios de temperatura.

- Volumen de gota: en su mayoría, las gotas tienen un volumen de 4 μ l. Se agregaron 2 μ l de solución de cristalización y 2 μ l del complejo fármaco-oligonucleótido o proteína-oligonucleótido dependiendo del caso. En el caso de gotas de volumen de 3 μ l, sólo se agregó 1 μ l de solución de cristalización.
- Tiempo de incubación: los complejos fármaco-oligonucleótido fueron incubados por 3 horas antes de la realización de la gota, mientras que los de proteína-oligonucleótido recibieron una incubación o/n. La incubación se realizó en hielo y en una cámara fría a 4 °C.
- Soluciones de cristalización: la selección de las soluciones utilizadas se hizo considerando concentraciones bajas de sales, para evitar su competencia con los grupos positivos de la proteína en la unión con el oligonucleótido; y para evitar la formación de cristales de sal. Ver Anexo B, sección B.1 y B.2 para más detalles de la composición de las soluciones de cristalización.
 - o pH: el pH de las gotas de fármaco-oligonucleótido corresponde a 6 para todas las soluciones de cristalización. En el caso de la proteína, se probó pH 6 y 7,5 de acuerdo a la solución usada, para mantenerse alrededor del pH neutro. También se probó una condición más extrema con pH 9 para intentar replicar un caso de éxito obtenido previamente [43].
 - o Sales: se utilizaron las sales $MgCl_2$, $MgAC$ (AC: acetato), $MnCl_2$ y NH_4AC , de concentración entre 16 y 20 mM para el caso de fármacos. Para proteínas sólo se utilizó $MgCl_2$ entre 20 y 25 mM. Todas las soluciones de cristalización contienen además NaCac.
 - o Agente reductor: para prevenir la oxidación de las proteínas y su posible agregación, se agregó como agente reductor el DTT. Se hicieron también dos pruebas para la proteína NHP6A usando TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina) como reductor.
- Precipitante: el precipitante usado para las gotas de fármaco-oligonucleótido fue MPD (2-metil-2,4-pentanodiol), empezando siempre con una concentración en pozo

del 20%. En el caso de las gotas de proteína-oligonucleótido, en su mayoría se utilizó MPD, empezando con una concentración del 30%. En el caso concreto de la NHP6A, en unos casos se utilizó también PEG 8000 al 20% para intentar replicar un caso de éxito previo [43].

- **Relaciones molares:** Se utilizaron relaciones molares de fármaco-oligonucleótido 1:1, 2:1 y 4:1; 1:1 y 2:1 para HMGB1 box B-oligonucleótido; y 2:1, 3:1 y 6:1 de NHP6A-oligonucleótido. Las relaciones molares 4:1 y 6:1 se usaron en pruebas para determinar si el aumento de concentración favorecía la formación de cristales.

6.5.3. Proteína HMGB1 Box B

Se han realizado 20 gotas con la proteína HMGB1 box B, probando dos oligonucleótidos diferentes, AATTTAAATT y GGGAAATTTCCC. El stock de proteína utilizado corresponde a una purificación previa de concentración 4,03 mM. La Tabla 6.10 muestra un resumen de las condiciones utilizadas.

Tabla 6.10. Condiciones de las gotas de la proteína HMGB1 box B

Oligonucleótido	Gotas	Relación molar (oligonucleótido-proteína)	Solución de cristalización*	Precip
AATTTAAATT	FH1 - FH5	1:1	T6 (10 mM MgCl ₂ , pH 7,5) T9 (12,5 mM MgCl ₂ , pH 7,5), C6 (10 mM MgCl ₂ , pH 6) C9 (12,5 mM MgCl ₂ , pH 6) Matrx 15 (40 mM MgCl ₂ , pH 6)	MPD
	FH6 - FH10	2:1		
GGGAAATTTCCC	FH11 - FH15	1:1		
	FH16 - FH20	2:1		

* Ver Anexo B, sección B.1 y B.2 para más detalles de la composición de las soluciones de cristalización.

Todas las series de gotas tuvieron como volumen final 4 µl. Los resultados obtenidos con cada serie de gotas realizada se presentan a continuación:

Gotas FH1 – FH5

En esta serie de gotas se formaron numerosos cristales entre 40% y 48% de concentración de precipitante en el pozo.

En las gotas FH1 y FH4 se formaron cristales rectangulares de pequeño tamaño a una concentración de precipitante del 48%. Particularmente, en ambas gotas apareció un cristal de gran tamaño y bordes muy bien definidos (bien facetado y birrefringente, pendiente de congelar). Los cristales fueron aumentando de tamaño a medida que pasaba el tiempo. Se realizó un lento aumento de la concentración del pozo que corrigió la superficie no

homogénea que presentaban.

En las gotas FH2 y FH5 se formaron cristales rectangulares de pequeño tamaño a una concentración del 42% y del 40%, respectivamente. Se fue aumentando lentamente la concentración de precipitante para favorecer el crecimiento de los cristales y volverlos más homogéneos. Los cristales mejor facetados y birrefringentes quedan pendientes de congelar. La evolución de estas gotas puede verse en la Figura 6.14.

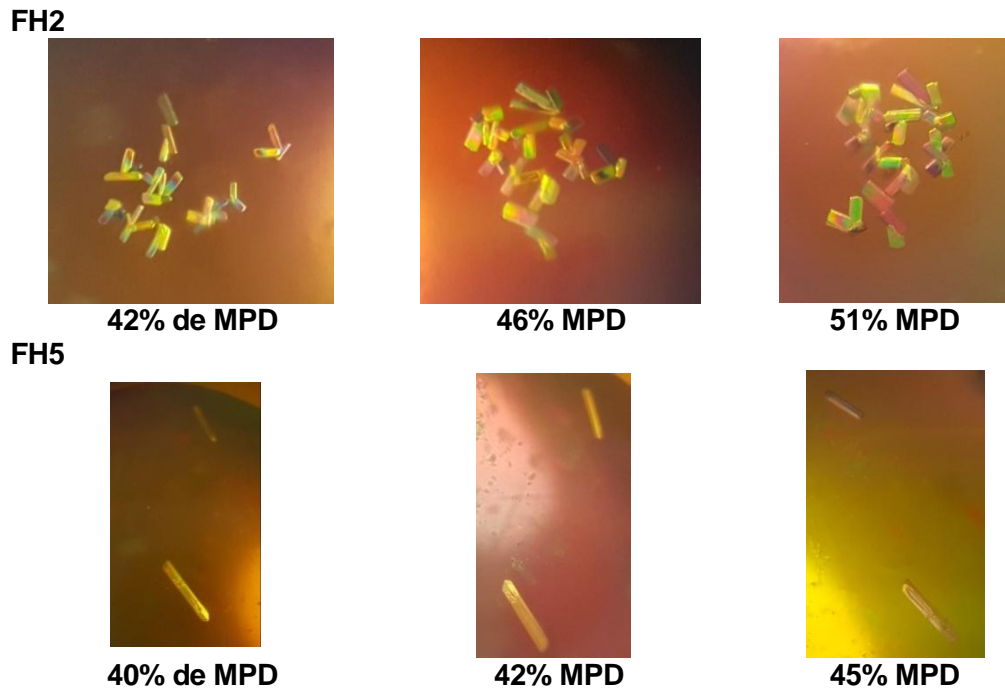


Figura 6.14. Evolución de los cristales en las gotas FH2 (arriba) y FH5 (abajo)

En la gota FH3 aparecieron numerosos cristales rectangulares de tamaño pequeño a una concentración de precipitante en el pozo de 56%.

Gotas FH6 – FH10

Esta serie de gotas contiene las mismas condiciones que la serie anterior pero con una relación proteína-oligonucleótido de 2:1.

En las gotas FH6, FH7 y FH10 se formaron cristales rectangulares de tamaño mediano a concentraciones de pozo entre el 46% y el 50%. Particularmente, en la gota FH7 apareció un cristal de gran tamaño y bordes muy bien definidos (bien facetado y birrefringente). Se fue aumentando lentamente la concentración de precipitante para favorecer el crecimiento de los cristales y volverlos más homogéneos. En estas gotas (FH6, FH7 y FH10) quedan

cristales pendientes de congelar.

Las gotas FH8 y FH9 no evolucionaron favorablemente. La gota FH9 se mantuvo clara a una concentración de precipitante en el pozo mayor al 40%. La gota FH8 presentó separación de fases que no evolucionó.

Gotas FH11 – FH15

Estas gotas corresponden a las mismas condiciones de la serie FH1 - FH5 usando el oligonucleótido GGGAAATTTCCC. A partir de concentraciones de precipitante en el pozo por encima de 30%, todas presentaron separación de fases que no evolucionó favorablemente.

Gotas FH16 – FH20

Análogamente, estas gotas corresponden a las mismas condiciones de la serie FH6 - FH10 pero con el oligonucleótido GGGAAATTTCCC. Esta serie no evolucionó favorablemente. Las gotas FH16-FH20 presentaron separación de fases que no evolucionó favorablemente, a pesar de continuos aumentos de la concentración de precipitante en el pozo. Particularmente, la gota FH20 presentó una pequeña cantidad de precipitado cristalino.

Consideraciones finales sobre los ensayos con la proteína HMGB1 box B

- Se obtuvo cristales sólo en los ensayos con el oligonucleótido AATTTAAATT y en las dos relaciones molares proteína-oligonucleótido (1:1 y 2:1).
- Soluciones de cristalización con mejores resultados: **T6** (10 mM MgCl₂, pH 7,5), **T9** (12,5 mM MgCl₂, pH 7,5), **C9** (12,5 mM MgCl₂, pH 6) y **Natrix nº 15** (40 mM MgCl₂, pH 6). No se observó diferencia en los resultados para concentraciones de MgCl₂ de 10 y 12,5 mM en gota.
- Porcentaje de precipitante en el pozo al que aparecieron los cristales: 42% a 56%.

6.5.4. Proteína NHP6A

Se han realizado 28 gotas con la proteína NHP6A, probando tres oligonucleótidos diferentes, el AATTTAAATT, ATTAATTAAT y GGGAAATTTCCC. La Tabla 6.11 muestra un resumen de las condiciones utilizadas.

Tabla 6.11. Condiciones de las gotas de la proteína NHP6A

Oligonucleótido	Gotas	Relación molar (oligonucleótido-proteína)	Solución de cristalización	Precip
AATTTAAATT	FN1 - FN5	2:1	T6 (10 mM MgCl ₂ , pH 7,5) T9 (12,5 mM MgCl ₂ , pH 7,5) C6 (10 mM MgCl ₂ , pH 6) C9 (12,5 mM MgCl ₂ , pH 6) Natrix 15 (40 mM MgCl ₂ , pH 6)	MPD
	FN6 - FN10	3:1		
	FN11	3:1	C2 (100mM MgCl ₂ , pH 9)	PEG 8000
AATTTAAATT	FN12	3:1	C2 (100mM MgCl ₂ , pH 9) + TCEP	MPD
	FN25	3:1		
	FN26	6:1	T9 (12,5 mM MgCl ₂ , pH 7,5)	
GGGAAATTTCCC	FN13 - FN17	2:1	T6 (10 mM MgCl ₂ , pH 7,5) T9 (12,5 mM MgCl ₂ , pH 7,5) C6 (10 mM MgCl ₂ , pH 6) C9 (12,5 mM MgCl ₂ , pH 6) Natrix 15 (40 mM MgCl ₂ , pH 6)	MPD
	FN18 - FN22	3:1		
	FN23	3:1	C2 (100mM MgCl ₂ , pH 9)	PEG 8000
	FN24	3:1	C2 (100mM MgCl ₂ , pH 9) + TCEP	
ATTAATTAAT	FN27	3:1	T9 (12,5 mM MgCl ₂ , pH 7,5)	MPD
	FN28	6:1		

* Ver Anexo B, sección B.1 y B.2 para más detalles de la composición de las soluciones de cristalización.

Los volúmenes de las gotas FN1 - FN24 son de 4 µl, mientras que las gotas FN25 - FN28 son de 3 µl. Los resultados obtenidos con cada serie de gotas realizada se presentan a continuación:

Gotas FN1 – FN5

En esta serie de gotas se formaron numerosos cristales entre 40% y 54% de concentración de precipitante en el pozo.

En la gota FN1 se formaron tres cristales de gran tamaño que se volvieron más grandes y uniformes al aumentar lentamente la concentración de precipitante en el pozo (bien facetados y birrefringentes, pendientes de congelar). La gota FN3 presentó cinco cristales delgados a una concentración de precipitante en el pozo del 54%.

En la gota FN2 (Figura 6.15), se formaron dos cristales inicialmente (uno rectangular y otro en forma de aguja) y aparecieron más con el tiempo (rectangulares de pequeño tamaño). Se aumentó muy lentamente la concentración de precipitante en el pozo, mejorando el tamaño

de los cristales y volviéndolos más homogéneos (de acuerdo a su evolución, 2 a 4 cristales pendientes por congelar). Este fue el mismo caso de las gotas FN1 y FN4.

En la gota FN5 (solución de cristalización Natrix nº 15), se formaron 4 cristales de diferentes tamaños que partían del mismo punto y crecían en diferentes direcciones (Figura 6.15). Con el pasar del tiempo mejoraron en tamaño y homogeneidad. Se aumentó lentamente la concentración de precipitante con lo que se mejoró la superficie de los mismos.

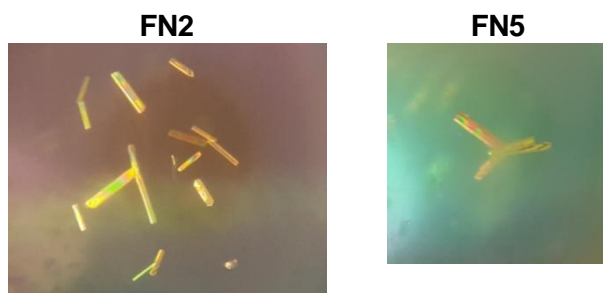


Figura 6.15. Cristales de la gota FN2 (izquierda) y gota FN5 (derecha)

Gotas FN6 – FN10

Esta serie de gotas contiene las mismas condiciones que la serie anterior pero con una relación proteína-oligonucleótido de 3:1.

En la gota FN7 se formaron alrededor de 15 cristales delgados y de tamaño pequeño a una concentración de precipitante en el pozo del 56%. En la gota FN10 aparecieron dos cristales pequeños a una concentración de precipitante en el pozo del 59%.

La gota FN9 mostró pequeñas cantidades de precipitado cristalino a concentraciones de precipitante en el pozo entre 44% y 48%. Las gotas FN6 y FN8 se mantuvieron claras a concentraciones de precipitante en el pozo mayores al 50%.

Gotas FN11 – FN12

Las gotas de esta serie usan PEG 8000 como precipitante en el pozo y una relación proteína oligonucleótido de 3:1. Además, se realizaron con la solución de cristalización C2 a un pH de 9. Se empezó con un 20% de concentración de precipitante y se fue aumentando progresivamente hasta concentraciones cercanas al 50%.

La gota FN11 mostró separación de fases desde su creación pero no evolucionó positivamente.

A la gota FN12 se le agregó TCEP (agente reductor más estable que el DTT) en la solución de cristalización. A partir de una concentración de precipitante en el pozo del 38%, se formaron pequeños precipitados cristalinos (Figura 6.16) por toda la gota que no evolucionaron favorablemente.

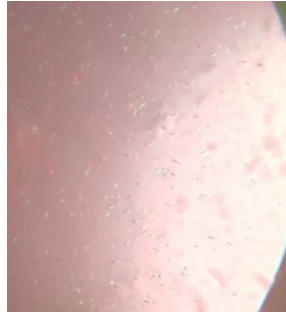


Figura 6.16. Precipitado cristalino en la gota FN12

Gotas FN13 – FN17

Estas gotas imitan las condiciones de la serie FN1 - FN5 usando el oligonucleótido GGGAAATTTCCC. Sin embargo, con este oligonucleótido, no se obtuvieron cristales. Así a concentraciones de precipitante en el pozo por encima de 30%, todas las gotas presentaron separación de fases que no evolucionó favorablemente.

Gota FN18 – FN22

Esta serie de gotas contiene las mismas condiciones que la serie anterior pero con una relación proteína-oligonucleótido de 3:1. A concentraciones de precipitante en el pozo por encima de 50%, todas las gotas presentaron separación de fases que no evolucionó favorablemente.

Gota FN23 – FN24

Estas gotas imitan las condiciones de las FN11 y FN12 usando el oligonucleótido GGGAAATTTCCC. Todas las gotas presentaron separación de fases a concentraciones de precipitante en el pozo por encima de 30%, pero no evolucionaron favorablemente (Figura 6.17).



Figura 6.17. Ejemplo de separación de fases – Gota FN23

Gota FN25 – FN26

El volumen de las gotas de esta serie es de 3 μ l. Las concentraciones de precipitante en el pozo se llevaron por encima de 40% pero las gotas no evolucionaron favorablemente.

La gota FN25, con una relación molar proteína-oligonucleótido de 3:1 presentó una mínima cantidad de precipitado cristalino; mientras que la gota FN26 con una relación molar de 6:1 se mantuvo clara.

Gota FN27 – FN28

El volumen de las gotas de esta serie es de 3 μ l y se realizó usando el oligonucleótido ATTAATTAAT. Al igual que la serie anterior, la concentración de precipitante en los pozos se llevó por encima de 40% pero las gotas no evolucionaron favorablemente.

La gota FN27, con una relación molar proteína-oligonucleótido de 3:1 se mantuvo clara; mientras que la gota FN28 con una relación molar de 6:1 presentó una mínima cantidad de precipitado cristalino.

Consideraciones finales sobre los ensayos con la proteína NHP6A

- Se obtuvo cristales sólo en los ensayos con el oligonucleótido AATTTAAATT a una relación molar de proteína-oligonucleótido de 2:1.
- Soluciones de cristalización con mejores resultados: **T6** (10 mM $MgCl_2$, pH 7,5), **T9** (12,5 mM $MgCl_2$, pH 7,5), **C9** (12,5 mM $MgCl_2$, pH 6) y **Natrix nº 15** (40 mM $MgCl_2$, pH 6). No se observó diferencia en los resultados para concentraciones de $MgCl_2$ de 10 y 12,5 mM en gota.
- Porcentaje de precipitante en el pozo al que aparecieron los cristales: 42% a 59%.

6.5.5. Fármaco CRMV50

Se han realizado 58 gotas con el fármaco CRMV50, probando seis oligonucleótidos diferentes, el AATTTAAATT, ATAATATTAT, ATTAATTAAT, ATTTATAAAT, AATAATTATT y el GGGAAATTTCCC. La Tabla 6.12 muestra un resumen de las condiciones utilizadas.

Tabla 6.12. Condiciones de las gotas de fármaco CRMV50

Oligonucleótido	Gotas	Relación molar (oligonucleótido -proteína)	Solución de cristalización*	Precip
AATTTAAATT	F1 - F6	1:1	D1 (8 mM MnCl ₂ , pH 6) D2 (10 mM MgAC, pH 6)	MPD
	F7 - F12	2:1		
ATTTATAAAT	F13 - F18	1:1	D3 (8 mM MgCl ₂ , pH 6) D4 (10 mM NH ₄ AC, pH 6)	MPD
	F19 - F24	2:1		
AATAATTATT	F25 - F30	1:1	D2.2 (8 mM MgAC, pH 6) D4.2 (8 mM NH ₄ AC, pH 6)	
	F31 - F36	2:1		
ATTAATTAAT	F37 - F40	2:1	D1 (8 mM MnCl ₂ , pH 6) D2 (10 mM MgAC, pH 6)	
	F41 - F44	4:1		
ATAATATTAT	F45 - F48	2:1	D3 (8 mM MgCl ₂ , pH 6) D4 (10 mM NH ₄ AC, pH 6)	
	F49 - F52	4:1		
GGGAAATTTCCC	F53 - F55	4:1	D2.2 (8 mM MgAC, pH 6) D4.2 (8 mM NH ₄ AC, pH 6) Natrix 15 (40 mM MgCl ₂ , pH 6)	
	F56 - F58	6:1		

* Ver Anexo B, sección B.1 y B.2 para más detalles de la composición de las soluciones de cristalización.

Todas las series de gotas tuvieron como volumen final 4 µl. Las soluciones de cristalización empleadas son soluciones adaptadas (Anexo B.2), y en el caso del oligonucleótido GGGAAATTTCCC, también se usó una solución de cristalización comercial Natrix nº 15 (Anexo B.1). Los resultados obtenidos con cada serie de gotas realizada se presentan a continuación:

Gotas F1 – F6

Las gotas F1 y F3 mostraron precipitado cristalino a una concentración de precipitante en el pozo alrededor del 30%. En la gota F1, el precipitado se unió formando un disco; mientras que en la gota F3, apareció una separación de fases.

En las gotas F2 y F4 aparecieron cristales no homogéneos, de tamaño pequeño y mediano, pero se fundieron rápidamente al aumentar la concentración de precipitante en el pozo, con la intención de hacerlos más uniformes. Las soluciones de cristalización usadas contienen

acetato de magnesio y acetato de amonio, respectivamente.

En la gota F5, se dieron numerosos microcristales y apareció cristal líquido. A pesar de aumentar gradualmente la concentración de precipitante en el pozo hasta 40%, no se logró favorecer el crecimiento de los cristales pequeños ni la mejora del cristal líquido.

Gotas F7 – F12

En la gota F7 se formaron numerosas agujas que no evolucionaron a pesar de numerosas variaciones en la concentración de precipitante en el pozo.

Las gotas F8, F9 y F11 presentaron agujas muy delgadas en toda la superficie de la gota () a partir de una concentración de precipitante en el pozo de 25%. En las gotas F8 y F11 también aparecieron cristales rectangulares pequeños y delgados, pero se fundieron rápidamente al variar la concentración de MPD.



Figura 6.18. Ejemplo de agujas (Gota F11)

En las gotas F10 y F12 se capturó un cristal y dos cristales, respectivamente. Las soluciones de cristalización de estas gotas contienen la sal acetato de amonio, a una concentración de 10 mM en gota para la F10 y de 8 mM para la F12. En la gota F10 se formaron cristales grandes y no homogéneos que se unieron y se fundieron. Al aumentar la concentración de precipitante en el pozo, aparecieron dos cristales delgados de bordes definidos (Figura 6.19) y uno de ellos fue capturado. En la gota F12 aparecieron cristales grandes y no homogéneos que fueron mejorando a medida que aumentaba la concentración del pozo. Se les agregó un 5% de isopropanol para mejorar su brillo y dos de ellos fueron capturados (Figura 6.19).

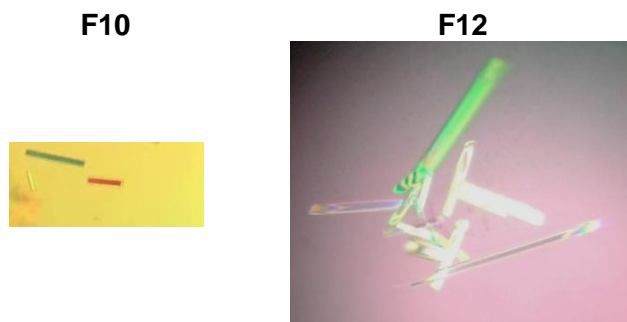


Figura 6.19. Gotas con cristales capturados – Gota F10 y Gota F12

Todos los cristales pescados fueron mantenidos en nitrógeno líquido hasta su difracción.

Gotas F13 – F18

Esta serie de gotas imita las condiciones de la serie F1 - F6 con el oligonucleótido ATTTATAAAT. En las gotas F13 y F14 se formó precipitado cristalino que no evolucionó favorablemente. En las F15 y F16 se formaron cristales pequeños que se fundieron a pesar de aumentar la concentración de precipitante en el pozo.

La gota F17 presentó precipitado cristalino a una concentración del 25%. Al aumentar la concentración del pozo hasta 36%, se formó cristal líquido (Figura 6.20) y a una concentración de 44% aparecieron numerosos microcristales.

En la gota F18 aparecieron varios cristales rectangulares, pequeños y delgados que no evolucionaron al modificar la concentración de precipitante en el pozo. Debido a que esta serie tiene una relación molar de fármaco-oligonucleótido 1:1, se probó agregar directamente en la gota suficiente fármaco para alcanzar una relación 2:1. Sin embargo, esto no tuvo resultados positivos.

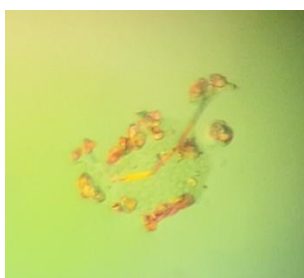


Figura 6.20. Ejemplo de cristal líquido – Gota F17

Gotas F19 – F24

Esta serie de gotas tiene una relación molar de fármaco-oligonucleótido 2:1. Pese a tener

una concentración mayor de fármaco, no se obtuvieron resultados favorables.

En particular la gota F21 mostró cristal líquido que no evolucionó; y la gota F23, a una concentración de precipitante en el pozo de 45% formó microcristales en la parte superior de la gota.

Gotas F25 – F30

Esta serie de gotas imita las condiciones de la serie F1 - F6 con el oligonucleótido AATAATTATT. Las gotas F25 y F27 formaron precipitado amorfo; mientras que en las gotas F26 y F28 se formaron cristales pequeños que se fundieron rápidamente al aumentar la concentración de precipitante en el pozo.

En el caso de la gota F29, apareció una gran cantidad de cristal líquido a una concentración de 30% de precipitante en el pozo, seguido de muchos microcristales en el borde de la gota (Figura 6.21).

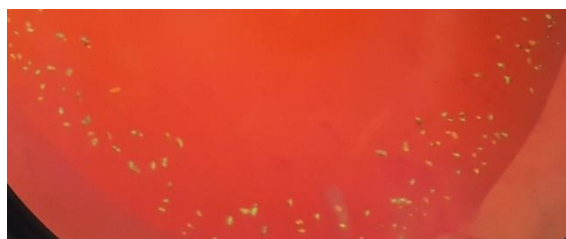


Figura 6.21. Ejemplo de microcristales – Gota F29

Gotas F31 – F36

Los resultados de estas gotas son muy similares a la serie anterior. La gota F31 formó precipitado amorfo, las gotas F32 - F34 presentaron cristales pequeños que se fundieron rápidamente al aumentar la concentración de precipitante en el pozo y la gota F35 formó precipitado cristalino.

Específicamente, la gota F36 formó precipitado cristalino a una concentración de precipitante en el pozo de 35%. Sin embargo, al aumentar dicha concentración, se formaron muchas agujas delgadas en toda la superficie de la gota, que no evolucionaron positivamente.

Gotas F37 – F40

Esta serie de gotas se realizó con una relación molar de 2:1 de fármaco-oligonucleótido, con el ATTAATTAAT. Se obtuvo separación de fases en todas las gotas. En la gota F38 también apareció precipitado amorfo; mientras que en las gotas F39 y F40 apareció precipitado cristalino que no avanzó favorablemente.

Gotas F41 – F44

En las gotas F41 - F44 se probó una relación molar más alta (4:1) que en la serie F38 - F41, para estudiar si con este aumento se facilitaba la cristalización. Se logró obtener microcristales en las gotas F42 y F43, pero en las gotas F41 y F44 no se obtuvieron resultados positivos.

Gotas F45 – F48

Esta serie de gotas se realizó con una relación molar de 2:1 de fármaco-oligonucleótido, con el ATAATATTAT. Se obtuvo separación de fases en las gotas F45, F46 y F48, acompañado de precipitado cristalino y microcristales respectivamente, para las gotas F45 y F46.

En la gota F47 se formó una gran cantidad de precipitado amorfo (Figura 6.22) que no evolucionó, a pesar de numerosos cambios en la concentración del pozo.

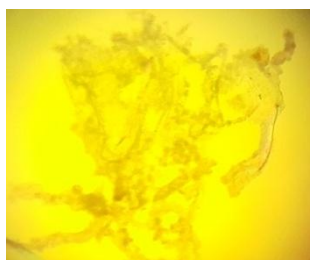


Figura 6.22. Ejemplo de precipitado amorfo – Gota F47

Gotas F49 – F52

En las gotas F49 - F52 se probó una relación molar más alta (4:1) que en la serie F45 - F48, para estudiar si con este aumento se facilitaba la cristalización. Se logró obtener cristales muy pequeños en la gota F50 pero en el resto de las gotas se obtuvo precipitado amorfo y separación de fases que no evolucionó.

Gotas F53 – F55 y F56 – F58

En esta serie de gotas se intentó repetir las condiciones exitosas de cristalización encontradas anteriormente (soluciones de cristalización con la sal acetato de amonio y la solución Natrix nº 15). Se usó el oligonucleótido GGGAAATTTCCC, a una relación molar de 4:1 (Gotas F53 - F55) y de 6:1 (Gotas F56 - F58). Se utilizó una concentración mayor de fármaco para intentar facilitar la formación del complejo.

Sin embargo, en ambos grupos de gotas se obtuvo abundante precipitado amorfo, a pesar de variar la concentración de precipitante en el pozo en numerosas ocasiones.

Consideraciones finales sobre los ensayos con el fármaco CRMV50

- Se obtuvo cristales en los ensayos con los oligonucleótidos AATTTAAATT, ATTAATTAAT, ATTTATAAAT y AATAATTATT a relaciones molares de 1:1, 2:1 y 4:1 (este último sólo en el caso del ATTAATTAAT). Sin embargo, los únicos cristales que crecieron hasta un tamaño adecuado y tuvieron una superficie homogénea, se dieron con el AATTTAAATT a una relación molar fármaco-oligonucleótido de 2:1.
- Soluciones de cristalización con mejores resultados: **D2** (10 mM MgAC, pH 6), **D2.2** (8 mM MgAC, pH 6), **D4** (10 mM NH₄AC, pH 6) y **D4.2** (8 mM NH₄AC, pH 6). Estas soluciones tienen en común la presencia del ión acetato, teniendo la serie D2 acetato de magnesio y la D4, acetato de amonio. Se observó que los cristales de mayor tamaño se dieron con la solución D4.2, con una concentración de sal en la gota de 8 mM.
- Porcentaje de precipitante en el pozo al que aparecieron los cristales: 23% a 39%.

Se han podido pescar tres cristales del complejo fármaco-ADN (CRMV50-AATTTAAATT), 12 cristales del complejo HMGB1 box B-AATTTAAATT y 9 cristales del complejo NHP6A-AATTTAAATT.

Las condiciones en las que se formaron los cristales mencionados se presentan a continuación (Tabla 6.13).

Tabla 6.13. Condiciones de cristalización que produjeron cristales grandes, bien facetados y birrefringentes

Nº Cristal	Gota	Proteína/ fármaco	Oligonucleótido	Relación molar	Solución de cristalización	
F10-1	F10	CRMV50	AATTTAAATT	2:1	D4	25 mM NaCac, 10 mM NH ₄ AC, pH 6
F12-1	F12				D4.2	25 mM NaCac, 8 mM NH ₄ AC, pH 6
F12-2						
FH1-1	FH1	HMGB1 box B	AATTTAAATT	1:1	T6	25 mM Tris, 10 mM MgCl ₂ , pH 7,5
FH2-1	FH2				T9	25 mM Tris, 12,5 mM MgCl ₂ , pH 7,5
FH2-2						
FH4-1	FH4				C9	25 mM NaCac, 12,5 mM MgCl ₂ , pH 6
FH5-1	FH5				Natrix 15	25 mM NaCac, 20 mM MgCl ₂ , pH 6
FH5-2						
FH6-1	FH6					
FH7-1	FH7	HMGB1 box B	AATTTAAATT	2:1	T6	25 mM Tris, 10 mM MgCl ₂ , pH 7,5
FH7-2					T9	25 mM Tris, 12,5 mM MgCl ₂ , pH 7,5
FH7-3						
FH10-1	FH10				Natrix 15	25 mM NaCac, 20 mM MgCl ₂ , pH 6
FH10-2						
FN1-1	FN1	NHP6A	AATTTAAATT	2:1	T6	25 mM Tris, 10 mM MgCl ₂ , pH 7,5
FN1-2						
FN2-1	FN2				T9	25 mM Tris, 12,5 mM MgCl ₂ , pH 7,5
FN2-2						
FN4-1	FN4				C9	25 mM NaCac, 12,5 mM MgCl ₂ , pH 6
FN4-2						
FN5-1	FN5				Natrix 15	25 mM NaCac, 20 mM MgCl ₂ , pH 6
FN7-1	FN7					
FN10-1	FN10	NHP6A	AATTTAAATT	3:1	T9	25 mM Tris, 12,5 mM MgCl ₂ , pH 7,5
					Natrix 15	25 mM NaCac, 20 mM MgCl ₂ , pH 6

6.6. Análisis de los resultados de difracción

Después de realizar los ensayos de cristalización, se congelaron y difractaron 24 cristales: 12 cristales del complejo HMGB1 box B - ADN, 9 cristales del complejo NHP6A - ADN y 3 cristales del complejo CRMV50 - ADN en la línea de macromoléculas (XALOC), del sincrotrón ALBA de Barcelona.

Los parámetros de difracción utilizados durante la recogida de los datos se presentan en la Tabla 6.14.

Tabla 6.14. Parámetros de cristalización

Parámetro	Valor
Ángulo de oscilación	2-3°
Distancia entre el cristal y el detector	410-450 mm
Ángulo total girado por el goniómetro	180°
Número de diagramas de difracción	60-90
Longitud de onda del rayo X	0,97947 Å
Tiempo de exposición por imagen	0,15-0,55 s

Cada cristal se colocó de modo que el punto de incidencia de la radiación fuese en una zona representativa y sin imperfecciones. Una vez hecho esto, se generaron los diagramas de difracción.

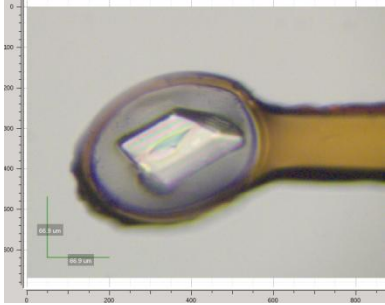
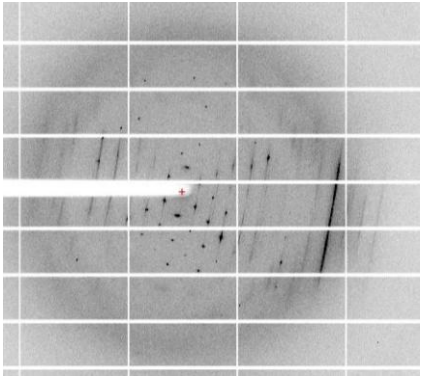
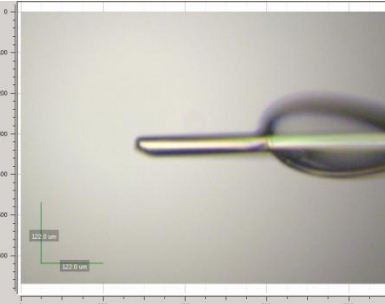
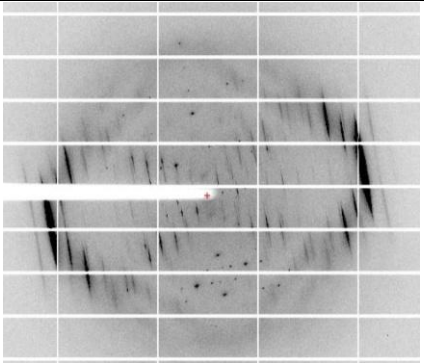
El grado de orden de los cristales se corresponde con la cantidad de reflexiones que aparecen en el diagrama de difracción. A medida que se tenga un mayor número de reflexiones, se dispondrá de más información acerca de la estructura de la molécula. Las reflexiones más próximas al centro representan las distancias más grandes dentro del cristal, mientras que las que se encuentran en la periferia indican las distancias más cortas. 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.

Los diagramas de difracción con calidad suficiente para ser procesados permitieron predecir las características básicas más probables de la estructura de los complejos (celdilla unitaria y grupo espacial). El tratamiento de los datos obtenidos en los diagramas de difracción se inició utilizando el programa *iMosflm*. Este programa realizó el indexado de las reflexiones y propuso una celdilla unitaria que cumple con el patrón de difracción. Usando el programa *Pointless*, se procesaron los datos obtenidos del primer indexado y se predijo el grupo espacial más probable.

6.6.1. Proteína HMGB1 box B

En la Tabla 6.15 se observan ejemplos de los cristales obtenidos a partir de los ensayos cristalográficos de la proteína HMGB1 box B y el oligonucleótido AATTTAAATT y sus correspondientes diagramas de difracción.

Tabla 6.15. Difracción de cristales de proteína HMGB1 box B-ADN

Nº Cristal	Imagen	Diagrama de difracción
FH7-2		
FH10-1		

Los parámetros de la celdilla unitaria y el grupo espacial asignado a cada uno de los cristales con diagramas de difracción con calidad suficiente para ser procesados, se presentan a continuación (Tabla 6.16).

Tabla 6.16. Celdilla unitaria y grupo espacial

Nº Cristal	a	b	c	α	β	γ	Grupo espacial
FH2-1	43,382	43,382	194,937	90	90	120	R3 ₂
FH2-2	75,112	43,244	69,586	90	111	90	C2
FH5-1	76,926	44,105	69,687	90	112	90	C2
FH5-2	44,050	44,050	194,357	90	90	120	R3 ₂
FH6-1	44,034	44,034	195,497	90	90	120	R3 ₂
FH7-2	43,639	43,639	194,508	90	90	120	R3 ₂
FH10-1	43,639	43,639	194,359	90	90	120	R3 ₂

En el caso del cristal FH7-2, se utilizó el programa XDS para obtener un primer modelo de la organización de las moléculas en el grupo espacial R3₂ (Tabla 6.16). Para esto se realizó un primer indexado, integrado, procesado y escalado de los datos de difracción obtenidos para este cristal.

Se realizó el remplazo molecular de un dúplex en forma B (10 pares de bases y secuencia AATTTAAATT) con el paquete de programas CCP4, específicamente con el programa *molrep*. Se encontró que la unidad asimétrica corresponde a un oligonucleótido (10 pares de bases) y que las cadenas se encuentran empaquetadas en columnas paralelas hexagonalmente (Figura 6.23).

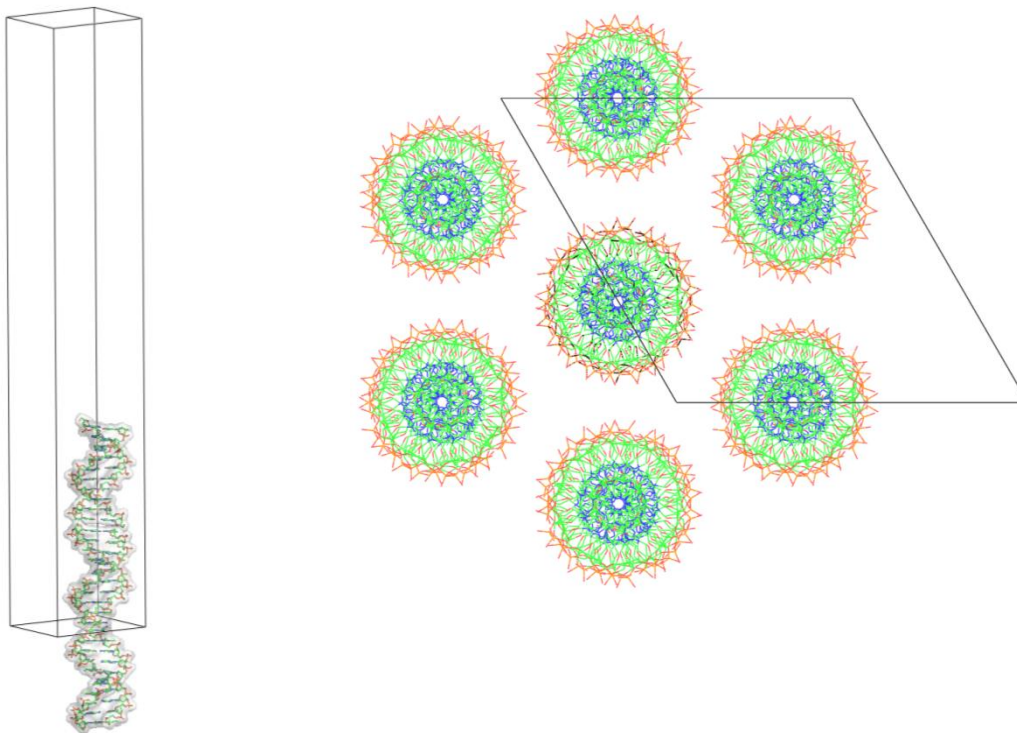


Figura 6.23. Modelo del oligonucleótido AATTTAAATT y empaquetamiento para el grupo espacial $R3_2$

Izquierda: Tres oligonucleótidos AATTTAAATT apilados en la celdilla unitaria del grupo espacial $R3_2$
($a = 43,639$, $b = 43,639$, $c = 194,508$; $\alpha = 90$, $\beta = 90$, $\gamma = 120$)

Derecha: Organización de columnas paralelas empaquetadas hexagonalmente.

Una vez culminado el remplazo, se procedió a una etapa de refinado en la que se obtuvieron los mapas de densidad electrónica y se corroboró que las cadenas se ajustan al modelo remplazado (Figura 6.24). Esto se realizó en el programa de ordenador *Coot*.

Este modelo representa un primer acercamiento a la organización del oligonucleótido AATTTAAATT. Como no se observan zonas con gran volumen de densidad electrónica en el mapa, no se pudo identificar a la proteína HMGB1 box B.

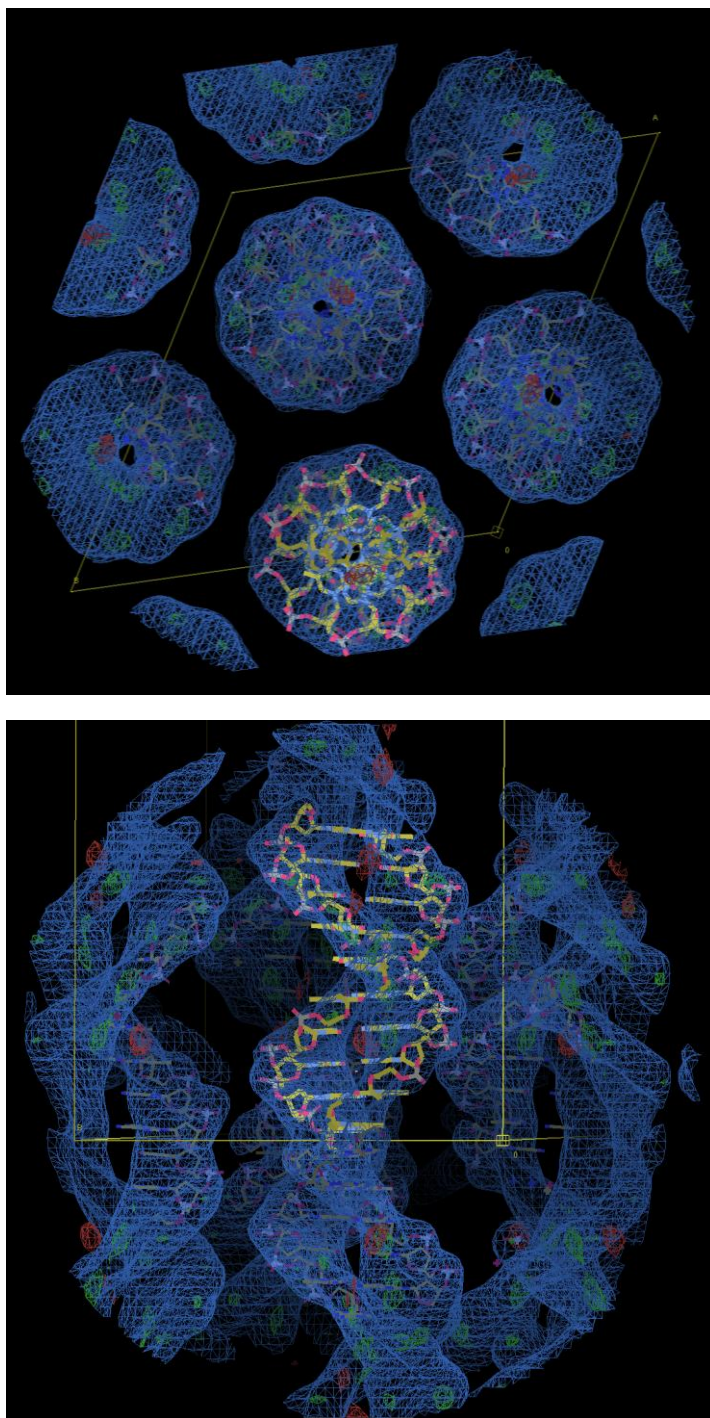


Figura 6.24. Mapa de densidad electrónica del modelo con la celdilla unitaria

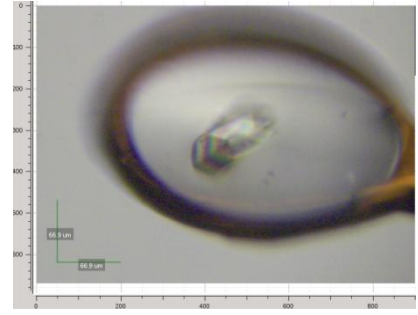
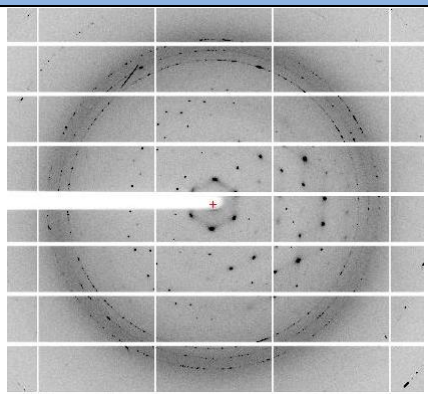
Arriba: Vista superior del modelo con su mapa de densidad electrónica.

Abajo: Vista lateral del modelo con su mapa de densidad electrónica.

6.6.2. Proteína NHP6A

En la Tabla 6.17 se observa un ejemplo de los cristales obtenidos a partir de los ensayos cristalográficos de la proteína NHP6A y el oligonucleótido AATTTAAATT y su correspondiente diagrama de difracción.

Tabla 6.17. Difracción de cristales de proteína NHP6A-ADN

Nº Cristal	Imagen	Diagrama de difracción
FN2-1		

Los parámetros de la celdilla unitaria y el grupo espacial asignado a cada uno de los cristales con diagramas de difracción con calidad suficiente para ser procesados, se presentan a continuación (Tabla 6.18).

Tabla 6.18. Celdilla unitaria y grupo espacial

Nº Cristal	a	b	c	α	β	γ	Grupo espacial
FN1-1	43,1	43,1	194,1	90	90	120	R3 ₂
FN1-2	43,8	43,8	194,5	90	90	120	R3 ₂
FN2-1	44,4	44,4	98,7	90	90	120	P622
FN4-1	44,2	44,2	194,4	90	90	120	R3 ₂
FN5-1	75,9	43,8	69,6	90	11,2	90	C2
FN7-1	43,5	43,5	194,7	90	90	120	R3 ₂

En el caso del cristal FN2-1, para comprobar que el indexado se realizó correctamente, se utilizó el programa *phenix.data_viewer*, donde se puede observar gráficamente la similitud entre las reflexiones reales y las reflexiones correspondientes al grupo espacial propuesto (P622) (Figura 6.25).

En la Figura 6.25 se pueden observar las difracciones correspondientes al apilamiento de las pares de bases del ADN. Se encuentran a una distancia de 3,28 Å, similar a la esperada de 3,4 Å para la forma B del ADN. Además, puede observarse un patrón hexagonal

(previamente observado en el diagrama de difracción de la Tabla 6.17) que sugiere que los complejos NHP6A-AATTTAAATT presentan un empaquetamiento hexagonal. Sin embargo, esta es una observación preliminar que debe ser confirmada en etapas posteriores de refinado de la estructura.

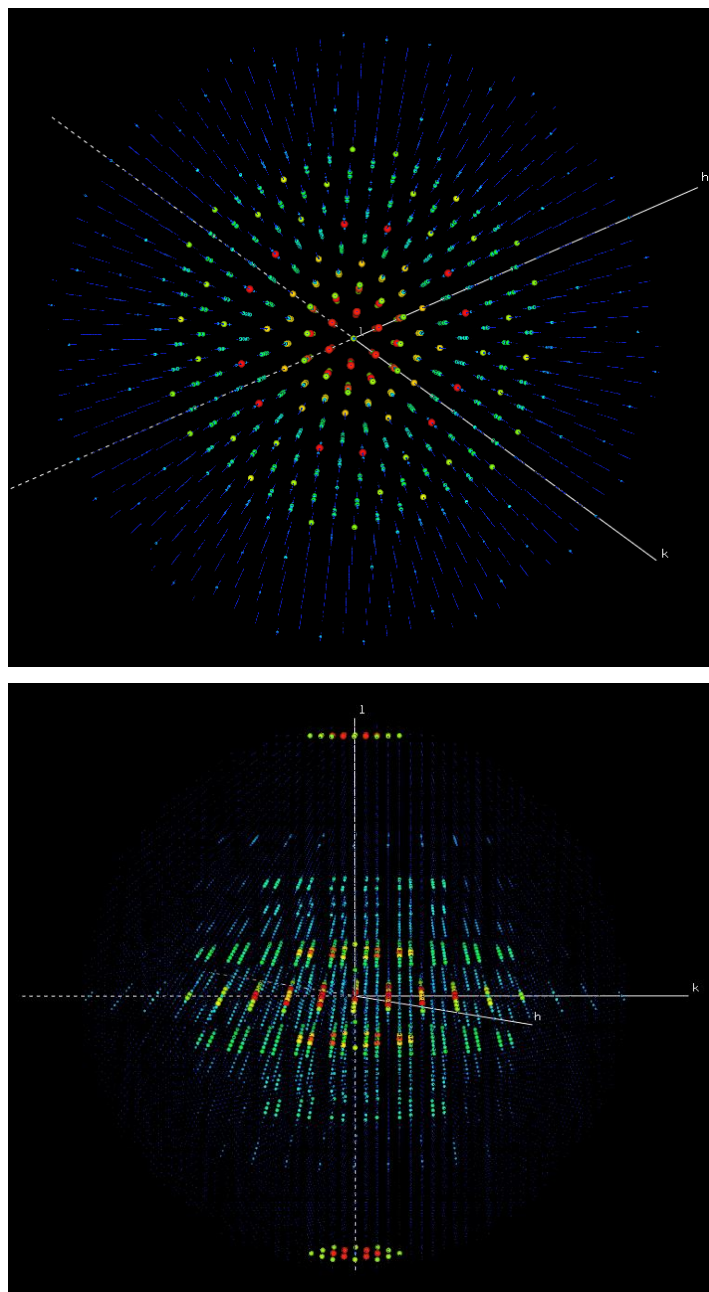


Figura 6.25. Representación gráfica del diagrama de difracción real y propuesto (en color azul)

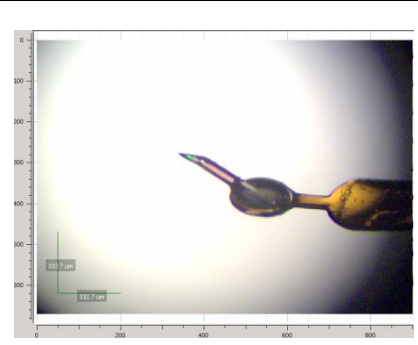
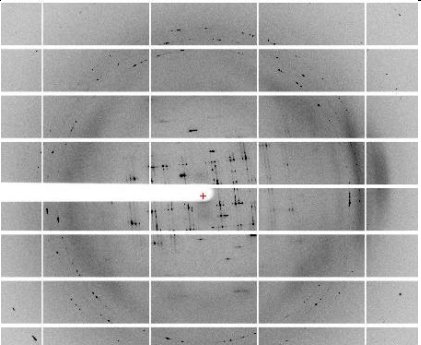
Arriba: Vista superior.

Abajo: Vista lateral.

6.6.3. Fármaco CRMV50

En la Tabla 6.19 se observa un ejemplo de los cristales obtenidos a partir de los ensayos cristalográficos del fármaco CRMV50 y el oligonucleótido AATTAAATT y su correspondiente diagrama de difracción.

Tabla 6.19. Difracción de cristales de fármaco CRMV50-ADN

Nº Cristal	Imagen	Diagrama de difracción
F12-1		

Los parámetros de la celdilla unitaria y el grupo espacial asignado a cada uno de los cristales con diagramas de difracción con calidad suficiente para ser procesados, se presenta a continuación (Tabla 6.20).

Tabla 6.20. Celdilla unitaria y grupo espacial

Nº Cristal	a	b	c	α	β	γ	Grupo espacial
F10-1	322,8	26,3	91,4	90	98	90	C2
F12-1	54,87	95,03	206,4	90	90	90	C22 ₁

Consideraciones finales sobre el análisis de los datos de difracción

En todos los diagramas de difracción analizados, se presentó como parámetros de la celdilla unitaria y grupo espacial la opción más probable indicada por el programa de indexado. Debido a que los diagramas de difracción tuvieron baja resolución, el programa de indexado sugirió varias opciones de grupo espacial que cumplieran con el patrón de difracción, correspondiendo en todos los casos a los grupos C2, R3₂ y P622. A pesar de ser diferentes, dichos grupos espaciales eran equivalentes a baja resolución, por lo que se puede decir que representaban una organización similar de las cadenas en la celdilla unitaria.

Por tanto, se encontró que independientemente del ligando probado (proteína o fármaco), el oligonucleótido AATTTAAATT se organizó en columnas paralelas empaquetadas a mayor o menor distancia. El acercamiento entre estas cadenas puede depender de la hidratación provista por las condiciones de cristalización utilizadas.

En futuros ensayos, se recomienda trabajar con relaciones molares mayores de proteína o fármaco para facilitar la formación del complejo con el ADN. Si una mayor cantidad de proteína o fármaco logra formar el complejo y ordenarse en el cristal, mejoraría la resolución de los diagramas de difracción.

Conclusiones

La proteína NHP6A se obtuvo de un cultivo de *Escherichia coli* mediante la técnica del ADN recombinante. El plásmido pRJ1228 fue utilizado para transformar a la célula anfitriona de la cepa BL21(DE3)pLysS. Esta cepa fue escogida, tras ensayos con tres cepas diferentes, por presentar un buen nivel de expresión y porque la producción de la proteína puede inducirse de forma controlada mediante IPTG.

Se llevó a cabo un fraccionamiento inicial de las proteínas presentes para obtener el extracto inicial enriquecido en NHP6A. Para ello, se realizó previamente una prueba a pequeña escala fraccionando mediante la adición de sulfato amónico y/o TCA. Se encontró que la adición de TCA hasta una concentración del 2% producía una fracción de mayor pureza que la adición de sulfato amónico. Así, se escogió trabajar agregando TCA 2% para retirar proteínas contaminantes en el precipitado y recuperar la proteína NHP6A en el sobrenadante. Sin embargo, la prueba a gran escala presentó un comportamiento diferente. Parte de la proteína precipitó y la otra parte se mantuvo en el sobrenadante. A partir de esto, se decidió purificar ambas fracciones, mediante una secuencia de cromatografías.

Se recomienda empezar por una cromatografía de intercambio catiónico, que permite eliminar la mayoría de proteínas contaminantes de origen bacteriano, y terminar con una de exclusión molecular como afinamiento. En la cromatografía de intercambio catiónico, la proteína NHP6A eluyó a una concentración entre 500-650 mM de NaCl.

Mediante los procesos de purificación y concentración de proteína NHP6A se obtuvo una muestra concentrada y con alto grado de pureza, adecuada para realizar ensayos cristalográficos.

En la etapa de concentración, parte de la proteína NHP6A logró atravesar la membrana de todos los concentradores utilizados, perdiéndose parte hacia el filtrado. Esto ocurrió a pesar de usar un MWCO conservador de 3000 para una proteína de masa molecular 10802,3 Da. De entre los diferentes modelos y tamaños de concentradores probados se vio que el concentrador Amicon Ultra - 0.5 ml MWCO 3000 es el que menor proporción de proteína perdió.

Por otro lado, se realizaron un total de 106 ensayos cristalográficos empleando la técnica de difusión de vapor en gota colgante. Entre éstos, se llevaron a cabo 28 ensayos con

complejos entre la proteína NHP6A y tres oligonucleótidos; 20 ensayos con complejos entre la proteína HMGB1 box B y dos oligonucleótidos; y 58 ensayos usando el compuesto del tipo difenilo bisimidazolinio, de unión al surco estrecho del ADN, CRMV50 y seis oligonucleótidos. Todos los oligonucleótidos empleados tienen secuencias ricas en AT.

Los ensayos cristalográficos con proteínas mostraron que las soluciones de cristalización que dieron mejores resultados son: T6 (10 mM cloruro de magnesio; 25 mM Tris; pH 7,5 en gota), T9 (12,5 mM cloruro de magnesio; 25 mM Tris; pH 7,5 en gota), C9 (12,5 mM cloruro de magnesio; 50 mM NaCac; pH 6) y Natrix HR2-116 nº 15 (20 mM cloruro de magnesio; 25 mM NaCac; pH 6 en gota). Por otra parte, el rango de concentración de precipitante en el pozo en el que aparecieron los cristales es de 42% a 52%.

En cuanto a los ensayos de la proteína HMGB1 box B, se obtuvo cristales sólo en las gotas con el oligonucleótido AATTTAAATT, a relaciones molares proteína-oligonucleótido de 1:1 y 2:1. Entre ellos, se formaron 12 cristales bien facetados y birrefringentes que se capturaron, congelaron y difractaron.

En los ensayos de la proteína NHP6A, también se obtuvieron cristales únicamente con el oligonucleótido AATTTAAATT a una relación molar de proteína-oligonucleótido de 2:1. En estos ensayos, las condiciones probadas con el precipitante MPD dieron resultados positivos, mientras que en las probadas con el precipitante PEG 8000 sólo se obtuvo precipitado cristalino o separación de fases. Entre los cristales mencionados, se han presentado 9 cristales bien facetados y birrefringentes que se capturaron, congelaron y difractaron.

En los ensayos con el fármaco CRMV50, las soluciones de cristalización que arrojaron mejores resultados son las soluciones adaptadas: D2 (10 mM Acetato de magnesio; 25 mM NaCac; pH 6 en gota), D2.2 (8 mM Acetato de magnesio; 25 mM NaCac; pH 6 en gota), D4 (10 mM Acetato de amonio; 25 mM NaCac; pH 6 en gota) y D4.2 (8 mM Acetato de amonio; 25 mM NaCac; pH 6 en gota). Estas soluciones tienen en común la presencia del ión acetato, teniendo la serie D2 acetato de magnesio y la D4, acetato de amonio. Los cristales de mayor tamaño se dieron con la solución D4.2, con una concentración de acetato de amonio en la gota de 8 mM. Por otro lado, el rango de concentración de precipitante en el pozo en el que aparecieron los cristales es de 23% a 39%.

En general, los ensayos con el fármaco CRMV50 produjeron muchos cristales de

pequeño tamaño con los oligonucleótidos AATTTAAATT, ATTAATTAAT, ATTTATAAAT y AATAATTATT a relaciones molares de 1:1, 2:1 y 4:1 (este último sólo en el caso del ATTAATTAAT). Sin embargo, los únicos cristales que crecieron hasta un tamaño adecuado y tuvieron una superficie homogénea, se dieron con el oligonucleótido AATTTAAATT a una relación molar fármaco-oligonucleótido de 2:1. Tres de estos cristales se capturaron, uno con la solución de cristalización D.4 (10 mM Acetato de amonio; 25 mM NaCac; pH 6 en gota) y dos con la solución de cristalización D4.2 (8 mM Acetato de amonio; 25 mM NaCac; pH 6 en gota).

Los cristales capturados se difractaron en la línea de cristalografía de macromoléculas del sincrotrón ALBA de Cerdanyola del Vallès (Barcelona). Con la información de aquellos diagramas de difracción con calidad suficiente para ser procesados, fue posible predecir los parámetros de celdilla y el grupo espacial más probable. Se encontró que los cristales presentaron los grupos espaciales C2, R3₂ o P622, principalmente por la preferencia del oligonucleótido AATTTAAATT por organizarse en columnas paralelas.

Específicamente, se logró obtener un primer modelo de la organización de las moléculas de oligonucleótido AATTTAAATT (FH7-2) en el grupo espacial R3₂ ($a = 43,639$, $b = 43,639$ y $c = 194,508$; $\alpha = 90$, $\beta = 90$, $\gamma = 120$). La unidad asimétrica corresponde a un oligonucleótido (10 pares de bases) y se encontró que las cadenas estaban organizadas en columnas paralelas y empaquetadas hexagonalmente.

Bibliografía

Referencias bibliográficas

- [1] Watson (2008). *Biología Molecular del Gen*. Madrid. Editorial Médica Panamericana S.A, p. 26-34.
- [2] Thomas (2011). *Textbook of Biochemistry: With Clinical Correlations*. Wiley-Liss. 4ta edición, p. 567.
- [3] National Human Genome Research Institute [<http://www.genome.gov/>, marzo 2016].
- [4] Schleif (1988). *DNA Binding by Proteins*. Science. Vol 241, artículo 1183.
- [5] Dragan, et al. (2004). *DNA binding and bending by HMG boxes: energetic determinants of specificity*. Journal of Molecular Biology. Vol 343, p. 371-393.
- [6] Reeves (2010). *Nuclear functions of the HMG proteins*. Biochim. Biophys. Acta 1799, p. 3-14.
- [7] Catez y Hock (2010). *Binding and interplay of HMG proteins on chromatin: lessons from live cell imaging*. Biochimica et Biophysica Acta. Vol 1799, p. 15-27.
- [8] Štros (2010). *HMGB proteins: Interactions with DNA and chromatin*. Biochimica et Biophysica Acta. Vol 1799. p. 101-113.
- [9] Li, Liang y Lotze (2013). *HMGB1: The central cytokine for all lymphoid cells*. Front. Immunol. Vol 4, p. 68-68.
- [10] Xiang et al. (1997). *Expression of high-mobility group-1 mRNA in human gastrointestinal adenocarcinoma and corresponding non-cancerous mucosa*. International Journal of Cancer. Vol 74 (1), p. 1-6.
- [11] Lotze y DeMarco (2003). *Dealing with death: HMGB1 as a novel target for cancer therapy*. Expert Opinion on Investigational Drugs Vol 4 (12): 1405–9.
- [12] Hock, Furusawa, Ueda y Bustin (2007). *HMG chromosomal proteins in development and disease*. Trends in Cell Biology. Vol 17 (2), p. 72-79.
- [13] Paull y Johnson (1995). *DNA looping by Saccharomyces cerevisiae high mobility group proteins NHP6A/B. Consequences for nucleoprotein complex assembly and chromatin condensation*. Journal of Molecular Biology. Vol 270, p. 8744-8754.
- [14] Masse, J. et al. (2002). *The S. cerevisiae Architectural HMGB Protein NHP6A Complexed with DNA: DNA and Protein Conformational Changes upon Binding*. Journal of Molecular Biology. Vol 323, p. 263-284.
- [15] Zhang, McCauley, Maher, Williams e Israeloff (2012). *Basic N-Terminus of Yeast*

- Nhp6A Regulates the Mechanism of Its DNA Flexibility Enhancement*. Journal of Molecular Biology. Vol 416, p. 10-20.
- [16] Masse, et al. (2002). *Solution Structure of the Sequence-Non-Specific HMGB protein NHP6A*. Journal of Molecular Biology. Vol 323, p. 263-84.
- [17] atdbio – Nucleic acid-drug interactions [<http://www.atdbio.com/content/16/Nucleic-acid-drug-interactions>, abril 2016].
- [18] Wilson, et al. (2008). *Antiparasitic compounds that target DNA*. Biochimie. Vol. 90, p. 999-1014.
- [19] Shapiro y Englund (1995). *The structure and replication of kinetoplast DNA*. Microbiology. Vol 49, p. 117-143.
- [20] Klingbeil, et al.(2001). *Unlocking the secrets of trypanosome kinetoplast DNA network replication*. Protist. Vol 152, 255el262.
- [21] Simpson, L. (1986). *Kinetoplast DNA in trypanosomid flagellates*. Cytology. Vol 99, 119-179.
- [22] Jiang, et al. (2008). *Detection of Genome-Wide Polymorphisms in the AT-Rich Plasmodium falciparum Genome Using a High-Density Microarray*. BMC Genomics. Vol 9, p. 398.
- [23] Martínez y Dardonville (2013). *Rapid Determination of Ionization Constants (pKa) by UV Spectroscopy Using 96-Well Microtiter Plates*. ACS Medicinal Chemistry Letters. Vol 4(1), p. 142-145.
- [24] Schneegans (2013). *Crystallography matters!*. Francia. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization.
- [25] Giacovazzo (1992). *Fundamentals of Crystallography*. Nueva York. Oxford Science Publications, p. 1-24
- [26] Introducción al Estado Cristalino [http://www2.uned.es/cristamine/cristal/crist_intr.htm, abril 2016].
- [27] Alcañiz (2011). *Simetría en moléculas y cristales, Parte II. Simetría espacial*. Universidad de Alcalá, p. 15-16.
- [28] Crystallography – University of Cambridge [<http://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/crystallography3/parameters.php>, abril 2016].
- [29] Crystallography in a Nutshell – UCLA Molecular Instrumentation Center [<http://www.mic.ucla.edu/X-ray/tutorials.htm>, abril 2016].
- [30] Novagen (EMD Millipore). Plasmid Files – Map and Sequence file pET-11a [[https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/pet_and_duet_vectors_\(novagen\)/](https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/pet_and_duet_vectors_(novagen)/)]

- pET-11a/, abril 2016]
- [31] GE Healthcare (2008). *Illustra™ plasmidPrep Mini Spin kit*. Product Booklet. Reino Unido.
- [32] Novagen (2003). *pET System Manual. Section I*. Reino Unido.
- [33] Bandelin (2015). *High-power ultrasound for laboratory and process engineering. Sonopuls HD 2070 und HD 2200*. p. 23.
- [34] Separación de proteínas por diálisis
[<http://iespoetaclaudio.centros.educa.jcyl.es/sitio/upload/06.dialisis.pdf>, mayo 2016].
- [35] Tipos de cromatografía [<http://blog.utp.edu.co/docenciaedwin/files/2014/09/TIPOS-CROMATOGRAF%C3%8DA.pdf>, mayo 2016].
- [36] Métodos de purificación y análisis de los ácidos nucleicos
[<http://biolizbeth.blogspot.com.es/2012/05/101-metodos-de-purificacion-y-analisis.html>, mayo 2016].
- [37] GE Healthcare Life Sciences [www.gelifesciences.com, mayo 2016].
- [38] Alexander y Griffiths (1993). *Basic Biochemical Methods*. Wiley-Lyss. Nueva York.
- [39] Amicon Ultra-0.5 mL Centrifugal Filters for DNA and Protein Purification and Concentration [http://www.merckmillipore.com/ES/es/product/Amicon-Ultra-0.5%C2%A0mL-Centrifugal-Filters-for-DNA-and-Protein-Purification-and-Concentration,MM_NF-C82301?bd=1#overview, mayo 2016].
- [40] Gel Electrophoresis [<http://www.nature.com/scitable/definition/gel-electrophoresis-286>, mayo 2016].
- [41] Electroforesis de proteínas y de ácidos nucleicos
[<http://biomodel.uah.es/tecnicas/elfo/inicio.htm>, mayo 2016].
- [42] Rajalingam, Loftis, Xu y Kumar (2009). *Trichloroacetic acid-induced protein precipitation involves the reversible association of a stable partially structured intermediate*. Protein Science. Vol 18, p. 980-993.
- [43] Sánchez (2014). *Estudis estructurals de complexos de les proteïnes HMG amb DNA*. (TD). Barcelona: ETSEIB, p. 195-196.
- [44] Yen, Wong y Johnson (1998). *Determinants of DNA binding and bending by the Saccharomyces cerevisiae High Mobility Group protein NHP6A that are important for its biological activities*. Journal of Molecular Biology. Vol. 273, p. 4424-4435.
- [45] Rhodes (2006). *Crystallography Made Crystal Clear. A Guide for Users of Macromolecular Models*. 3ra edición. Canadá. Elsevier, p. 37-47.
- [46] Cristalografía [<http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/>, mayo 2016].

[47] Cryo-crystallography and Data Collection

[<http://people.mbi.ucla.edu/sawaya/m230d/Data/data.html>, mayo 2016].

[48] HAMPTON RESEARCH [<https://hamptonresearch.com/default.aspx>, abril 2016].**[49]** Rowlett (2005). *Protein X-Ray Crystallography Methods*. 2da edición. Department of Chemistry, Colgate University. p. 7-14.

Bibliografía complementaria

Artículos científicos

- Weir, et al. (1993). *Structure of the HMG box motif in the B-domain of HMG1*. EMBO Journal. 12, p. 1311-1319.
- Dowell, Sperling, Mason y Johnson (2010). *Chromatin-dependent binding of the S. cerevisiae HMGB protein NHP6A affects nucleosome dynamics and transcription*. Biochimica et Biophysica Acta. Vol 24 (18).
- Allain, et al. (1999). *Solution structure of the HMG protein NHP6A and its interaction with DNA reveals the structural determinants for non-sequence-specific binding*. EMBO Journal. Vol 18, p. 2563–2579.
- Dardonville y Brun (2004). *Bisguanidine, Bis(2-aminoimidazoline), and Polyamine Derivatives as Potent and Selective Chemotherapeutic Agents against Trypanosoma brucei rhodesiense. Synthesis and in Vitro Evaluation*. Journal of Medicinal Chemistry. Vol 47, p. 2296-2307.

Páginas web

- SIB ExpASY. Bioinformatics Resource Portal [<http://web.expasy.org/>, marzo 2016].
- Genetics Home Reference [<https://ghr.nlm.nih.gov/handbook/basics/dna>, marzo 2016]
- National Center for Biotechnology Information – Structure Summary MMDB [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb>, marzo 2016].
- RCSB Protein Data Bank [<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>, marzo 2016]
- Trends in Cell Biology [<http://www.cell.com/>, marzo 2016].
- UniProt [<http://www.uniprot.org/>, marzo 2016].
- ALBA SYNCHROTRON [<https://www.cells.es/>, abril 2016].
- SIGMA ALDRICH [<http://www.sigmaaldrich.com/spain.html>, abril 2016].
- Consideraciones ambientales para los PFC [<http://www.elseib.upc.edu/docs/>

_Informaci_Acadmica/-_Portal_de_docencia/Projectes_i_Treballs/Guies/
Consideracions_ambientals.pdf, mayo 2016].

Trabajos académicos

- García (2015). *Estudio estructural de complejos de oligonucleótidos ricos en adenina y timina con la proteína HMGB1*. (TFM). Barcelona: ETSEIB.
- Millán (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.

Anexo A: Obtención de ADN plasmídico (miniprep)

La producción del ADN plasmídico se realizó a partir de un cultivo de células competentes de la cepa XL1-Blue de *Escherichia coli* a las que se le introdujo el plásmido pRJ1228 (siguiendo los mismos pasos indicados en 5.1.3.1 para la transformación).

El paso a medio líquido se realizó picando 1 colonia transformada y pasándola a un tubo con 1 ml de medio LB. Una vez turbio, se inoculó sobre 15 ml de medio LB y se incubó o/n en agitación (250 rpm y 37 °C).

A partir de 4 ml de dicho cultivo (que presentaba una DO_{600} de 1,892) se siguió el protocolo indicado en el *Illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare) para la rápida extracción y purificación de ADN plasmídico a partir de cultivos de *E. coli* a pequeña escala (Figura A.1) [31]. El protocolo se realizó por duplicado para obtener un volumen mayor de stock de plásmido.

La recuperación de las bacterias del cultivo se realizó centrifugando por pasos. Primero, se agregó 1 ml de cultivo a dos tubos eppendorf de 2 ml y se centrifugó, retirando el sobrenadante. Luego, se repitió el proceso dos veces más agregando 1,5 ml de cultivo cada vez. De esta forma, se obtiene el sedimento de 4 ml de cultivo en cada tubo eppendorf.

Luego, se siguieron las instrucciones para los pasos de lisis, unión del plásmido, lavado y secado, y elución. El paso 4 de lavado no se realizó porque es específico para purificaciones con el gen *wild type EndA*⁺. El paso 6 de elución, se realizó con un menor volumen de buffer de elución (50 µl) para obtener una concentración mayor.

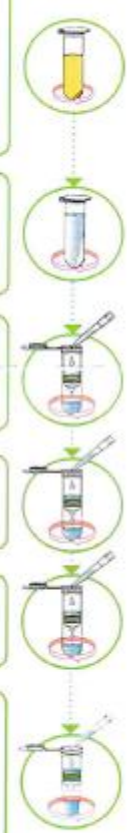
Al final de ejecutar el protocolo, se juntaron ambas alícuotas de 50 µl de plásmido y se determinó su concentración. Esto se hizo a partir de una lectura de absorbancia a 260 nm. Se obtuvo un stock final de 0,1284 µg/µl (128,4 ng/µl) que se almacenó a -20 °C.

Protocol for 1.5 & 3 ml culture volumes

- Check appropriate volume of ethanol added to Wash buffer type 1

⊕ :Add ⊖ :Spin ⌚ :Incubate

- 1. Harvesting of bacterial culture**
 - ⊕ 1.5 ml bacterial culture
 - ⌚ 30 seconds 16 000 × g
 - Pour off and discard supernatant
 - Repeat for 3 ml culture volume
 - ⌚ 30 seconds 16 000 × g (for all culture volumes)
 - Remove residual supernatant
- 2. Lysis**
 - ⊕ 175 µl Lysis buffer type 7; re-suspend pellet
 - ⊕ 175 µl Lysis buffer type 8; gently invert
 - ⊕ 350 µl Lysis buffer type 9; gently invert
 - ⌚ 4 minutes 16 000 × g
- 3. Plasmid binding**
 - Transfer supernatant to plasmid mini column inside Collection tube
 - ⌚ 30 seconds 16 000 × g
 - Discard flowthrough
- 4. Wash (optional-stain dependent)**
 - ⊕ 400 µl Lysis buffer type 9
 - ⌚ 30 seconds 16 000 × g
 - Discard flowthrough
- 5. Wash & Dry**
 - ⊕ 400 µl Wash buffer type 1
 - ⌚ 1 minute 16 000 × g
 - Discard flow-through and Collection tube
- 6. Elution**
 - Transfer plasmid mini column to a new DNase-free microcentrifuge tube
 - ⊕ 100 µl Elution buffer type 4
 - ⌚ 30 seconds at room temperature
 - ⌚ 30 seconds 16 000 × g
 - Retain eluant
 - Store purified plasmid DNA at -20°C




 20-9042-71P, Rev F 04/2008

Figura A.1. Guía rápida para el protocolo Illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit [31]

Verificación de la miniprep

Para verificar que el plásmido purificado incorporó el gen que codifica la proteína de interés, en nuestro caso la NHP6A, se realizó una verificación utilizando enzimas de restricción y un gel de agarosa. Para ello, se siguió el siguiente procedimiento:

Digestión enzimática del plásmido: conociendo el mapa de restricción del plásmido, se escogieron las enzimas NdeI y BamHI para cortar el gen de la proteína NHP6A. Se agregó:

- 5 µl del plásmido purificado mediante el protocolo descrito anteriormente.
- 3 µl de agua mQ.
- 1 µl de buffer 3.1 (10x).
- 0,5 µl de NdeI y 0,5 µl de BamHI.

- Se incubó durante 1 hora en un baño térmico a 37 °C.
- Al final de la digestión se añadió 2 µl de tampón de muestras de electroforesis (TME 6x) (Tabla A.1) y se analizó en un gel de agarosa al 1% (Tabla A.1).

Tabla A.1 Composición de los tampones de electroforesis y gel de agarosa

TME 6x	TAE (Tris-acético-EDTA) 50x	Gel de agarosa al 1%
Para 10 ml: - 0,25% (w/v) de naranja G - 5 ml de TAE 1x - 5 ml de glicerol	Para 1 litro: - 242 g de Tris - 57,1 ml de ácido acético - 100 ml de EDTA 0,5 M pH 8	Para 30 ml: - 0,3 g de agarosa - 30 ml de TAE 1x - 1,5 µl de bromuro de etidio 10 mg/ml

Una vez digerido el plásmido, se debe obtener un fragmento corto (309 pb) correspondiente a la proteína NHP6A y un fragmento largo (aproximadamente 5700 pb) correspondiente al resto del plásmido.

Gel de Agarosa al 1%: para detectar la presencia de los fragmentos digeridos se realiza un gel de agarosa, en el cual se separan los fragmentos de ADN de acuerdo a su longitud en pb. El colorante usado para observar el avance de la migración es el naranja G. Se siguió el siguiente procedimiento para la preparación del tampón de cubeta y el gel de agarosa:

- Se preparó TAE 50x (Tabla A.1). Por dilución, se preparó 500 ml de TAE 1x (tampón de cubeta) (10 ml de tampón 50x + 490 ml de agua mQ).
- En un matraz, se agregó 0,3 g de agarosa a 30 ml del tampón de cubeta 1x. Se disolvió calentando en el microondas por 1 minuto. Cuando la temperatura bajó lo suficiente como para poder sostener el matraz, se agregó 1,5 µl de bromuro de etidio 10 mg/ml para una concentración final de 0,5 µg/ml.
- Se preparó el molde para el gel de agarosa usando un peine pequeño y se vertió la solución anterior. Se esperó a que polimerizara.
- Se cubrió el gel agregando alrededor de 300 ml de tampón de cubeta 1x.
- Se cargó 5,5 µl de marcador de ADN (Kilobase DNA marker de GE Healthcare) y los 12 µl de plásmido digerido.
- Conectar los electrodos y aplicar un voltaje de 80 V.

Al terminar la electroforesis, se fotografió el gel de agarosa usando el equipo Gel-Doc XR y un transiluminador UV (Figura A.2).

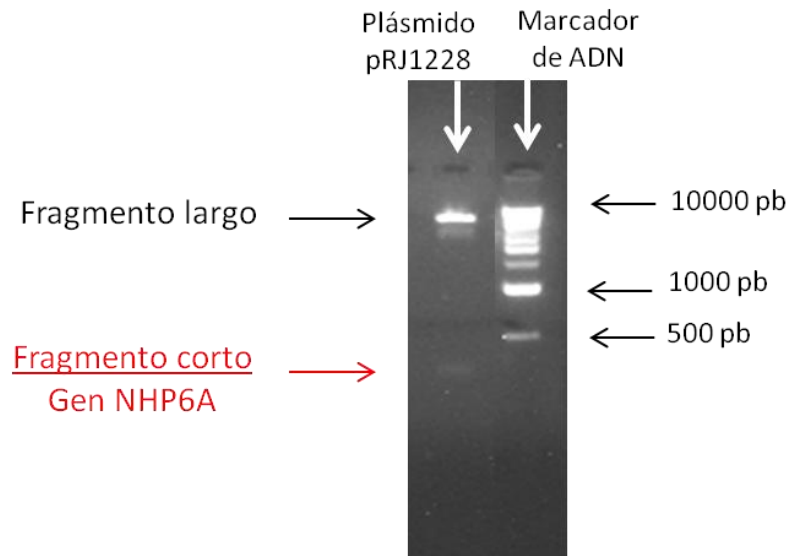


Figura A.2. Gel de agarosa para la verificación del plásmido pRJ1228.

En el gel puede verse la banda correspondiente al fragmento corto (gen NHP6A), por debajo de la banda de 500 pb, y al fragmento largo por debajo de la banda de 10000 pb. Debajo de la banda del fragmento larga se ve otra banda más tenue que puede corresponder a plásmido sin digerir, que migraría más rápido que el digerido.

Anexo B: Ensayos cristalográficos

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 han contemplado el uso de diferentes proteínas (también de un fármaco) y oligonucleótidos, y se han llevado a cabo a distintas condiciones de cristalización. En este apartado se detallan las soluciones de cristalización empleadas, las condiciones de cristalización probadas en cada ensayo y sus resultados.

Los resultados reportados corresponden al período de monitoreo: 17-12-2015 al 08-06-2016. Sin embargo, es importante destacar que todas las gotas siguen siendo supervisadas regularmente.

B.1 Soluciones de cristalización Natrix HR2-116

En la Tabla B.1 se presenta la composición de las soluciones de cristalización Natrix HR2-116, entre las que se encuentran las utilizadas en los ensayos cristalográficos realizados durante este estudio.

Tabla B.1 Composición de los tampones Natrix HR2-116 [48]

Nº	Fórmula
1	0,01 M Cloruro de magnesio; 0,05 M MES; pH 5,6; 1,8 M sulfato de litio
2	0,01 M Acetato de magnesio; 0,05 M MES; pH 5,6; 2,5 M sulfato de amonio
3	0,1 M Acetato de magnesio; 0,05 M MES; pH 5,6; 20% v/v MPD
4	0,2 M Cloruro de potasio; 0,01 M sulfato de magnesio; 0,05 M MES; pH 5,6; 10% v/v PEG 400
5	0,2 M Cloruro de potasio; 0,01 M cloruro de magnesio; 0,05 M MES; pH 5,6; 5% w/v PEG 8000
6	0,1 M Sulfato de amonio; 0,01 M cloruro de magnesio; 0,05 M MES; pH 5,6; 20 % w/v PEG 8000
7	0,02 M Cloruro de magnesio; 0,05 M MES; pH 6,0; 15 % v/v 2-Propanol
8	0,1 M Acetato de amonio; 0,005 M sulfato de magnesio; 0,05 M MES; pH 6,0; 0,6 M cloruro de sodio
9	0,1 M Cloruro de potasio; 0,01 M cloruro de magnesio; 0,05 M MES; pH 6,0; 10% v/v PEG 400
10	0,005 M Sulfato de magnesio; 0,05 M MES; pH 6,0; 5% w/v PEG 4000
11	0,01 M Cloruro de magnesio; 0,05 M Cacodilato de sodio; pH 6,0; 1,0 M sulfato de litio
12	0,01 M Sulfato de magnesio; 0,05 M Cacodilato de sodio; pH 6,0; 1,8 M sulfato de litio
13	0,015 M Acetato de magnesio; 0,05 M Cacodilato de sodio; pH 6,0; 1,7 M sulfato de amonio
14	0,1 M Cloruro de potasio; 0,025 M cloruro de magnesio; 0,05 M Cacodilato de sodio; pH 6,0; 15% v/v 2-Propanol
15	0,04 M Cloruro de magnesio; 0,05 M Cacodilato de sodio; pH 6,0; 5 % v/v MPD
16	0,04 M Acetato de magnesio; 0,05 M Cacodilato de sodio; pH 6,0; 30 % v/v MPD
17	0,2 M Cloruro de potasio; 0,01 M cloruro de calcio; 0,05 M Cacodilato de sodio; pH 6,0; 10 % w/v PEG 4000

Nº	Fórmula
18	0,01 M Acetato de magnesio; 0,05 M Cacodilato de sodio; pH 6,5; 1,3 M sulfato de litio
19	0,01 M Sulfato de magnesio; 0,05 M Cacodilato de sodio; pH 6,5; 2,0 M sulfato de amonio
20	0,1 M Acetato de amonio; 0,015 M Acetato de magnesio; 0,05 M Cacodilato de sodio; pH 6,5; 10% v/v 2-Propanol
21	0,2 M Cloruro de potasio; 0,005 M cloruro de magnesio; 0,05 M Cacodilato de sodio; pH 6,5; 0,9 M 1,6-Hexanodiol
22	0,08 M Acetato de magnesio; 0,05 M Cacodilato de sodio; pH 6,5; 15 % v/v PEG 400
23	0,2 M Cloruro de potasio; 0,01 M cloruro de magnesio; 0,05 M Cacodilato de sodio; pH 6,5; 10 % w/v PEG 4000
24	0,2 M Acetato de amonio; 0,01 M cloruro de calcio; 0,05 M Cacodilato de sodio; pH 6,5; 10 % w/v PEG 4000
25	0,08 M Acetato de magnesio; 0,05 M Cacodilato de sodio; pH 6,5; 30 % w/v PEG 4000
26	0,2 M Cloruro de potasio; 0,01 M cloruro de magnesio; 0,05 M Cacodilato de sodio; pH 6,5; 10 % w/v PEG 8000
27	0,2 M Acetato de amonio; 0,01 M acetato de magnesio; 0,05 M Cacodilato de sodio; pH 6,5; 30 % w/v PEG 8000
28	0,05 M Sulfato de magnesio; 0,05 M HEPES; pH 7,0; 1,6 M sulfato de litio
29	0,01 M Cloruro de magnesio; 0,05 M HEPES; pH 7,0; 4,0 M cloruro de litio
30	0,01 M Cloruro de magnesio; 0,05 M HEPES; pH 7,0; 1,6 M sulfato de amonio
31	0,005 M Cloruro de magnesio; 0,05 M HEPES; pH 7,0; 25% v/v PEG monometil éter 550
32	0,2 M Cloruro de potasio; 0,01 M cloruro de magnesio; 0,05 M HEPES; pH 7,0; 1,7 M 1,6-Hexanodiol
33	0,2 M Cloruro de amonio; 0,01 M cloruro de magnesio; 0,05 M HEPES; pH 7,0; 2,5 M 1,6-Hexanodiol
34	0,1 M Cloruro de potasio; 0,005 M cloruro de magnesio; 0,05 M HEPES; pH 7,0; 15% MPD
35	0,1 M Cloruro de potasio; 0,01 M cloruro de magnesio; 0,05 M HEPES; pH 7,0; 5% v/v PEG 400
36	0,1 M Cloruro de potasio; 0,01 M cloruro de calcio; 0,05 M HEPES; pH 7,0; 10% v/v PEG 400
37	0,2 M Cloruro de potasio; 0,025 M sulfato de magnesio; 0,05 M HEPES; pH 7,0; 20% v/v PEG 200
38	0,2 M Acetato de amonio; 0,15 M acetato de magnesio; 0,05 M HEPES; pH 7,0; 5% w/v PEG 4000
39	0,1 M Acetato de amonio; 0,02 M cloruro de magnesio; 0,05 M HEPES; pH 7,0; 5% v/v PEG 8000
40	0,01 M Cloruro de magnesio; 0,05 M TRIS; pH 7,5; 1,6 M sulfato de amonio
41	0,1 M Cloruro de potasio; 0,015 M cloruro de magnesio; 0,05 M TRIS; pH 7,5; 10% v/v PEG monometil éter 550
42	0,01 M Cloruro de magnesio; 0,05 M TRIS; pH 7,5; 5% v/v 2-Propanol
43	0,05 M Acetato de amonio; 0,01 M cloruro de magnesio; 0,05 M TRIS; pH 7,5; 10% v/v MPD
44	0,2 M Cloruro de potasio; 0,005 M cloruro de magnesio; 0,05 M TRIS; pH 7,5; 10% w/v PEG 4000
45	0,025 M Sulfato de magnesio; 0,05 M TRIS; pH 8,5; 1,8 M sulfato de amonio
46	0,005 M Sulfato de magnesio; 0,05 M TRIS; pH 8,5; 2,9 M 1,6-Hexanodiol
47	0,1 M Cloruro de potasio; 0,01 M cloruro de magnesio; 0,05 M TRIS; pH 8,5; 30% v/v PEG 400
48	0,2 M Cloruro de amonio; 0,01 M cloruro de calcio; 0,05 M TRIS; pH 8,5; 30% w/v PEG 4000

B.2 Soluciones de cristalización adaptadas

En la Tabla B.2 se presenta la composición de las soluciones de cristalización adaptadas utilizadas en los ensayos cristalográficos realizados con fármacos y proteínas.

Tabla B.2 Composición de los tampones adaptados

	Nombre	Fórmula
Fármacos	D1	16 mM Cloruro de manganeso; 50 mM NaCac; pH 6; 10% MPD; 0,2 mM espermina
	D2	20 mM Acetato de magnesio; 50 mM NaCac; pH 6; 10% MPD; 0,2 mM espermina
	D3	16 mM Cloruro de magnesio; 50 mM NaCac; pH 6; 10% MPD; 0,2 mM espermina
	D4	20 mM Acetato de amonio; 50 mM NaCac; pH 6; 10% MPD; 0,2 mM espermina
	D2.2	16 mM Acetato de magnesio; 50 mM NaCac; pH 6; 5% MPD; 0,2 mM espermina
	D4.2	16 mM Acetato de amonio; 50 mM NaCac; pH 6; 5% MPD; 0,2 mM espermina
Proteínas	T6	20 mM Cloruro de magnesio; 50 mM Tris; pH 7,5; 10% MPD; 2 mM DTT
	T9	25 mM Cloruro de magnesio; 50 mM Tris; pH 7,5; 10% MPD; 2 mM DTT
	C2	200 mM Cloruro de magnesio; 50 mM CHES; pH 9; 13% PEG 8000
	C6	20 mM Cloruro de magnesio; 50 mM NaCac; pH 6; 10% MPD; 2 mM DTT
	C9	25 mM Cloruro de magnesio; 50 mM NaCac; pH 6; 10% MPD; 2 mM DTT

NaCac: Cacodilato de sodio

B.3 Ensayos cristalográficos con la proteína HMGB1 Box B

En este apartado se presentan los resultados obtenidos en el monitoreo de las gotas correspondientes a complejos de la proteína HMGB1 Box B y los oligonucleótidos AATTTAAATT y GGGAAATTTCCC, a diferentes condiciones de cristalización. Se destacan en color amarillo las gotas en las que han aparecido cristales y en color rosa las gotas con cristales pescados.

- **Oligonucleótido AATTTAAATT:**

Condiciones de partida:

- Proteína: HMGB1 Box B 4,03 mM en 50 mM NaCl pH 7,4
- Oligonucleótido: (144) AATTTAAATT 3,787 mM en 25 mM NaCac pH 6,5

Tabla B.3 Condiciones y observaciones de las gotas HMGB1 Box B – AATTTAAATT

Código	Relación proteína-oligo	Concentración en gota (mM)		Solución de cristalización						Precipitante		Resultados
		Proteína	Oligo	Nombre	Tampón	Sal	pH	Precip	Otro	% Inicial	% Final	
FH1	1:1	0,2	0,2	T6	25 mM Tris	10 mM MgCl ₂	7,5	5% MPD	1 mM DTT	30	54,8	Cristales pequeños a 48%, 1 grande y bien facetado
FH2	1:1	0,2	0,2	T9	25 mM Tris	12,5 mM MgCl ₂	7,5	5% MPD	1 mM DTT	30	52,3	Cristales rectangulares a 42%. Varios homogéneos.
FH3	1:1	0,2	0,2	C6	25 mM NaCac	10 mM MgCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	30	58	Varios cristales pequeños

Código	Relación proteína-oligo	Concentración en gota (mM)		Solución de cristalización						Precipitante		Resultados
		Proteína	Oligo	Nombre	Tampón	Sal	pH	Precip	Otro	% Inicial	% Final	
FH4	1:1	0,2	0,2	C9	25 mM NaCac	12,5 mM MgCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	30	50,8	Varios cristales pequeños, uno grande y bien facetado a 48%
FH5	1:1	0,2	0,2	Natrix nº 15	25 mM NaCac	20 mM MgCl ₂	6	2,5% MPD		30	46	3 cristales grandes y uniformes
FH6	2:1	0,4	0,2	T6	25 mM Tris	10 mM MgCl ₂	7,5	5% MPD	1 mM DTT	30	55,8	Cristales a 52%. Brillan mucho
FH7	2:1	0,4	0,2	T9	25 mM Tris	12,5 mM MgCl ₂	7,5	5% MPD	1 mM DTT	30	51,5	8 cristales grandes a 48%. 5 bien facetados
FH8	2:1	0,4	0,2	C6	25 mM NaCac	10 mM MgCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	30	60	Separación de fases
FH9	2:1	0,4	0,2	C9	25 mM NaCac	12,5 mM MgCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	30	44	Gota clara
FH10	2:1	0,4	0,2	Natrix nº 15	25 mM NaCac	20 mM MgCl ₂	6	2,5% MPD		30	51,5	3 cristales rectangulares grandes. 2 bien facetados

■ Gota con cristal capturado: bien facetado y birrefringente.

■ Gota en la que se formaron cristales.

- **Oligonucleótido GGGAAATTTCCC:**

Condiciones de partida:

- Proteína: HMGB1 Box B 4,03 mM en 50 mM NaCl pH 7,4
- Oligonucleótido: (417) GGGAAATTTCCC 2,75 mM en 25 mM NaCac pH 6,5

Tabla B.3 Condiciones y observaciones de las gotas HMGB1 Box B – GGGAAATTTCCC

Código	Relación proteína-oligo	Concentración en gota (mM)		Solución de cristalización						Precipitante		Resultados
		Proteína	Oligo	Nombre	Tampón	Sal	pH	Precip	Otro	% Inicial	% Final	
FH11	1:1	0,2	0,2	T6	25 mM Tris	10 mM MgCl ₂	7,5	5% MPD	1 mM DTT	30	60	Separación de fases
FH12	1:1	0,2	0,2	T9	25 mM Tris	12,5 mM MgCl ₂	7,5	5% MPD	1 mM DTT	30	60	Separación de fases
FH13	1:1	0,2	0,2	C6	25 mM NaCac	10 mM MgCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	30	60	Separación de fases
FH14	1:1	0,2	0,2	C9	25 mM NaCac	12,5 mM MgCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	30	60	Separación de fases
FH15	1:1	0,2	0,2	Natrix nº 15	25 mM NaCac	20 mM MgCl ₂	6	2,5% MPD		30	60	Separación de fases

Código	Relación proteína-oligo	Concentración en gota (mM)		Solución de cristalización						Precipitante		Resultados
		Proteína	Oligo	Nombre	Tampón	Sal	pH	Precip	Otro	% Inicial	% Final	
FH16	2:1	0,4	0,2	T6	25 mM Tris	10 mM MgCl ₂	7,5	5% MPD	1 mM DTT	30	60	Separación de fases
FH17	2:1	0,4	0,2	T9	25 mM Tris	12,5 mM MgCl ₂	7,5	5% MPD	1 mM DTT	30	60	Separación de fases
FH18	2:1	0,4	0,2	C6	25 mM NaCac	10 mM MgCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	30	60	Separación de fases
FH19	2:1	0,4	0,2	C9	25 mM NaCac	12,5 mM MgCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	30	60	Separación de fases
FH20	2:1	0,4	0,2	Natrix nº 15	25 mM NaCac	20 mM MgCl ₂	6	2,5% MPD		30	40	Separación de fases y poco precipitado cristalino

B.4 Ensayos cristalográficos con la proteína NHP6A

En este apartado se presentan los resultados obtenidos en el monitoreo de las gotas correspondientes a complejos de la proteína NHP6A y los oligonucleótidos AATTTAAATT, ATTAATTAAT y GGGAAATTTCCC, a diferentes condiciones de cristalización. Se destacan en color amarillo las gotas en las que han aparecido cristales y en color rosa las gotas con cristales pescados.

- Oligonucleótido AATTTAAATT:

Condiciones de partida:

- Proteína: NHP6A 2,67 mM en 50 mM NaCl pH 7,4
- Oligonucleótido: (144) AATTTAAATT 3,787 mM en 25 mM NaCac pH 6,5

Tabla B.4 Condiciones y observaciones de las gotas NHP6A – AATTTAAATT

Código	Relación proteína-oligo	Concentración en gota (mM)		Solución de cristalización						Precipitante en pozo		Resultados
		Proteína	Oligo	Nombre	Tampón	Sal	pH	Precip	Otro	% Inicial	% Final	
FN1	2:1	0,4	0,2	T6	25 mM Tris	10 mM MgCl ₂	7,5	5% MPD	1 mM DTT	30	54,5	3 cristales medianos a 52%. 2 bien facetados
FN2	2:1	0,4	0,2	T9	25 mM Tris	12,5 mM MgCl ₂	7,5	5% MPD	1 mM DTT	30	49,5	Varios cristales de gran tamaño a 46%. 4 bien facetados

Código	Relación proteína-oligo	Concentración en gota (mM)		Solución de cristalización						Precipitante en pozo		Resultados
		Proteína	Oligo	Nombre	Tampón	Sal	pH	Precip	Otro	% Inicial	% Final	
FN3	2:1	0,4	0,2	C6	25 mM NaCac	10 mM MgCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	30	55,4	5 cristales delgados y pequeños
FN4	2:1	0,4	0,2	C9	25 mM NaCac	12,5 mM MgCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	30	54,5	4 cristales medianos a 52%. Poco homogéneos
FN5	2:1	0,4	0,2	Natrix nº 15	25 mM NaCac	20 mM MgCl ₂	6	2,5% MPD		30	47,2	4 cristales grandes. Brillan poco
FN6	3:1	0,6	0,2	T6	25 mM Tris	10 mM MgCl ₂	7,5	5% MPD	1 mM DTT	30	60	Gota clara
FN7	3:1	0,6	0,2	T9	25 mM Tris	12,5 mM MgCl ₂	7,5	5% MPD	1 mM DTT	30	57,5	15 cristales delgados a 56%
FN8	3:1	0,6	0,2	C6	25 mM NaCac	10 mM MgCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	30	60	Cristal líquido
FN9	3:1	0,6	0,2	C9	25 mM NaCac	12,5 mM MgCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	30	60	Poco precipitado cristalino
FN10	3:1	0,6	0,2	Natrix nº 15	25 mM NaCac	20 mM MgCl ₂	6	2,5% MPD		30	59,5	2 cristales pequeños
FN11	3:1	0,6	0,2	C2	25 mM CHES	100 mM MgCl ₂	9	6,5% PEG 8000		20	50	Separación de fases
FN12	3:1	0,6	0,2	C2	22,2 mM CHES	88,9 mM MgCl ₂	9	5,8% PEG 8000	11,1% TCEP	20	50	Precipitado cristalino abundante
FN25	3:1	0,6	0,2	T9	25 mM Tris	12,5 mM MgCl ₂	7,5	5% MPD		20	50	Poco precipitado cristalino
FN26	6:1	1,2	0,2	T9	25 mM Tris	12,5 mM MgCl ₂	7,5	5% MPD		20	50	Gota clara

■ Gota con cristal capturado: bien facetado y birrefringente.

■ Gota en la que se formaron cristales.

- **Oligonucleótido ATTAATTAAT:**

Condiciones de partida:

- Proteína: NHP6A 2,67 mM en 50 mM NaCl pH 7,4
- Oligonucleótido: (156) ATTAATTAAT 2 mM en 25 mM NaCac pH 6,5

Tabla B.4 Condiciones y observaciones de las gotas NHP6A – ATTAATTAAT

Código	Relación proteína-oligo	Concentración en gota (mM)		Solución de cristalización						Precipitante en pozo		Resultados
		Proteína	Oligo	Nombre	Tampón	Sal	pH	Precip	Otro	% Inicial	% Final	
FN27	3:1	0,6	0,2	T9	25 mM Tris	12,5 mM MgCl ₂	7,5	5% MPD		20	50	Gota clara
FN28	6:1	1,2	0,2	T9	25 mM Tris	12,5 mM MgCl ₂	7,5	5% MPD		20	50	Poco precipitado cristalino

- **Oligonucleótido GGGAAATTTCCC:**

Condiciones de partida:

- Proteína: NHP6A 2,67 mM en 50 mM NaCl pH 7,4
- Oligonucleótido: (417) GGGAAATTTCCC 2,75 mM en 25 mM NaCac pH 6,5

Tabla B.5 Condiciones y observaciones de las gotas NHP6A – GGGAAATTTCCC

Código	Relación proteína-oligo	Concentración en gota (mM)		Solución de cristalización						Precipitante en pozo		Resultados
		Proteína	Oligo	Nombre	Tampón	Sal	pH	Precip	Otro	% Inicial	% Final	
FN13	2:1	0,4	0,2	T6	25 mM Tris	10 mM MgCl ₂	7,5	5% MPD	1 mM DTT	30	60	Separación de fases
FN14	2:1	0,4	0,2	T9	25 mM Tris	12,5 mM MgCl ₂	7,5	5% MPD	1 mM DTT	30	48	Separación de fases
FN15	2:1	0,4	0,2	C6	25 mM NaCac	10 mM MgCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	30	60	Separación de fases
FN16	2:1	0,4	0,2	C9	25 mM NaCac	12,5 mM MgCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	30	60	Separación de fases
FN17	2:1	0,4	0,2	Natrix nº 15	25 mM NaCac	20 mM MgCl ₂	6	2,5% MPD		30	60	Separación de fases
FN18	3:1	0,6	0,2	T6	25 mM Tris	10 mM MgCl ₂	7,5	5% MPD	1 mM DTT	30	60	Separación de fases
FN19	3:1	0,6	0,2	T9	25 mM Tris	12,5 mM MgCl ₂	7,5	5% MPD	1 mM DTT	30	60	Separación de fases

Código	Relación proteína-oligo	Concentración en gota (mM)		Solución de cristalización						Precipitante en pozo		Resultados
		Proteína	Oligo	Nombre	Tampón	Sal	pH	Precip	Otro	% Inicial	% Final	
FN20	3:1	0,6	0,2	C6	25 mM NaCac	10 mM MgCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	30	60	Separación de fases
FN21	3:1	0,6	0,2	C9	25 mM NaCac	12,5 mM MgCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	30	60	Separación de fases
FN22	3:1	0,6	0,2	Natrix nº 15	25 mM NaCac	20 mM MgCl ₂	6	2,5% MPD		30	60	Separación de fases
FN23	3:1	0,6	0,2	C2	25 mM CHES	100 mM MgCl ₂	9	6,5% PEG 8000		20	50	Separación de fases
FN24	3:1	0,6	0,2	C2	22,2 mM CHES	88,9 mM MgCl ₂	9	5,8% PEG 8000	11,1% TCEP	20	50	Separación de fases

B.5 Ensayos cristalográficos con el fármaco CRMV50

En este apartado se presentan los resultados obtenidos en el monitoreo de las gotas correspondientes a complejos del fármaco CRMV50 y los oligonucleótidos AATTTAAATT, ATAATATTAT, ATTAATTAAT, ATTTATAAAT, AATAATTATT y GGGAAATTTCCC, a diferentes condiciones de cristalización. Se destacan en color amarillo las gotas en las que han aparecido cristales y en color rosa las gotas en las que se han capturado cristales.

- Oligonucleótido AATTTAAATT:

Condiciones de partida:

- Fármaco: CRMV50 2,5 mM en agua
- Oligonucleótido: (144) AATTTAAATT 3,787 mM en 25 mM NaCac pH 6,5

Tabla B.6 Condiciones y observaciones de las gotas CRMV50 – AATTTAAATT

Código	Relación fármaco-oligo	Concentración en gota (mM)		Solución de cristalización						Precipitante en pozo		Resultados
		Fármaco	Oligo	Nombre	Tampón	Sal	pH	Precip	Otro	% Inicial	% Final	
F1	1:1	0,2	0,2	D1	25 mM NaCac	8 mM MnCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	20	27	Abundante precipitado cristalino
F2	1:1	0,2	0,2	D2	25 mM NaCac	10 mM MgC	6	5% MPD	1 mM DTT	20	41	Cristales medianos. Se fundieron

Código	Relación fármaco-oligo	Concentración en gota (mM)		Solución de cristalización						Precipitante en pozo		Resultados
		Fármaco	Oligo	Nombre	Tampón	Sal	pH	Precip	Otro	% Inicial	% Final	
F3	1:1	0,2	0,2	D3	25 mM NaCac	8 mM MgCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	20	45	Precipitado cristalino y separación de fases
F4	1:1	0,2	0,2	D4	25 mM NaCac	10 mM NH ₄ AC	6	5% MPD	1 mM DTT	20	34	Cristales pequeños. Se fundieron.
F5	1:1	0,2	0,2	D2.2	25 mM NaCac	8 mM MgAC	6	2,5% MPD	1 mM DTT	20	41	Cristales muy pequeños y cristal líquido
F6	1:1	0,2	0,2	D4.2	25 mM NaCac	8 mM NH ₄ AC	6	5% MPD	1 mM DTT	20	40	Cristales pequeños. Se fundieron.
F7	2:1	0,4	0,2	D1	25 mM NaCac	8 mM MnCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	20	31	Agujas y precipitado cristalino
F8	2:1	0,4	0,2	D2	25 mM NaCac	10 mM MgC	6	5% MPD	1 mM DTT	20	25	Cristales no homogéneos y agujas. Se fundieron
F9	2:1	0,4	0,2	D3	25 mM NaCac	8 mM MgCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	20	41	Muchas agujas y luego separación de fases
F10	2:1	0,4	0,2	D4	25 mM NaCac	10 mM NH ₄ AC	6	5% MPD	1 mM DTT	20	35	Cristales pequeños y homogéneos. Se pescó un cristal
F11	2:1	0,4	0,2	D2.2	25 mM NaCac	8 mM MgAC	6	2,5% MPD	1 mM DTT	20	26,5	Numerosas agujas y cristales muy pequeños
F12	2:1	0,4	0,2	D4.2	25 mM NaCac	8 mM NH ₄ AC	6	5% MPD	1 mM DTT	20	40	Cristales grandes. Se pescaron dos homogéneos

□ Gota con cristal capturado: bien facetado y birrefringente.

□ Gota en la que se formaron cristales.

- **Oligonucleótido ATTTATAAAT:**

Condiciones de partida:

- Fármaco: CRMV50 2,5 mM en agua
- Oligonucleótido: (160) ATTTATAAAT 5,614 mM en 25 mM NaCac pH 6,5

Tabla B.7 Condiciones y observaciones de las gotas CRMV50 – ATTTATAAAT

Código	Relación fármaco-oligo	Concentración en gota (mM)		Solución de cristalización						Precipitante en pozo		Resultados
		Fármaco	Oligo	Nombre	Tampón	Sal	pH	Precip	Otro	% Inicial	% Final	
F13	1:1	0,2	0,2	D1	25 mM NaCac	8 mM MnCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	20	24	Precipitado amorfo
F14	1:1	0,2	0,2	D2	25 mM NaCac	10 mM MgC	6	5% MPD	1 mM DTT	20	38	Separación de fases y precipitado cristalino
F15	1:1	0,2	0,2	D3	25 mM NaCac	8 mM MgCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	20	30	Cristales irregulares. Se fundieron
F16	1:1	0,2	0,2	D4	25 mM NaCac	10 mM NH ₄ AC	6	5% MPD	1 mM DTT	20	33	Muchos cristales pequeños. Se fundieron
F17	1:1	0,2	0,2	D2.2	25 mM NaCac	8 mM MgAC	6	2,5% MPD	1 mM DTT	20	46	Muchos cristales pequeños y cristal líquido
F18	1:1	0,2	0,2	D4.2	25 mM NaCac	8 mM NH ₄ AC	6	5% MPD	1 mM DTT	20	38	Cristales pequeños homogéneos. Se fundieron
F19	2:1	0,4	0,2	D1	25 mM NaCac	8 mM MnCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	20	34	Precipitado amorfo
F20	2:1	0,4	0,2	D2	25 mM NaCac	10 mM MgC	6	5% MPD	1 mM DTT	20	49	Cristal líquido
F21	2:1	0,4	0,2	D3	25 mM NaCac	8 mM MgCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	20	50	Cristal líquido y cristales muy pequeños
F22	2:1	0,4	0,2	D4	25 mM NaCac	10 mM NH ₄ AC	6	5% MPD	1 mM DTT	20	46	Separación de fases
F23	2:1	0,4	0,2	D2.2	25 mM NaCac	8 mM MgAC	6	2,5% MPD	1 mM DTT	20	47	Cristales pequeños y precipitado cristalino
F24	2:1	0,4	0,2	D4.2	25 mM NaCac	8 mM NH ₄ AC	6	5% MPD	1 mM DTT	20	47	Precipitado cristalino

■ Gota en la que se formaron cristales.

- **Oligonucleótido AATAATTATT:**

Condiciones de partida:

- Fármaco: CRMV50 2,5 mM en agua
- Oligonucleótido: (229) AATAATTATT 5,22 mM en 25 mM NaCac pH 6,5

Tabla B.8 Condiciones y observaciones de las gotas CRMV50 – AATAATTATT

Código	Relación fármaco-oligo	Concentración en gota (mM)		Solución de cristalización						Precipitante en pozo		Resultados
		Fármaco	Oligo	Nombre	Tampón	Sal	pH	Precip	Otro	% Inicial	% Final	
F25	1:1	0,2	0,2	D1	25 mM NaCac	8 mM MnCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	20	26	Precipitado amorfo
F26	1:1	0,2	0,2	D2	25 mM NaCac	10 mM MgC	6	5% MPD	1 mM DTT	20	39	Microcristales. Se fundieron
F27	1:1	0,2	0,2	D3	25 mM NaCac	8 mM MgCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	20	38	Microcristales. Se fundieron
F28	1:1	0,2	0,2	D4	25 mM NaCac	10 mM NH ₄ AC	6	5% MPD	1 mM DTT	20	30	Cristales grandes. Se fundieron
F29	1:1	0,2	0,2	D2.2	25 mM NaCac	8 mM MgAC	6	2,5% MPD	1 mM DTT	20	36	Microcristales y cristal líquido
F30	1:1	0,2	0,2	D4.2	25 mM NaCac	8 mM NH ₄ AC	6	5% MPD	1 mM DTT	20	38	Cristales muy pequeños. Se fundieron
F31	2:1	0,4	0,2	D1	25 mM NaCac	8 mM MnCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	20	34	Precipitado amorfo
F32	2:1	0,4	0,2	D2	25 mM NaCac	10 mM MgC	6	5% MPD	1 mM DTT	20	32	Cristales pequeños. Se fundieron. Precipitado amorfo
F33	2:1	0,4	0,2	D3	25 mM NaCac	8 mM MgCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	20	28	Cristales irregulares. Se fundieron
F34	2:1	0,4	0,2	D4	25 mM NaCac	10 mM NH ₄ AC	6	5% MPD	1 mM DTT	20	40	Cristales pequeños. Se fundieron.
F35	2:1	0,4	0,2	D2.2	25 mM NaCac	8 mM MgAC	6	2,5% MPD	1 mM DTT	20	36	Precipitado cristalino
F36	2:1	0,4	0,2	D4.2	25 mM NaCac	8 mM NH ₄ AC	6	5% MPD	1 mM DTT	20	41	Muchas agujas

□ Gota en la que se formaron cristales.

- **Oligonucleótido ATTAATTAAT:**

Condiciones de partida:

- Fármaco: CRMV50 2,5 mM en agua
- Oligonucleótido: (156) ATTAATTAAT 5,275 mM en 25 mM NaCac pH 6,5

Tabla B.9 Condiciones y observaciones de las gotas CRMV50 – ATTAATTAAT

Código	Relación fármaco-oligo	Concentración en gota (mM)		Solución de cristalización						Precipitante en pozo		Resultados
		Fármaco	Oligo	Nombre	Tampón	Sal	pH	Precip	Otro	% Inicial	% Final	
F37	2:1	0,4	0,2	D1	25 mM NaCac	8 mM MnCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	20	33	Precipitado amorfo y separación de fases
F38	2:1	0,4	0,2	D2	25 mM NaCac	10 mM MgC	6	5% MPD	1 mM DTT	20	43	Separación de fases
F39	2:1	0,4	0,2	D3	25 mM NaCac	8 mM MgCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	20	36	Precipitado cristalino y separación de fases
F40	2:1	0,4	0,2	D4	25 mM NaCac	10 mM NH ₄ AC	6	5% MPD	1 mM DTT	20	36	Precipitado cristalino y separación de fases
F41	4:1	0,8	0,2	D1	25 mM NaCac	8 mM MnCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	20	25	Precipitado amorfo y separación de fases
F42	4:1	0,8	0,2	D2	25 mM NaCac	10 mM MgC	6	5% MPD	1 mM DTT	20	34	Microcristales
F43	4:1	0,8	0,2	D3	25 mM NaCac	8 mM MgCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	20	36	Microcristales
F44	4:1	0,8	0,2	D4	25 mM NaCac	10 mM NH ₄ AC	6	5% MPD	1 mM DTT	20	26	Precipitado cristalino y separación de fases

■ Gota en la que se formaron cristales.

- **Oligonucleótido ATAATATTAT:**

Condiciones de partida:

- Fármaco: CRMV50 2,5 mM en agua
- Oligonucleótido: (153) ATAATATTAT 2,515 mM en 25 mM NaCac pH 6,5

Tabla B.10 Condiciones y observaciones de las gotas CRMV50 – ATAATATTAT

Código	Relación fármaco-oligo	Concentración en gota (mM)		Solución de cristalización						Precipitante en pozo		Resultados
		Fármaco	Oligo	Nombre	Tampón	Sal	pH	Precip	Otro	% Inicial	% Final	
F45	2:1	0,4	0,2	D1	25 mM NaCac	8 mM MnCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	20	25	Precipitado cristalino y separación de fases
F46	2:1	0,4	0,2	D2	25 mM NaCac	10 mM MgC	6	5% MPD	1 mM DTT	20	40	Microcristales y separación de fases
F47	2:1	0,4	0,2	D3	25 mM NaCac	8 mM MgCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	20	21	Precipitado amorfo
F48	2:1	0,4	0,2	D4	25 mM NaCac	10 mM NH ₄ AC	6	5% MPD	1 mM DTT	20	30	Separación de fases
F49	4:1	0,8	0,2	D1	25 mM NaCac	8 mM MnCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	20	16	Precipitado amorfo y separación de fases
F50	4:1	0,8	0,2	D2	25 mM NaCac	10 mM MgC	6	5% MPD	1 mM DTT	20	33	Cristales pequeños y brillantes
F51	4:1	0,8	0,2	D3	25 mM NaCac	8 mM MgCl ₂	6	5% MPD	1 mM DTT	20	23	Precipitado amorfo y separación de fases
F52	4:1	0,8	0,2	D4	25 mM NaCac	10 mM NH ₄ AC	6	5% MPD	1 mM DTT	20	29	Separación de fases

■ Gota en la que se formaron cristales.

- **Oligonucleótido GGGAAATTTCCC:**

Condiciones de partida:

- Fármaco: CRMV50 2,5 mM en agua
- Oligonucleótido: (417) GGGAAATTTCCC 2,75 mM en 25 mM NaCac pH 6,5

Tabla B.11 Condiciones y observaciones de las gotas CRMV50 – GGGAAATTTCCC

Código	Relación proteína-oligo	Concentración en gota (mM)		Solución de cristalización						Precipitante en pozo		Resultados
		Proteína	Oligo	Nombre	Tampón	Sal	pH	Precip	Otro	% Inicial	% Final	
F53	4:1	0,8	0,2	D2.2	25 mM NaCac	8 mM MgAC	6	2,5% MPD	1 mM DTT	20	15	Abundante precipitado amorfo
F54	4:1	0,8	0,2	D4.2	25 mM NaCac	8 mM NH ₄ AC	6	5% MPD	1 mM DTT	20	20	Abundante precipitado amorfo
F55	4:1	0,8	0,2	Natrix nº 15	25 mM NaCac	20 mM MgCl ₂	6	2,5% MPD		20	19	Abundante precipitado amorfo
F56	6:1	1,2	0,2	D2.2	25 mM NaCac	8 mM MgAC	6	2,5% MPD	1 mM DTT	20	16	Abundante precipitado amorfo
F57	6:1	1,2	0,2	D4.2	25 mM NaCac	8 mM NH ₄ AC	6	5% MPD	1 mM DTT	20	13	Abundante precipitado amorfo
F58	6:1	1,2	0,2	Natrix nº 15	25 mM NaCac	20 mM MgCl ₂	6	2,5% MPD		20	16	Abundante precipitado amorfo

ANEXO C: Aspectos económicos del proyecto

Los aspectos económicos del proyecto que se han tenido en consideración para estimar su coste aproximado son: material de laboratorio, reactivos, equipos de laboratorio, personal y conceptos generales.

El factor de uso presentado en las tablas de este anexo considera la fracción consumida (en caso de reactivos y materiales de laboratorio) o el tiempo de uso (en caso de equipos de laboratorio) de cada uno de los conceptos analizados. En el caso del tiempo de uso, se consideró la antigüedad del equipo de laboratorio y el tiempo real de su utilización en el proyecto para el cálculo del factor de uso.

Material de laboratorio

Tabla C.1. Costes asociados al material de laboratorio

Material	Precio unitario (€)	Factor de uso	Coste (€)
Cápsulas de cristalización	0,12	200	24,00
Concentrador Amicon Ultra-0,5 ml (caja)	133,80	0,04	5,35
Concentradores Vivaspin® - 20 ml (caja)	118,58	0,33	39,13
Concentradores Vivaspin® - 6 ml (caja)	147,46	0,08	11,80
<i>Cryo-vial/cryo-pin</i>	7,5	10	75,00
Guantes de Nitrilo (caja)	6,90	1	6,90
Membranas de diálisis Spectra/Por®	286,00	0,01	2,86
Parafilm (rollo)	25,00	0,1	2,50
Pipeta de plástico (caja)	4,00	0,1	0,40
Pipeta Pasteur (caja)	45,30	0,5	22,65
Placas de cultivo (24 x 20 piezas)	107,70	0,04	4,31
Puntas de micropipeta amarillas (bolsa)	13,60	1	13,60
Puntas de micropipeta azules (bolsa)	21,60	1	21,60
Puntas de micropipeta blancas (bolsa)	11,80	1	11,80
Tubos Eppendorf - 1,5 ml (bolsa)	69,30	1	69,30
Tubos Falcon - 15 ml (caja)	231,35	0,02	4,63
Tubos Falcon - 50 ml	0,78	6	4,68
Total			320,51

Reactivos

Tabla C.2. Costes asociados a los reactivos

Reactivo	Precio unitario (€)	Factor de uso	Coste (€)
Ácido acético (1 litro)	12,10	0,5	24,00
Ácido clorhídrico (1 litro)	11,24	0,02	6,05
Ácido tricloroacético (500 g)	130,50	0,002	0,22
Acrilamida (1 Kg)	79,00	0,05	0,26
Agar (500 g)	54,00	0,12	3,95
Ampicilina (5 g)	48,00	0,1	6,48
Azul de bromofenol (5 g)	10,83	0,04	0,43
Azul de Coomassie (100 g)	135,50	0,05	6,78
Bisacrilamida (100 g)	89,40	0,007	0,63
CHES (25 g)	61,60	0,004	0,25
Cloranfenicol (5 g)	14,00	0,01	0,14
Cloruro de calcio (250 g)	23,92	0,08	1,91
Cloruro de magnesio (100 g)	36,90	0,01	0,37
Cloruro de sodio (1 Kg)	11,41	0,4	4,56
DNAsa (1 ml)	106,50	0,0001	0,01
DTT (5 g)	129,40	0,15	19,41
EDTA (250g)	47,30	0,2	9,46
Espermina (1 g)	59,90	0,001	0,06
Etanol (2,5 litros)	21,87	0,2	4,37
Extracto de levadura (500 g)	24,00	0,1	2,40
Glicerol (1 litro)	48,08	0,002	0,10
Glicina (1 Kg)	84,20	0,3	25,26
HEPES (500 g)	155,20	0,04	6,21
Hidróxido de sodio (1 Kg)	104,00	0,02	2,08
Inhibidores de proteasa (20 tabletas)	261,90	0,15	39,29
IPTG (1 g)	74,50	2,38	177,31
Isopropanol (1 litro)	17,40	0,5	8,70
MPD (500 ml)	44,30	0,3	13,29
MWM (MW-SDS-6 Dalton Mark IV Sigma) (1 ml)	160,00	0,05	8,00
Nitrógeno líquido (1 litro)	0,72	2	1,44
Oligonucleótidos (6 x 4 mg)	3600,00	0,03	108,00
PEG 8000 (250g)	13,22	0,2	2,64
PSA (5 g)	12,20	0,25	3,05
SDS (100 g)	82,80	0,3	24,84
Soluciones Natrix HR2-116 (0,5 ml)	140,00	0,06	8,40
Sulfato de amonio (1 Kg)	130,00	0,03	3,90
TCEP (10 ml)	88,50	0,001	0,09
TEMED (100 ml)	25,60	0,001	0,03
Triptona (500 g)	37,00	0,2	7,40
Tris (1 Kg)	79,23	0,02	1,58
β -mercaptoetanol (100 ml)	35,70	0,07	2,50
Total			540,65

Equipos de laboratorio

Tabla C.3. Costes asociados a los equipos de laboratorio

Material	Precio unitario (€)	Factor de uso	Coste (€)
Agitador por inducción	200	0,00001	0,002
AKTA Purifier GE Healthcare	38330	0,0002	7,67
Armario refrigerado	3750	0,0002	0,75
Autoclave	2850	0,00006	0,17
Balanza	1000	0,00001	0,01
Baño de 37 °C	565	0,0003	0,17
Centrífuga	26750	0,0002	5,35
Columna HiTrap SP FF (5 ml)	111	0,3	33,30
Columna Superdex 75 (24 ml)	1859	0,2	371,80
Congelador de -20 °C	600	0,02	12,00
Congelador de -80 °C	4000	0,005	20,00
Cubeta y accesorios de electroforesis	470	0,05	23,50
Escáner de Gel Doc XR	10579	0,001	10,58
Espectrofotómetro UV	40000	0,0005	20,00
Estufa	697	0,0003	0,21
Fuente eléctrica	720	0,005	3,60
Incubadora	8900	0,0004	3,56
Jeringas Hamilton	58	0,01	0,58
Lavadora de material de laboratorio	4840	0,0005	2,42
Máquina de hielo	4000	0,003	12,00
Material para congelación	250	0,05	12,50
Mechero Bunsen	42	0,00003	0,001
Microcentrífuga	1000	0,02	20,00
Micropipetas	1400	0,06	84,00
Microscopio óptico	20000	0,004	80,00
Nevera de 14 °C	500	0,005	2,50
Nevera de 4 °C	500	0,005	2,50
Ordenador	400	0,02	8,00
pHmetro	1500	0,02	30,00
Purificador de agua	6300	0,003	18,90
Sonicador	2661	0,005	13,31
Total			799,37

En el caso particular del uso del sincrotrón, su coste no ha sido incluido debido a que el tiempo de uso fue asignado al grupo de investigación MACROM en forma de subvención, es decir, la sesión de uso fue cedida al proyecto sin pago asociado. Como referencia, se conoce que 1 hora de sincrotrón tiene un coste de aproximadamente 8000 euros.

Personal

Tabla C.4. Costes asociados al personal de laboratorio

Categoría	Precio (€/h)	Horas	Coste (€)
Investigador	18	1000	18000
Directores de proyecto	32	100	3200
Total			21200

Gastos generales

Los gastos generales involucran:

- Consumo de servicios básicos como agua corriente, electricidad y gas. El coste asociado a este concepto se estima como el 10 % del coste de uso de los equipos de laboratorio y el consumo de reactivos.
- Consumo de material de oficina y materiales de limpieza. Se estima un coste de 100 euros para este concepto.

Costes totales

Tabla C.5. Costes totales desglosados

Concepto	Coste (€)
Materiales de laboratorio	350,21
Reactivos	540,65
Equipos de laboratorio	799,37
Personal	21200
Conceptos generales	134
Total	23024,23

El coste total del proyecto es aproximadamente 23000 €. El concepto que mayor impacto tiene en el coste total es el asociado al personal de laboratorio, debido a que el número de horas implicadas en ensayos cristalográficos es cuantiosa.

ANEXO D: Evaluación del impacto ambiental del estudio

La evaluación de impacto ambiental permite definir el efecto potencial de un proyecto sobre su entorno. De esta manera, se pueden identificar, prevenir, evaluar y mitigar los efectos relevantes de orden biofísico, social u otro que producirá un proyecto en caso de ser ejecutado.

En este apartado se realiza una breve evaluación de impacto ambiental para este proyecto, siguiendo las recomendaciones de la guía “Consideraciones ambientales para los PFC” (ver bibliografía complementaria). La realización de dicha evaluación implica el desarrollo de la misma a través de información bibliográfica disponible y relevante.

Adicionalmente, dado que este estudio contempla el desarrollo de una larga etapa de experimentación, se muestra el impacto ambiental, causado por las actividades realizadas, acompañado de una serie de buenas prácticas ambientales tomadas en cuenta.

- Impacto ambiental de los resultados del proyecto

Este proyecto tiene como uno de sus objetivos el estudio estructural de las proteínas del tipo HMG-box, específicamente la HMGB1 box B y la NHP6A, unidas a ADN. Este conocimiento es de importancia en el desarrollo de estrategias terapéuticas para enfermedades relacionadas con el papel de estas proteínas en la transcripción, recombinación y reparación del ADN. De esta forma, tener información concreta acerca de estos complejos proteína-ADN, tendría un impacto social positivo, ya que contribuirían a la investigación contra diversas enfermedades, incluido el cáncer.

Por otro lado, también se estudia la interacción de compuestos derivados de difenilo bisimidazolinio con secuencias de ADN ricas en AT. Particularmente, gran parte del ADN de los microorganismos causantes de enfermedades tropicales como la malaria y la tripanosomiasis, es rico en AT, por lo que se consideran potentes compuestos contra dichas patologías. De nuevo, tener información concreta acerca de estos complejos proteína-ADN, tendría un impacto social positivo, ya que contribuirían a la investigación médica en este campo.

- **Impacto ambiental de la etapa de experimentación y buenas prácticas consideradas**

El impacto ambiental durante la etapa de experimentación del estudio se centra en la producción de residuos contaminados con sustancias químicas/biológicas y el posible daño a la salud o al medio resultante de la manipulación de dichas sustancias y residuos.

A pesar de que, por la naturaleza del proyecto, se usan cantidades muy reducidas de sustancias químicas/biológicas, a continuación se listan las actividades que las involucran y las buenas prácticas tomadas en cuenta para minimizar su impacto:

- Cultivo de bacterias: Al desechar los restos de cultivos, se deben tratar previamente con lejía para matar a los microorganismos y evitar su posterior crecimiento.
- Preparación de geles de electroforesis: tanto la preparación del tampón de muestras, y del gel, implican la manipulación de sustancias químicas dañinas para la salud y el ambiente, como β -mercaptoetanol y acrilamida, respectivamente. La preparación del tampón de muestras se hace en la campana de extracción usando equipos de protección personal; la preparación de la soluciones para el gel, específicamente la manipulación de acrilamida, se hace también con equipos de protección personal.
- Ensayos cristalográficos: durante los ensayos se usan reactivos como MPD y PEG 8000 como agentes precipitantes. Éstos se convierten posteriormente en residuos. Dichos residuos son dispuestos en contenedores especiales para su gestión posterior (empresa contratada especializada en gestión de residuos de laboratorio).
- Uso de consumibles durante la experimentación: el material de laboratorio contaminado (pipetas, puntas de pipetas, tubos eppendorf, tubos Falcon, recipientes de sustancias químicas vacíos, entre otros), así como equipos de protección personal (principalmente guantes) son desechados en contenedores especiales. Esta clase de residuos es dispuesta a través de la empresa de gestión de residuos.