



Instituto de Bioquímica Vegetal y
Fotosíntesis
Centro de Investigaciones Científicas
Isla de la Cartuja



ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LOS DETERMINANTES DE LA ESTABILIDAD EN PLASTOCIANINAS

Memoria presentada por el licenciado **D. Francisco Jesús Muñoz López** para
optar al grado de Doctor en Bioquímica.

Sevilla, 2011

Directores

Dr. D. Antonio J. Díaz Quintana
Profesor Titular de Universidad

Dr. D. Miguel A. De La Rosa Acosta
Catedrático de Universidad

Agradecimientos

El trabajo expuesto en esta tesis doctoral se ha desarrollado principalmente en el Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF), ubicado en el Centro de Investigaciones Científicas “Isla de La Cartuja” (icCartuja), centro mixto entre la Universidad de Sevilla y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Así también, una parte del mismo se llevó a cabo en el departamento de Física Biológica y Estadística de la Escuela Internacional Superior de Estudios Avanzados (SISSA) de Trieste (Italia), bajo la supervisión de los Drs. Paolo Carloni y Simone Raugei.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2006-01361), la Junta de Andalucía (BIO-198 y P06-CVI-01713), el proyecto HPC-EUROPA++ (RII3-CT-2003-506079) y el programa “Structuring the European Research Area” de la “European Union Research Infrastructure Action”.

Me gustaría agradecer el interés y dedicación prestados por parte de mis directores de tesis. A ellos les debo la oportunidad de haber podido iniciar, continuar y finalizar este trabajo.

El grupo de Proteómica Estructural y Funcional me ofreció una acogida muy calurosa. Tanto su apoyo y amistad como sus consejos se han visto reflejados de forma positiva en mi trabajo y desarrollo científico.

El entorno del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis ha puesto a mi disposición un ambiente profesional y afable en el que desarrollar mi labor investigadora. He de agradecer también el recibimiento y la atención que los miembros del departamento de Física Biológica y Estadística de la SISSA de Trieste me brindaron.

Por último, me gustaría agradecer el interés y la importante ayuda prestada por parte de mis amigos, mi novia y mi familia.

ÍNDICE

ÍNDICE	5
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABLAS	11
ABREVIATURAS	12
1. INTRODUCCIÓN	15
1.1 Los organismos termófilos y la estabilidad de sus proteínas	17
1.1.1 Los organismos extremófilos y termófilos	17
1.1.2 Estabilidad termodinámica de las proteínas	18
1.1.3 Factores estructurales que afectan a la estabilidad de las proteínas	19
1.2 Interacciones responsables del plegamiento y la estabilidad de las proteínas	20
1.2.1 Interacciones electrostáticas	20
1.2.1.1 Interacciones carga-carga	21
1.2.1.2 Dipolos eléctricos	21
1.2.1.3 Interacciones electrostáticas a alta temperatura	22
1.2.2 Enlaces de hidrógeno	23
1.2.3 Interacciones hidrófobas	24
1.2.4 Interacciones con el disolvente	26
1.3 Diferencias en la estructura de aminoácidos de proteínas termofílicas y mesofílicas	26
1.3.1 Aminoácidos apolares	27
1.3.2 Aminoácidos polares no cargados	28
1.3.3 Aminoácidos polares cargados	28
1.3.4 Aminoácidos aromáticos	29
1.4 Las plastocianinas y su sitio activo	30
1.4.1 Estructura y características de las plastocianinas	30
1.4.2 Centro de cobre de la plastocianina	33
1.5 Estabilidad de las plastocianinas	38
1.5.1 Las Plastocianinas	38
1.5.2 La plastocianina de <i>Phormidium laminosum</i> y su comparativa con la plastocianina de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	41
1.6 Objetivos	45
1.7 Publicaciones	46
2. MATERIALES Y MÉTODOS	47
2.1 Dinámica Molecular	49
2.1.1 Parametrización del centro de cobre	49
2.1.2 Simulaciones de dinámica molecular	49
2.2 Análisis de la termoestabilidad de la Pc-Pho mediante mutagénesis dirigida	54
2.2.1 Organismos y condiciones de cultivo	54
2.2.2 Procesamiento de DNA	56
2.2.3 Pruebas de expresión y producción de plastocianinas	59
2.2.3.1 Pruebas de expresión	59
2.2.3.2 Producción	59
2.2.4 Purificación de la plastocianina y sus mutantes	60
2.2.5 Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida	61

2.2.6 Espectroscopia de dicroísmo circular	61
2.2.7 Medidas potenciométricas	62
2.2.8 Medidas de estabilidad mediante espectroscopia de fluorescencia	62
2.2.9 Medida de la estabilidad proteica mediante espectrofotometría UV-visible ...	63
2.2.10 Medidas y análisis de los datos de espectroscopia de rayos-X.....	64
2.2.10.1 Análisis de los datos de XAS.....	65
3. RESULTADOS	67
3.1 Dinámica molecular	69
3.1.1 Análisis de la secuencia primaria	69
3.1.2 Cargas del centro de cobre	70
3.1.3 Convergencia del muestreo conformacional de las simulaciones	72
3.1.4 Flexibilidad de las proteínas	76
3.1.5 Características proteicas relacionadas con la estabilidad térmica	78
3.1.5.1 Contenido de estructura secundaria	78
3.1.5.2 Órdenes de contacto	79
3.1.5.3 Área accesible al solvente	82
3.1.5.4 Enlaces de hidrógeno	83
3.1.5.5 Puentes salinos	84
3.1.5.6 Interacciones hidrófobas	85
3.2 Análisis de la termoestabilidad de la Pc-Pho mediante mutagénesis dirigida	86
3.2.1 Diseño de los mutantes	86
3.2.1.1 Mutante F3A.....	87
3.2.1.2 Mutante doble P49G/G50P	88
3.2.1.3 Mutante F80A	89
3.2.2 Pruebas de expresión y producción	90
3.2.3 Purificación	92
3.2.4 Determinación de la estructura secundaria por espectroscopia de dicroísmo circular	93
3.2.5 Determinación del potencial redox	95
3.2.6 Determinación de la temperatura de desnaturalización de la Pc mediante espectroscopia de fluorescencia	96
3.2.7 Monitorización de la pérdida de absorbancia a 597 nm de la Pc por calentamiento	99
3.2.8 Determinación de la estructura del centro de cobre por espectroscopia de dicroísmo circular	100
3.2.9 Determinación de la geometría del centro de cobre mediante espectroscopia de absorción de rayos-X	101
4. DISCUSIÓN	107
5. CONCLUSIONES	115
6. BIBLIOGRAFÍA	119

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama topológico de la Pc- <i>Pho</i> (plastocianina de <i>Phormidium laminosum</i>)	31
Figura 2	Estructura tridimensional de la Pc- <i>Pho</i>	32
Figura 3	Espectros XAS del complejo $D_{4h}[CuCl_4]^{2-}$ y del sitio de cobre azul de la plastocianina de álamo	35
Figura 4	Espectro XAS de la Pc- <i>Pho</i> reducida	36
Figura 5	Alineamiento de secuencia de la Pc- <i>Pho</i> y la Pc- <i>Syn</i>	69
Figura 6	Representación del centro de cobre de las plastocianinas	70
Figura 7	Comparación de las fluctuaciones de los Ca de la Pc- <i>Syn</i> en distintas simulaciones de dinámica molecular a 298 K utilizando distintas estructuras iniciales	73
Figura 8	Comparación de las fluctuaciones de los Ca de la Pc- <i>Syn</i> en distintas simulaciones utilizando distintos protocolos de equilibrado	74
Figura 9	Solapamiento del subespacio de los vectores propios correspondientes al análisis de componentes principales de la matriz de covarianza de la simulación de la Pc- <i>Pho</i> a temperatura ambiente	76
Figura 10	Fluctuaciones medias a 298 K	77
Figura 11	Evolución de la estructura secundaria de las dos Pcs a lo largo del tiempo de simulación	79
Figura 12	Ejemplos de configuraciones locales cuyos parámetros topológicos y ponderados son distintos	80
Figura 13	Enlaces de hidrógeno entre la quinta y sexta hebra β de las Pc- <i>Pho</i> y Pc- <i>Syn</i> a 298 K	84
Figura 14	Interacciones iónicas atractivas con ocupaciones superiores al 60% a una temperatura de 498 K en la región A de la Pc- <i>Pho</i> y la Pc- <i>Syn</i>	85
Figura 15	Agrupaciones hidrófobas de los residuos localizados en los lazos que conectan la quinta y sexta hebra β y la séptima y octava hebra β de las Pc- <i>Pho</i> y Pc- <i>Syn</i>	86
Figura 16	Estructura tridimensional de la Pc- <i>Pho</i> donde se resaltan los residuos Phe3, Val21 y Val23	88
Figura 17	Estructura tridimensional de la Pc- <i>Pho</i> donde se destacan los residuos Pro49 y Tyr85	89
Figura 18	Estructura tridimensional de la Pc- <i>Pho</i> donde se resaltan los residuos Leu55, Leu59, Phe76 y Phe80	90
Figura 19	Gel de electroforesis de acrilamida teñido con azul de coomassie. De izquierda a derecha se encuentran la Pc- <i>Pho</i> , el mutante P49G/G50P, el mutante F3A, el mutante F80A y finalmente el marcador de peso molecular (MM)	93
Figura 20	Espectros de CD de la Pc- <i>Pho</i> y de los mutantes F3A, P49G/G50P y F80A.	94

Figura 21	Valoraciones redox de la Pc- <i>Pho</i> , y sus mutantes F3A, P49G/G50P y F80A	96
Figura 22	Pérdida de la absorbancia visible de la Pc- <i>Pho</i> dependiente de la temperatura	97
Figura 23	Valores de T_m (°C) correspondientes al despliegue en ambos estados de oxidación de las Pcs silvestres de <i>Phormidium</i> (Pc- <i>Pho</i>) y <i>Synechocystis</i> (Pc- <i>Syn</i>) y de los mutantes de <i>Phormidium</i> .	98
Figura 24	Valores de T_m y T_{Cu} correspondientes a las especies oxidadas de la Pc silvestre de <i>Phormidium</i> (Pc- <i>Pho</i>) y sus mutantes	99
Figura 25	Espectros de dicroísmo circular de la región visible de la Pc- <i>Pho</i> y del doble mutante P49G/G50P.	100
Figura 26	Región XANES y región del umbral de los espectros de rayos-X de absorción de la Pc- <i>Pho</i> , el mutante P49G/G50P y la Pc- <i>Syn</i>	101
Figura 27	Prueba de desenfoco del monocromador para estudiar la posible fotorreducción de las muestras	102
Figura 28	Ondas EXAFS, ponderadas según el valor de k, obtenidas a partir de los espectros de absorción de rayos-X	103
Figura 29	Módulos de las transformadas de Fourier de las ondas EXAFS obtenidas a partir de espectros de absorción en el umbral-K del cobre	104
Figura 30	Región XANES y del pre-pico del espectro del umbral-K del azufre de la Pc- <i>Syn</i>	106

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Datos de EXAFS del centro de cobre oxidado y reducido de diferentes plastocianinas y azurinas	37
Tabla 2	Valores de T_m (°C) de las plastocianinas de <i>Phormidium</i> , <i>Synechocystis</i> , <i>espinaca</i> y álamo (<i>Populus sp.</i> , <i>Pop</i>); de la amicianina de <i>Paraccocus denitrificans</i> y de la azurina de <i>Pseudomonas aeuginosa</i>	44
Tabla 3	Genotipo de las estirpes de <i>E. coli</i> empleadas en este trabajo	55
Tabla 4	Cargas atómicas calculadas para los átomos de la Pc-Pho de la primera esfera de ligandos del cobre, incluido este último	71
Tabla 5	Cargas atómicas calculadas para los átomos de la Pc-Syn de la primera esfera de ligandos del cobre, incluido este último	72
Tabla 6	Datos estadísticos de las propiedades de la Pc calculados a lo largo de las trayectorias	75
Tabla 7	Topología de los contactos de las estructuras cristalográficas de la Pc-Pho y la Pc-Syn y de las trayectorias de MD a distintas temperaturas	81
Tabla 8	Razones promedio entre el área accesible al solvente (SAS) apolar y SAS polar de la Pc-Pho y Pc-Syn así como de los residuos comprendidos en la Región A de cada proteína	82
Tabla 9	Rendimientos de producción obtenidos con distintas estirpes	91
Tabla 10	Rendimiento de las producciones de la Pc-Pho silvestre y sus mutantes en distintos volúmenes de cultivo y condiciones de aerobividad	92
Tabla 11	Porcentajes de recuperación en los pasos de purificación de intercambio iónico y de filtración molecular	92
Tabla 12	Porcentajes de estructura secundaria de la Pc-Pho y sus mutantes en el estado redox Cu(I)	95
Tabla 13	Valores del potencial redox de la Pc-Pho y sus mutantes	96
Tabla 14	Parámetros ajustados resultantes del análisis EXAFS de las Pcs recombinantes	105

ABREVIATURAS

Am	Amicianina
Apo	Apoproteína
Az	Azurina
CD	<i>Circular Dichroism</i>
DEAE	Dietilaminoetil
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNasa	<i>Deoxyribonuclease</i>
E_m	Potencial redox
ϵ_a	Constante dieléctrica del agua a temperatura ambiente
ϵ_p	Constante dieléctrica del interior de una proteína a temperatura ambiente
EDTA	Etilendiaminotetraacetato de sodio
EH	Enlace de hidrógeno
FL	Filtración
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
G	Aceleración gravitatoria terrestre
HOMO	<i>Highest occupied molecular orbital</i>
II	Intercambio iónico
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
LB	Medio Luria-Bertani
LUMO	<i>Lowest occupied molecular orbital</i>
MD	<i>Molecular dynamics</i>
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
OC	Órdenes de contacto
p/p	Relación peso-peso
p/v	Relación peso-volumen

pBS	Plásmido pBluescript II SK+
pBS-WT	Plásmido pBluescript II SK+ con el gen <i>petE</i>
Pc	Plastocianina
Pc- <i>Pho</i>	Plastocianina de <i>Phormidium laminosum</i>
Pc- <i>Syn</i>	Plastocianina de <i>Synechocystis</i> sp. 6803
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pGEMT	Plásmido derivado de pGEM-5ZF(+) (Promega)
PS	Puente salino
PsAz	Pseudoazurina
R _g	Radio de giro
RESP	<i>Restrained electrostatic potential</i>
RMSD	<i>Root mean square deviation</i>
RMSF	<i>Root mean square fluctuation</i>
Rpm	Revoluciones por minuto
SAS	<i>Solvent accessible area</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i>
T _{Cu}	Temperatura de fusión del centro de cobre
T _m	Temperatura de fusión de la proteína
TOC	Temperatura óptima de crecimiento
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UV	Luz ultravioleta
v/v	Relación volumen-volumen
Vis	Luz visible
XAFS	<i>X-ray absorption fine structure</i>
XANES	<i>X-ray absorption near edge structure</i>
XAS	<i>X-ray absorption spectroscopy</i>
X-GAL	5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Los organismos termófilos y la estabilidad de sus proteínas

1.1.1 Los organismos extremófilos y termófilos

La vida se encuentra en casi cualquier lugar de la Tierra, tanto en las grietas hidrotermales de los suelos marinos o en las aguas en ebullición de los géiseres, como en los picos de la cordillera del Himalaya o en las frías extensiones de la Antártida.

Los seres vivos se pueden clasificar en función del ambiente en el que habitan y de su adaptación al mismo. Así encontramos organismos psicrófilos o termófilos, adaptados a bajas o altas temperaturas respectivamente; halófilos, en ambientes con una alta concentración salina; acidófilos o alcalifilos propios de ambientes de bajos o altos pH respectivamente; los barófilos en condiciones de alta presión, etcétera. En general, estos organismos se denominan extremófilos y han llamado la atención de numerosos científicos desde los primeros estudios llevados a cabo por Perutz y colaboradores en los años 70 (Perutz y Raidt, 1975; Perutz, 1978).

Según la temperatura óptima de crecimiento (TOC), los organismos se clasifican en cuatro grupos: psicrófilos, con una TOC en el rango de -5 a 15 °C, mesófilos con una TOC entre 15 y 45 °C, termófilos con una TOC entre 45 y 80 °C, y los hipertermófilos (o termófilos extremos) con una TOC superior a 80 °C (Vieille y Zeikis, 2001; Li *et al.*, 2005). Las proteínas originarias de organismos mesófilos se denominan proteínas mesofílicas, y termofílicas las de los organismos termófilos o hipertermófilos (Pantazaki *et al.*, 2008).

Desde el punto de vista de la biología celular, los componentes de la membrana y pequeñas moléculas protectoras juegan un papel importante en el caso de las adaptaciones a salinidad, pH o presión extremas, (Jaenicke, 1991; Yancey *et al.*, 1982; van de Vossenber *et al.*, 1998). En las adaptaciones a temperaturas extremas, los componentes celulares como por ejemplo, las proteínas, deben ser termoestables (Jaenicke y Zavodszky, 1990).

1.1.2 Estabilidad termodinámica de las proteínas

La estabilidad de las proteínas ha sido objeto de prolijos estudios durante las últimas décadas debido al papel fundamental que juegan estas macromoléculas en los procesos fisiológicos, su implicación en diversas enfermedades y sus aplicaciones biotecnológicas. La función ejercida por una proteína depende de una conformación proteica específica, de modo que si esta conformación se deforma o pierde, la proteína se torna ineficaz. La conformación o estado funcional se denomina nativo y su estabilidad es el resultado de la suma de distintas fuerzas de signo opuesto. En condiciones extremas, salvo de alta presión (Floriano *et al.*, 2007), se produce una transición conformacional por la que la proteína pasa de un estado bien organizado a una estructura de ovillo aleatorio, conocida como estado desplegado. A temperatura ambiente, el estado plegado está favorecido por el efecto hidrófobo y los enlaces de hidrógeno mientras que factores entrópicos favorecen el estado desplegado (Kauzmann, 1959; Dill, 1990; Pace *et al.*, 1996). Esta serie de interacciones se comentarán en el apartado 1.2.

Existe una íntima relación entre la secuencia, la estructura y la estabilidad proteicas. La secuencia define la estructura tridimensional y es la variable que los organismos alteran en el proceso de adaptación al ambiente. La estabilidad dependerá de la estructura de la proteína en sus estados nativo y desplegado. Normalmente, se determina experimentalmente perturbando el estado nativo con cambios en la temperatura o usando osmolitos desnaturalizantes (urea, cloruro de guanidinio) y siguiendo esta reacción por medio de sondas directas (calorimetría) o indirectas (espectroscópicas).

La estabilidad termodinámica de una proteína se define cuantitativamente por el incremento de energía libre de Gibbs en el proceso de despliegue:

$$\Delta G_u = -RT \ln K_u$$

Siendo R la constante de los gases ideales, T la temperatura a la que ocurre la transición, y K_u la constante de equilibrio de la misma.

La diferencia de energía libre entre el estado nativo y desnaturalizado es muy pequeña debido a que la contribución entrópica y entálpica al proceso de plegamiento casi se cancelan (Makhatadze y Privalov, 1995; Finkelstein, 2004). Ambas contribuciones son grandes, pero de signo contrario: la entropía conformacional de la proteína decrece durante el plegamiento, por lo que la contribución a la energía libre será positiva. Por el contrario, la contribución entálpica es negativa, mayormente debido a la formación de enlaces de hidrógeno. Por ello la energía libre de despliegue es solamente del orden de decenas de kJ mol^{-1} (Fersht, 1999).

1.1.3 Factores estructurales que afectan a la estabilidad de las proteínas

En los últimos años se ha estado realizando un esfuerzo considerable para analizar los factores estructurales que determinan la estabilidad térmica de las proteínas de los organismos termófilos e hipertermófilos. Dos han sido los principales obstáculos de este análisis, uno es la marginal estabilidad termodinámica de estas proteínas (unos pocos kJ mol^{-1} a la temperatura óptima) resultado del delicado balance entre las distintas interacciones intra e intermoleculares, el otro lo constituyen las frecuentes transiciones irreversibles observadas a altas temperaturas entre el estado plegado y desplegado (Karshikoff y Ladenstein, 2001).

Análisis teóricos y experimentales han mostrado que la estabilidad térmica se consigue mayormente por pequeños pero importantes cambios en distintos lugares de la estructura proteica donde interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno, el empaquetamiento y el efecto hidrófobo juegan un papel relevante. En 1974, Matthews concluyó que no hay un único determinante común en la termoestabilidad (Matthews *et al.*, 1974).

1.2 Interacciones responsables del plegamiento y la estabilidad de las proteínas

La proteína recién formada o desplegada es mayoritariamente un estado con múltiples conformaciones de lazo aleatorio (“*random coil*”) en intercambio, probablemente con un cierto grado de estructura local, dictado por las interacciones con los grupos vecinos más próximos en la secuencia. De esta forma, en el estado desplegado hay una mayor proporción de interacciones intermoleculares con moléculas del disolvente que en el estado plegado. Las moléculas del disolvente contactan con toda la cadena desplegada, pero sólo con una pequeña parte de la molécula plegada.

Las estabilidades de los estados plegado y desplegado dependen de las concentraciones efectivas y de las distribuciones espaciales de los grupos que favorecen interacciones no covalentes y la formación de puentes disulfuro. Creighton *et al.* (Creighton, 1983, 1990; Goldenberg y Creighton, 1985) mostraron en diversos estudios que los puentes salinos y los enlaces de hidrógeno intramoleculares no son estables en una proteína desplegada en agua mientras que los puentes disulfuro, los enlaces de hidrógeno, los puentes salinos, y las interacciones de van der Waals del estado plegado contribuyen efectivamente a la estabilidad neta.

Veamos más en profundidad cada una de las interacciones moleculares mencionadas.

1.2.1 Interacciones electrostáticas

Las interacciones electrostáticas son un factor importante que confiere estabilidad a las proteínas, aunque este tema no ha estado exento de discusión y controversia (Waldburger *et al.*, 1995). En esta introducción presentaremos las interacciones entre cargas puntuales y las interacciones en las que participan dipolos eléctricos.

1.2.1.1 Interacciones carga-carga

Debido a que la estabilidad proteica o la T_m se reduce a valores de pH extremos, las interacciones electrostáticas parecen ser importantes para mantener la estabilidad a pH neutro. Además, a altas temperaturas, las interacciones carga-carga se fortalecen mientras que las hidrófobas decrecen (Cambillau y Claverie, 2000).

Consideraremos las contribuciones electrostáticas a la estabilidad de las proteínas plegadas. Sundaralingam *et al.* (1987) encontraron que es común la presencia de aminoácidos de carga opuesta con una separación entre ellos de cuatro residuos. Esta observación es más evidente en el caso de las hélices α . Estos pares iónicos intrahélices estabilizan las hélices expuestas al disolvente y, por lo tanto, la estabilidad de la estructura terciaria.

Fersht (1971, 1972) apuntó a un valor de -12 kJ mol^{-1} para la energía libre de formación de un par iónico no expuesto a la superficie proteica. De los estudios de Perutz y Raidt (1975) y Brown *et al.* (1978) se infirió que la contribución a la energía libre de Gibbs de un par iónico superficial está alrededor de -4 kJ mol^{-1} . Finalmente, el grupo el Alan Fersht, mediante estudios de ingeniería de proteínas, mostró que las interacciones electrostáticas entre cargas puntuales dependen fuertemente del contexto, un único par iónico en la superficie de la proteína no contribuirá de forma significativa a la estabilidad proteica (Horovitz *et al.*, 1990).

1.2.1.2 Dipolos eléctricos

Las fuerzas electrostáticas también abarcan las interacciones de dipolo. En una hélice α , los dipolos peptídicos se alinean casi paralelos al eje de la hélice creando un dipolo global para la hélice que se distribuye a lo largo de dicho eje, con una intensidad de 3,5 Debyes por cada 1,5 Å de longitud. Cargas que se posicionen favorablemente con los dipolos de las hélices confieren estabilidad al estado plegado de las proteínas globulares. Las primeras medidas cuantitativas de la energía de una interacción carga-dipolo, en un segmento helicoidal de una proteína nativa, permitieron estimar valores dentro del rango de -6 a -9 kJ mol^{-1} para la interacción

entre la forma protonada de una histidina situada en el extremo C-terminal y el dipolo de la hélice (Sali *et al.*, 1988).

Aunque con menos atención, también se han estudiado los momentos dipolares de las hebras β . Teniendo en cuenta cargas parciales, Hol *et al.* (1981) concluyeron que las hebras β paralelas presentan un momento dipolar significativo (1,15 D por residuo), a diferencia de las hebras antiparalelas. Este momento dipolar tendría origen en el extremo C-terminal y finalizaría en el N-terminal. Estos cálculos se basaron en el estudio de cargas parciales y no tuvieron en cuenta la constante dieléctrica del entorno acuoso de las proteínas. Más recientemente, FarzadFar *et al.* (2008) constataron la aparición de residuos negativos en el extremo C-terminal y residuos positivos en el extremo N-terminal, proponiendo un momento dipolar de las hebras β paralelas de mayor valor que el propuesto por Hol *et al.* De esta forma, las interacciones hélices α /hebras β son favorables cuando ambas se disponen entre sí de forma antiparalela.

Las interacciones de iones con el momento dipolar de grupos amidas también están implicadas en el aumento de la estabilidad proteica (Gunner *et al.*, 2000). Ejemplos claros son las proteínas con sitios de unión a calcio, fosfato y sulfato, y los canales de potasio.

1.2.1.3 Interacciones electrostáticas a alta temperatura

Las redes de interacciones electrostáticas están más optimizadas en las proteínas termofílicas que en las mesofílicas, independientemente del número de puentes establecidos (Xiao y Honig, 1999).

Los pares iónicos se suelen organizar en redes (“clusters”), y los puentes salinos individuales dentro de estas redes no siempre tienen un efecto estabilizante sino que la red en su conjunto ejerce dicho efecto. La introducción de un aminoácido cargado en una localización apropiada puede dar lugar a cambios conformacionales que refuercen uno o más puentes salinos, produciéndose un efecto cooperativo. El efecto estabilizante producido en la proteína también

dependerá de los cambios producidos en las interacciones no covalentes vecinas, es decir, la introducción de un grupo cargado no tiene un efecto puramente electrostático.

El valor de la constante dieléctrica del agua a temperatura ambiente, ϵ_a , es de 78 mientras que en el interior de la proteína, ϵ_p , se estima que oscila alrededor de 4 (Karshikoff *et al.*, 2001). De esta manera, en términos generales, la energía necesaria para transferir una carga esférica del solvente al interior de la proteína se puede definir como:

$$\Delta W_{ii} = \frac{q_i^2}{2R} \left(\frac{1}{\epsilon_p} - \frac{1}{\epsilon_a} \right)$$

Donde q_i es el valor de la carga y R el radio de la esfera de la misma. Ésta es la energía de desolvatación, que por ser siempre positiva (desfavorable) se suele conocer como penalización de desolvatación. A alta temperatura la constante dieléctrica del agua se reduce considerablemente (Archer, 1990) mientras que la de la proteína apenas varía, por lo que se consigue que la penalización de desolvatación se reduzca. Esta es la razón por la que la contribución de los puentes salinos a la estabilidad de las proteínas es más significativa a altas temperaturas (Karshikoff *et al.*, 2001).

Por último, las proteínas termofílicas no sólo presentan nuevas redes electrostáticas estabilizantes sino que también constan de un menor número de contactos repulsivos, o bien, estos presentan menor intensidad (Spasov *et al.*, 1994).

1.2.2 Enlaces de hidrógeno

Los enlaces de hidrógeno desarrollan un papel importante en la estabilidad proteica, manteniendo las estructuras secundarias y, también, mediando interacciones de las cadenas laterales con el disolvente o contraiones. Estudios estadísticos indican que el contenido de enlaces de hidrógeno en proteínas

globulares es aproximadamente constante y se encuentra entorno a $0,75 \pm 0,10$ enlaces por residuo (Chothia, 1975; Privalov y Gill, 1988).

La pregunta sobre si los enlaces de hidrógeno contribuyen favorablemente a la estabilidad proteica se ha debatido durante más de 50 años (Pauling *et al.*, 1951; Kauzmann, 1959; Dill, 1990; Pace, 1995; BenTal *et al.*, 1997). En parte, la controversia originada refleja la falta de un sistema modelo en el cual la estabilidad de un enlace de hidrógeno se pueda estimar independientemente de otros factores, como por ejemplo las interacciones electrostáticas o factores estéricos. Estudios como los de Schellman (1955), Privalov (1979), Scholtz *et al.* (1991), Shirley *et al.* (1992), Myers y Pace (1996), y Morozov y Kortemme (2005) sugirien un valor entre -4 y -8 kJ mol⁻¹ para la contribución media a la estabilidad proteica de cada enlace de hidrógeno.

La geometría de un enlace de hidrógeno es variable, especialmente los ángulos entre los grupos N-H y O=C en hélices y láminas β paralelas y antiparalelas. Así, los enlaces de hidrógeno contribuyen de manera desigual en proteínas, elementos de estructura secundaria y ambientes distintos. Además, el pK_a intrínseco de los grupos funcionales formadores de enlaces de hidrógeno en las cadenas laterales (grupos amino, amida, carboxilo, hidroxilo y guanidinio) puede diferir significativamente, incluso para el mismo residuo, en una secuencia distinta (Bai *et al.*, 1993). Por último, la contribución neta de los enlaces de hidrógeno a la estabilidad global de la proteína también depende de términos tales como la solvatación y desolvatación.

1.2.3 Interacciones hidrófobas

Todos los residuos ocultan una parte de su superficie cuando la cadena polipeptídica se pliega. Esta reorganización del área superficial se estabiliza mediante interacciones hidrófobas (Kauzmann, 1959; Tanford, 1962; Lim y Sauer, 1989).

Kauzmann (1959) describió la estabilidad proteica, la unión (“*binding*”) y agregación de proteínas en base a la interacción hidrófoba, un concepto apenas descrito hasta entonces (Klotz, 1958). Kauzmann agrupó datos sobre los cambios de entalpía, energía libre y entropía de la transferencia de hidrocarburos aromáticos o grupos alifáticos simples desde un ambiente no polar a un entorno acuoso a temperatura ambiente (25 °C). Señaló que la baja afinidad (alta energía libre positiva) de estas moléculas por el agua se debe enteramente a un cambio de entropía considerable y no favorable para la transferencia. El origen de este gran cambio negativo de entropía y el pequeño cambio negativo de entalpía había sido ya descrito por Frank y Evans (1945): cuando una molécula no polar se encuentra en agua, las moléculas de agua de los alrededores inmediatos deben organizarse en una estructura quasi-cristalina, en la cual hay menos azar y se da una pequeña mejora en los enlaces de hidrógeno con respecto al agua líquida ordinaria a la misma temperatura.

Kauzmann (1959) presentó un diagrama termodinámico de las moléculas de proteína en el que las cadenas laterales no polares tienen una baja afinidad por el agua. Esta tendencia de los grupos no polares de las proteínas a adherirse los unos a los otros en ambientes acuosos ha sido denominada unión hidrófoba.

Mientras que sí hay pruebas experimentales con respecto a las contribuciones de los pares iónicos, dipolos carga-hélice, y enlaces de hidrógeno a la estabilidad de las proteínas, cálculos tales como los del área accesible al solvente (“*solvent accessible area*” o SAS) son necesarios para estimar la contribución hidrófoba en términos cuantitativos (Lee y Richards, 1971; Richards, 1974 y 1977; Chotia, 1974; Richmond, 1984).

El SAS se define como la superficie proteica en contacto con el disolvente. Para su estimación se tiene en cuenta el conjunto de puntos ocupados por una sonda esférica que emula una molécula de agua deslizándose a lo largo de la superficie de van der Waals de la molécula en cuestión.

Con respecto a su dependencia con la temperatura, destacaremos que la fuerza de las interacciones hidrófobas aumenta con la temperatura hasta 60-70 °C, mientras que la contribución por enlace de hidrógeno a la energía libre permanece más o menos constante al aumentar la temperatura (Scheraga, 1963; Brandts, 1967)

1.2.4 Interacciones con el disolvente

Ya que el agua es el entorno en el cual las proteínas existen y operan, la estructura y la dinámica del agua de hidratación está directamente ligada a la dinámica y estabilidad proteica. Por consiguiente, cosolventes que cambian las propiedades del agua de hidratación pueden modificar el equilibrio entre ambos estados, por ejemplo, los llamados desnaturizantes químicos lo inclinan a favor del estado desnaturizado. Esta es la razón por la que cambiar el potencial químico del disolvente, modificando la concentración de los cosolventes o agentes desnaturizantes, proporciona una herramienta valiosa para sondear la estabilidad proteica y la interacción agua proteína. Por ejemplo, la adición de glicerol a una solución de una proteína plegada conduce a cambios en la estructura y en la dinámica, como se refleja en los cambios de volumen y comprensibilidades (Prieu *et al.*, 1996).

1.3 Diferencias en la estructura de aminoácidos de proteínas termofílicas y mesofílicas

Las características de una proteína, entre ellas la estabilidad termodinámica, están relacionadas con su composición de aminoácidos (Diao *et al.*, 2008, Scandurra *et al.*, 1998). Sin embargo, al estudiar las proteínas de organismos extremófilos, no se ha encontrado ningún nuevo aminoácido, modificaciones covalentes o motivos estructurales que expliquen la habilidad de estas moléculas para funcionar en ambientes tan hostiles. Más bien, una reorganización de las mismas interacciones intramoleculares que estabilizan a las proteínas a temperaturas moderadas son

suficientes para mantener la integridad estructural a temperaturas extremas (Fields, 2001).

Kumar *et al.* (2000) encontraron que, incluso en proteínas con alta homología de secuencia, las diferencias en las distribuciones de aminoácidos en las proteínas termofílicas y mesofílicas son significativas. Mientras que algunas diferencias en las distribuciones de aminoácidos se deben a razones filogenéticas, otras se relacionan con la termoestabilidad de las proteínas.

Según las propiedades de las cadenas laterales los aminoácidos se clasifican en cuatro grupos: apolares, polares no cargados, polares cargados y aromáticos. Veamos como estas clases de aminoácidos se correlacionan con la termoestabilidad proteica.

1.3.1 Aminoácidos apolares

El contenido de aminoácidos hidrófobos es marginalmente mayor en los organismos termófilos que en los mesófilos, pudiendo incrementarse así la rigidez e hidrofobicidad de las proteínas (Chakravarty y Varadarajan, 2002). Un mayor contenido de Ala en las proteínas termofílicas refleja el hecho de que la Ala es el residuo que mejor forma las hélices. Por otro lado, aunque las hélices de las proteínas termofílicas contienen una menor fracción de residuos ramificados en C_β (valina, isoleucina y treonina) que las hélices de las proteínas mesofílicas, y los aminoácidos ramificados en C_β desestabilizan la hélice α , la mayoría de los estudios muestran que las proteínas termofílicas presentan una mayor frecuencia de isoleucina y valina en comparación con las mesofílicas. Además, se encontró que las proteínas termofílicas constan de un mayor índice alifático debido a un mayor contenido de leucinas.

El residuo de prolina es conocido por dar lugar a conformaciones rígidas o giros (Watanabe *et al.*, 1997). Algunos análisis muestran que las proteínas termofílicas tienen una composición más alta en prolinas que las mesofílicas (Xu *et al.*, 2003; Pack *et al.*, 2004; Sadeghi *et al.*, 2006).

La metionina es un aminoácido termolábil debido a su tendencia a oxidarse a altas temperaturas. Algunos análisis sistemáticos muestran una menor proporción de metioninas en las proteínas termofílicas (Kumar *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2003).

En general, y aunque es difícil establecer un patrón claro e infalible, existe un aumento de los grupos hidrófobos en las proteínas termofílicas, seguramente debido al papel del efecto hidrófobo que desestabiliza las formas desplegadas y aumenta con la temperatura hasta 60-70 °C (Ikai, 1980; Britton *et al.*, 1995).

1.3.2 Aminoácidos polares no cargados

Muchos trabajos han propuesto que el contenido de residuos polares no cargados es menor en los organismos termófilos que en los mesófilos (Kumar *et al.*, 2000; Chakravarty y Varadarajan, 2002; Pack y Yoo, 2004). De esta forma podrían minimizarse tanto los problemas de desaminación de la asparagina y la glutamina a alta temperatura (Tomazic y Klibanov, 1988), como el efecto desestabilizador producido por la liberación a altas temperaturas de moléculas de agua fijadas a los residuos de treonina y serina.

La cisteína, como la metionina, es también termolábil sufriendo oxidación a alta temperatura (Russell *et al.*, 1994), así que también aparece con menor frecuencia en las proteínas termofílicas (Kumar *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2003).

Según apuntan Sadeghi *et al.* (2006), los residuos polares no cargados tienden a substituirse por residuos cargados en las proteínas termofílicas, manteniéndose así la capacidad de formar enlaces de hidrógeno con aminoácidos menos lábiles.

1.3.3 Aminoácidos polares cargados

Los aminoácidos cargados contribuyen a la interacción electrostática en la parte externa de la proteína (Dill, 1990; Kumar, 2000; Ladbury, 1995; Creighton, 1997; Vogt *et al.*, 1997). La proporción de residuos cargados es mayor en las proteínas de organismos hipertermófilos que en las mesofílicas, lo que mayormente se debe a sustituciones por residuos polares no cargados, con la excepción de la

histidina que se encuentra en menor proporción (Chakravarty y Varadarajan, 2002; Pack y Yoo, 2004).

Algunos trabajos apuntan al descenso del número de residuos de lisina en las proteínas termofílicas compensado por un aumento de argininas, argumentando que el grupo guanidinio proporciona una mayor área superficial para formar puentes iónicos que la lisina, pudiendo establecerse más puentes de este tipo. Otros estudios, sin embargo, sugieren una mayor aparición de lisinas en detrimento del número de argininas en las proteínas termofílicas, siendo este uno de los tantos ejemplos en los que los científicos del campo de la termoestabilidad de las proteínas no han llegado a un acuerdo.

El aspartato es inestable a altas temperaturas y por lo tanto su porcentaje decrece en los organismos hipertermófilos según Szilagyi y Zavodszky (2000). Este resultado contradice los de Tanaka *et al.* (2004) que indican que las interacciones con el aspartato son críticas para la estabilidad térmica particularmente en las proteínas termofílicas de organismos hipertermófilos.

El aumento de aminoácidos cargados en las proteínas termofílicas podría ser también una consecuencia indirecta del descenso en los residuos polares.

1.3.4 Aminoácidos aromáticos

Las proteínas termofílicas tienen un mayor número de interacciones entre aminoácidos aromáticos. De hecho, las proteínas de organismos hipertermófilos también contienen un número ligeramente mayor de aminoácidos aromáticos que las mesofílicas, especialmente en el caso de la tirosina. El triptófano se da con igual frecuencia en ambos tipos (Kumar *et al.*, 2000) aunque las proteínas termofílicas muestran una mayor frecuencia de triptófano enterrado en el núcleo proteico (Pack y Yoo, 2004).

Estos residuos a menudo se organizan dando lugar a agrupaciones aromáticas (“*clusters*”). En el caso de las proteínas termofílicas, las agrupaciones son más pequeñas y se encuentran distribuidas en la superficie proteica. Agrupaciones

adicionales se localizan frecuentemente cerca del sitio activo de las enzimas (Kannan y Vishveshwara, 2000).

1.4 Las plastocianinas y su sitio activo

1.4.1 Estructura y características de las plastocianinas

Las plastocianinas pertenecen a la superfamilia de las proteínas azules de cobre (Freeman y Guss, 2001) ("*Blue copper proteins*" o BCPs), también conocidas como cupredoxinas tipo-1, que contienen un único átomo de cobre en el sitio activo (Adman, 1991; Sykes, 1991).

Los sitios de cobre tipo-1 se encuentran en una gran variedad de organismos y, en todos los casos, una envoltura proteica protege al ión metálico y modula su reactividad. Estas apoproteínas presentan una estructura típica, conocida como plegamiento cupredoxina (Adman *et al.*, 1991), muy similar al de los dominios de inmunoglobulina. Las hebras β se encuentran dispuestas en dos hojas β formando un barril β con topología de llave griega (Figura 1 y Figura 2a). Pequeñas y variables cantidades de hélice α están presentes pero nunca contribuyen al núcleo de la proteína. El ión de cobre está situado en uno de los extremos de la proteína, coordinado con una geometría trigonal piramidal por tres ligandos fuertes coplanares: el azufre tiolato de una cisteína y los nitrógenos imidazoles de dos histidinas. En el caso de las plastocianinas (Pcs), rusticianinas (Rcs) y amicianinas (Ams) hay un cuarto ligando en posición axial, el azufre tioéter de una metionina (Figura 2b).

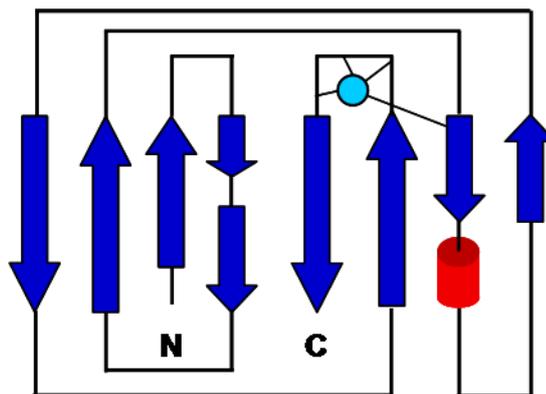


Figura 1. Diagrama topológico de la Pc-Pho (plastocianina de *Phormidium laminosum*). En azul oscuro se representan las hebras β y en rojo la hélice α . Tres de los ligandos del átomo de cobre (azul celeste) se localizan en el lazo que une las dos últimas hebras β .

La disposición de tetraedro distorsionado propia de los centros de cobre tipo-1 no es la preferida por los complejos tetracoordinados de Cu(II), que tiende a ser plana cuadrada (Gray *et al.*, 2000), o de Cu(I), que normalmente presenta una geometría de un tetraedro regular (Gray *et al.*, 2000). La disposición de los aminoácidos que contienen los ligandos es la misma en las apoproteínas que en las holoproteínas (Durley *et al.*, 1993) y no cambia al variar el estado redox del cobre (Inoue *et al.*, 1999), lo cual implica que la energía de reorganización sea pequeña y, por lo tanto, la transferencia electrónica se vea facilitada según la teoría de Marcus (Marcus y Sutin, 1985).

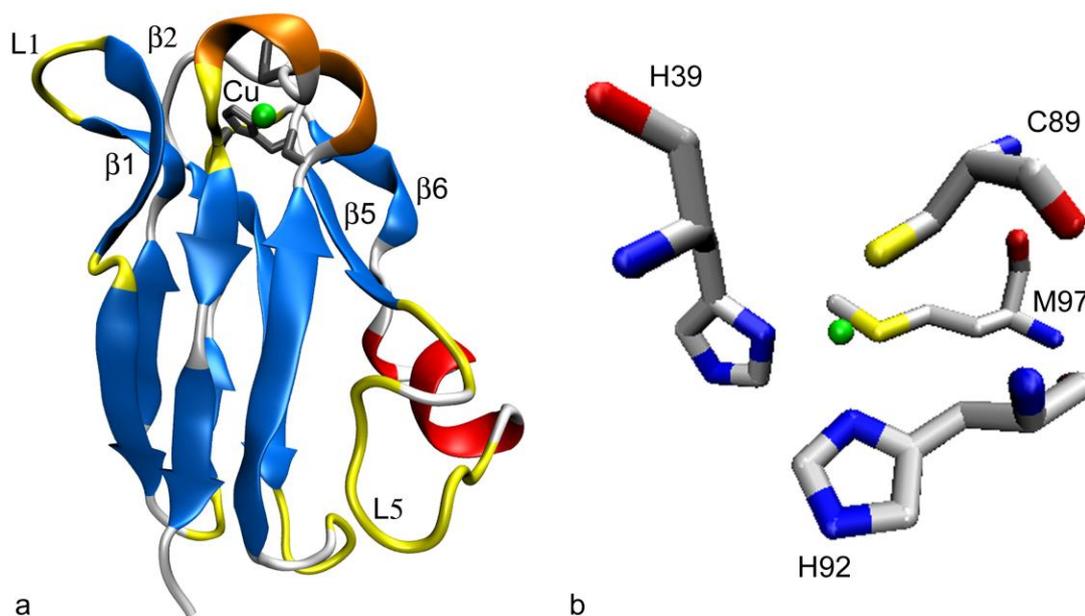


Figura 2. Estructura tridimensional de la Pc-Pho (código PDB: 1BAW, Bond *et al.*, 1999). a) Diagrama de Robertson de la proteína. Los elementos de estructura secundaria, determinados con los criterios de Kabsch y Sander (1983) muestran el siguiente código de color: azul, hebras β ; rojo, hélice α ; naranja, hélice 3_{10} ; amarillo, giros; blanco, otras estructuras no regulares (“ovillos”). El átomo de cobre, en verde, se haya dentro de un bolsillo hidrófobo en la región conocida como cara Norte (parte superior), los ligandos de dicho átomo se muestran en gris. b) Detalle del centro activo de la Pc. Los átomos están coloreados según el esquema: cobre, verde; carbono, gris; nitrógeno, azul; oxígeno, rojo; azufre, amarillo. Para la representación se utilizó el programa VMD (Humphrey *et al.*, 1996).

Sus peculiares propiedades físico-químicas las han hecho objeto de una extensa caracterización. A saber, éstas son:

- Una intensa banda de absorción a 597 nm en la especie oxidada, Cu(II), asociada a una transición de carga de baja energía, que implica una interacción π^* entre el orbital $3p$ del S_γ del ligando cisteína y el orbital $3d_{x^2-y^2}$ del ión de cobre (Solomon y Lowery, 1993).
- Pequeña constante de acoplamiento hiperfino en el espectro de resonancia de espín electrónico (Penfield *et al.*, 1981).
- Altas velocidades de transferencia electrónica así como potenciales de reducción muy positivos si se las compara con complejos inorgánicos de cobre en disolución acuosa (Adman, 1991; Sykes, 1991).

Las BCPs no solamente juegan un papel crucial en sus respectivos organismos, sino que también poseen aplicaciones biotecnológicas, especialmente la azurina (Az), que está siendo utilizada para el diseño de biosensores (Maruccio *et al.*, 2004) así como en el campo de la biomedicina, pues es capaz de penetrar específicamente en células tumorales (Yamada *et al.*, 2005) de mamíferos.

Las plastocianinas son pequeñas BCPs, de unos 10 kDa de peso molecular aproximadamente, que actúan como transportadores electrónicos móviles entre los complejos de membrana citocromo *b₆f* y fotosistema I de la cadena fotosintética de las cianobacterias, algas y plantas (Redinbo *et al.*, 1994; Navarro *et al.*, 1997; Sigfridsson, 1998; Hope, 2000).

Desde la aparición de la primera estructura cristalográfica de una Pc (Colman *et al.*, 1978), han sido muchas las estructuras determinadas bien por difracción de rayos X o mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear. Estas estructuras se caracterizan por la presencia de un parche hidrófobo entorno al átomo de cobre, conocido como cara Norte, a través del cuál se produce la transferencia electrónica. Existe una segunda zona característica, conocida como cara Este, entorno a la única hélice α (Díaz-Quintana *et al.*, 2003). En esta zona se da la mayor densidad de cargas de las Pcs y es responsable de las interacciones electrostáticas que intervienen en la formación de los complejos de las Pcs con sus dianas fisiológicas.

1.4.2 Centro de cobre de la plastocianina

En este trabajo hemos utilizado la espectroscopia de absorción de rayos-X (“*X-ray Absorption Spectroscopy*” o XAS) con el objetivo de estudiar exhaustivamente la estructura del sitio activo de cobre de la Pc-*Pho* y de la Pc-*Syn*. Las características estructurales y espectroscópicas de los centros de cobre de las cupredoxinas se suelen cualificar como inusuales, ya que otros complejos de cobre inorgánicos que se conocían con anterioridad, como por ejemplo el $D_{4h}[CuCl_4]^{2-}$, poseen características muy distintas. Por ello, como se verá a continuación, los datos

espectroscópicos de las cupredoxinas han sido comparados con frecuencia con los datos del complejo $D_{4h} [\text{CuCl}_4]^{2-}$.

En la región de los rayos-X se dan transiciones electrónicas desde los orbitales más interiores del metal y del ligando hacia orbitales de valencia parcialmente ocupados y hacia el continuo. Así por ejemplo en el átomo de cobre, cuando los fotones incidentes se encuentran a una energía de unos 9000 eV, se da una transición, específica de este elemento, de electrones del orbital 1s al continuo. Esta transición corresponde al así llamado umbral-K del átomo de cobre. La zona del espectro de absorción donde se encuentra el umbral-K se denomina XANES (“*X-ray absorption near edge structure*”) o zona próxima al umbral. Esta zona se extiende, aproximadamente, hasta 40 eV por encima del umbral y contiene información sobre la configuración electrónica del sistema y la distribución angular de los ligandos alrededor del átomo absorbente.

El átomo de cobre presenta un pico de absorción a 8979 eV justo anterior al umbral-K, conocido como pre-umbral. Éste corresponde a transiciones desde el orbital 1s al orbital molecular ocupado de mayor energía (“*highest occupied molecular orbital*” u HOMO). El orbital HOMO deriva del orbital $3d_{x^2-y^2}$ (la configuración electrónica del Cu(II) es $[\text{Ar}]3d^9$), pero al ser la transición $1s \rightarrow 3d$ una transición prohibida según el momento dipolar, ésta también tendrá un carácter $1s \rightarrow 4p$, reflejándose así la geometría de tetraedro distorsionado del centro de cobre tipo-1. Este pre-pico es una sonda geométrica del sitio activo, así la intensidad de éste en la Pc de álamo es mucho mayor que en el complejo $D_{4h}[\text{CuCl}_4]^{2-}$, reflejo de la interacción de los orbitales $3d_{x^2-y^2}$ y $3p$ en el cobre azul (Figura 3).

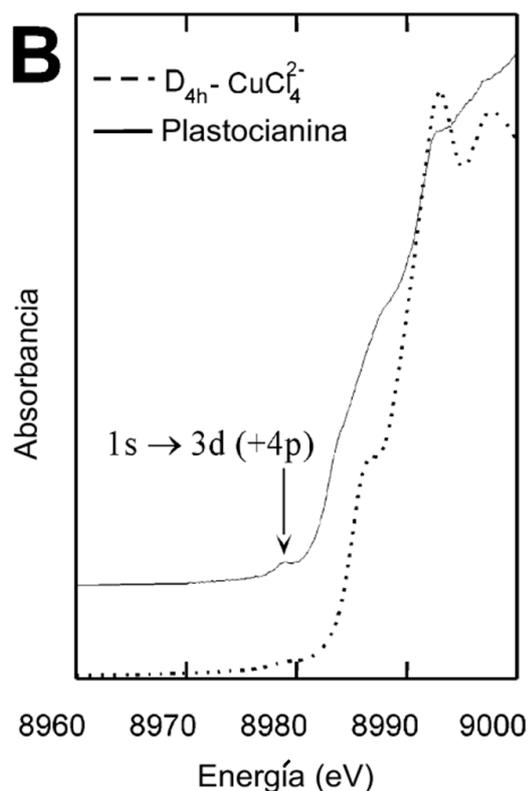


Figura 3. Espectros XAS del complejo $D_{4h}[CuCl_4]^{2-}$ y del sitio de cobre azul de la plastocianina de álamo. Figura adaptada del artículo Solomon *et al.*, 2004, con permiso del autor.

El electrón 1s eyectado del metal ionizado se dispersa por los átomos de los ligandos, conduciendo a fenómenos de interferencia que afectan a su función de onda y, por tanto, a una modulación del coeficiente de extinción por la energía del fotón incidente. Estos fenómenos de interferencia dan lugar a la así conocida estructura fina de absorción de rayos-X extendida (“*extended X-ray absorption fine structure*”, EXAFS), que contiene de esta manera información sobre la disposición de los ligandos en el entorno del metal (Figura 4).

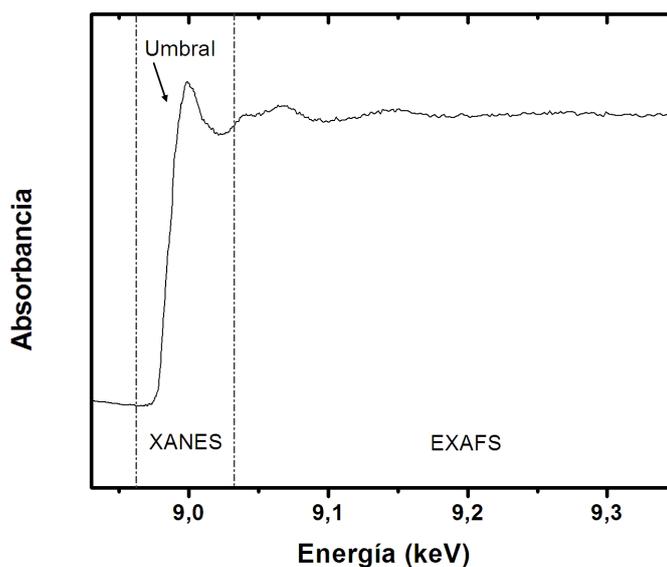


Figura 4. Espectro XAS de la Pc-Pho reducida. Se indican las zonas XANES (“*X-ray absorption near edge structure*”) o zona próxima al umbral y EXAFS (“*extended X-ray absorption fine structure*”) o estructura fina de absorción de rayos-X extendida, así como el umbral-K del átomo de cobre.

Por otro lado, la técnica XAS puede ser utilizada para estudiar el centro de cobre reducido, que es difícil de abordar mediante otras espectroscopias debido a la configuración $3d^{10}$ del Cu(I). Un estudio sistemático del umbral-K de complejos de Cu(I) con distintos números de coordinación ha mostrado que las energías y las intensidades del pico del pre-umbral correspondiente a la transición $1s \rightarrow 4p$ del cobre se puede correlacionar con el número de coordinación y se puede entender en el contexto de una descripción estructural electrónica sencilla.

Los resultados cristalográficos y de EXAFS han proporcionado valiosa información sobre los centros metálicos reducidos de las proteínas azules de cobre. En la Tabla 1 se muestran parámetros geométricos para el centro de cobre oxidado y reducido en la Az y la Pc. Según resultados cristalográficos, los promedios de la longitud de los enlaces Cu-N(His) y Cu-S(Cys) aumentan unos 0,12 y 0,06 Å, respectivamente, al reducirse el centro metálico, mientras que los cambios en los ángulos son insignificantes. Los resultados de EXAFS, aunque proporcionan muy poca información angular, son más precisos en cuanto a longitudes de enlace: los

errores son del orden de 0,02 Å, en contraste con los 0,05-0,08 Å en las estructuras cristalográficas con una resolución de hasta 1,3 Å (Guss *et al.*, 1992). Los resultados de los estudios de EXAFS en la Pc y la Az se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Datos de EXAFS del centro de cobre oxidado y reducido de diferentes plastocianinas y azurinas (Ellis, 1995; Tullius, 1979; Co y Hodgson, 1984; Murphy *et al.*, 1991, DeBeer *et al.*, 2000, Diaz-Moreno *et al.*, 2006).

	Pc <i>Populus</i>		Pc <i>Nostoc</i>		Pc <i>P. vulgaris</i>		Pc <i>S. oleracea</i>		Az <i>P. aeruginosa</i>	
	Cu(II)	Cu(I)	Cu(II)	Cu(I)	Cu(II)	Cu(I)	Cu(II)	Cu(I)	Cu(II)	Cu(I)
pH	6	7	6	6	-	-	5,5	5,5	5,5	5,5
Cu-N _{δ₁(His)}	1,98	1,96	1,96	2,08	1,97	2,05	1,94	1,96	1,95	2,00
Cu-N _{δ₁(His)}	1,98	2,01	1,99	2,11	1,97	2,05	2,02	2,11	1,95	2,00
Cu-S _{γ(Cys)}	2,08	2,19	2,12	2,20	2,11	2,22	2,09	2,15	2,14	2,21
Cu-S _{δ(Met)}	2,76	2,86	-	-	2,66	-	2,90	-	-	-

Estos resultados indican que el proceso de oxidación implica un acortamiento de aproximadamente 0,06 y 0,08 Å de las longitudes de los enlaces Cu-N y Cu-S respectivamente. Los primeros estudios de EXAFS de la Pc dieron evidencia de un enlace largo Cu-S(Met) en las formas oxidadas y reducidas de la Pc de álamo (*Populus*) y en las formas oxidadas de las Pcs de judía verde (*P. vulgaris*) y espinaca (*S. oleracea*) (Ellis, 1995; Tullius, 1979; Co y Hodgson, 1984; Murphy *et al.*, 1991, DeBeer *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 1982). Sin embargo, estos estudios no incluyeron las rutas de dispersión múltiple del anillo de histidina, que ocurriría aproximadamente a la misma distancia. Análisis más recientes de EXAFS de la Az de *P. aeruginosa*, que sí incluyeron las rutas de dispersión múltiple, no cuantificaron la distancia Cu-S(Met), al tratarse de una interacción débil (DeBeer *et al.*, 2000).

Resultados cristalográficos y de EXAFS indican que sólo pequeños cambios en las distancias y ángulos de enlace están asociados al cambio redox del centro metálico. Este limitado cambio estructural ayuda a lograr una baja energía de reorganización en el proceso de transferencia electrónica, como se mencionó

anteriormente. El mayor cambio en la longitud de enlace se da en el caso de Cu-S(Cys), enlace con la frecuencia vibracional más alta (Guckert *et al.*, 1995) y, por lo tanto, de mayor energía.

1.5 Estabilidad de las plastocianinas

Las proteínas de la familia BCP comparten características funcionales, estructurales y espectroscópicas. Así mismo, es lógico que los procesos cinéticos de plegamiento y despliegue, y en conjunto, la estabilidad de dichas proteínas, compartan rasgos comunes. En este apartado describiremos exclusivamente la estabilidad de las Pcs, centrándonos en última instancia en los fenómenos implicados en la estabilidad de la Pc de *Phormidium* (Pc-Pho) y *Synechocystis* (Pc-Syn).

1.5.1 Las Plastocianinas

Merchant y Bogorad (1986) comenzaron los estudios de estabilidad de las Pcs *in vivo*, concretamente en *Chlamydomonas reinhardtii*. Este organismo puede sintetizar o bien la Pc, o bien el citocromo c_6 , según la disponibilidad de cobre en el medio. Observaron que en presencia de cobre la apo-Pc se sintetiza como precursor en los ribosomas citoplasmáticos y se trasloca hasta el lumen tilacoidal, donde se procesa insertándose el átomo de cobre. En ausencia de cobre, la apo-Pc también se sintetiza y trasloca, sin embargo, se degrada rápidamente, posiblemente debido al importante papel del cobre en la estabilidad global de la proteína. No se pudo discriminar si esta degradación era consecuencia de un plegamiento incorrecto de la proteína o de una actividad proteolítica celular más activa sobre la apoproteína.

Posteriormente Gross *et al.* (1992), estudiaron la estabilidad de la Pc de espinaca. Según su estudio, la pérdida del átomo de cobre por parte de la Pc conlleva cambios en su estructura secundaria, al contrario de lo que indicaban algunos estudios cristalográficos (Garrett, 1984). Observaron que en el proceso de despliegue, la pérdida de estructura secundaria es concomitante a la pérdida estructural del centro de cobre azul, dándose una única transición cooperativa. También se observó que la Pc reducida ($T_m = 71$ °C) es más estable que la oxidada

($T_m = 62\text{ °C}$). La explicación propuesta para este comportamiento fue que el Cu(II) en complejos orgánicos prefiere un entorno tetragonal, con 5 o 6 ligandos, en vez de la geometría tetraédrica distorsionada que presenta en la Pc, por lo que la matriz proteica estaría forzando la geometría de coordinación del ión Cu(II). Una segunda explicación se basa en el elevado coste energético de pasar una carga supuestamente solvatada, como sería el caso en el estado desplegado, a un medio de baja constante dieléctrica como el del interior de una proteína plegada.

Koide *et al.* (1993) estudiaron la apo-Pc de judía verde, viendo que su conformación plegada se estabilizaba en medios de alta concentración iónica y con agentes reductores. En estas condiciones, el espectro de dicroísmo circular (“*Circular Dichroism*” o CD) de la apo-Pc era casi idéntico al de la holo-Pc.

Los primeros datos termodinámicos sobre el despliegue de la Pc vinieron dados por Milardi *et al.* (1998). Usaron la Pc de espinaca que, como el resto de las Pcs de plantas, se caracteriza por contener dos sitios ácidos prominentes y una región hidrófoba. Según Milardi *et al.* (1998), la ruta de despliegue implica dos procesos: un efecto endotérmico en el que se pierde la estructura tridimensional de la proteína, y un efecto exotérmico correspondiente a la concomitante agregación de la cadena polipeptídica. El primero de estos efectos es reversible y analizable termodinámicamente mientras que el segundo está controlado por procesos cinéticos, es irreversible y más lento que el anterior. Los resultados obtenidos no mostraban una dependencia con la concentración de proteína y sugirieron que la estabilización del estado nativo de la Pc inducida por el átomo de cobre tiene un carácter más entálpico que entrópico.

La desnaturalización proteica tiene lugar tras la disrupción del centro activo y durante la transición térmica la geometría del sitio de cobre pasa de ser tetraédrica a tetragonal (plano cuadrada) (Milardi *et al.*, 1998). Debido a que los ligandos del cobre se localizan en porciones diferentes de las láminas β , cualquier cambio significativo en la estructura secundaria o terciaria podría alterar las propiedades del centro de cobre.

Sandberg *et al.* (2002) concluyeron que la oxidación del azufre de la cisteína ligando, catalizada por el cobre, es la causa principal de la irreversibilidad en la desnaturalización térmica de la Az. La eliminación del oxígeno disuelto hace que el despliegue sea reversible si los cofactores son iones no reducibles, como por ejemplo el ión Zn(II). En cuanto a la Pc, observaron el despliegue reversible de la Pc reducida en condiciones anaeróbicas y la formación de dímeros disulfuro durante el despliegue térmico en condiciones aeróbicas (Sandberg *et al.*, 2003).

El átomo de cobre en la Pc está más enterrado que en la Az y, debido a la baja similitud de secuencia entre la Pc y la Az, su comportamiento análogo respecto al despliegue térmico sugiere que la reversibilidad térmica de las cupredoxinas en condiciones anaeróbicas está controlada principalmente por factores topológicos del estado nativo. De hecho, éstos últimos son los principales determinantes del paisaje de energía libre de plegamiento (Baker, 2000).

Estudios de RMN (Sandberg *et al.*, 2003) mostraron que, justo antes de que el proceso de despliegue se lleve a cabo, el estado nativo se relaja de forma parecida a las alteraciones pre-transicionales en las que el estado nativo de la proteína pierde cierta compacidad. La diferencia entre la T_m de la transición a 597 nm y la calculada por calorimetría diferencial de barrido podría ser reflejo de esta transición. Diferencias similares también se encontraron en otros estudios (Milardi *et al.*, 1998; La Rosa *et al.*, 1995; Guzzi *et al.*, 1999; La Rosa *et al.*, 2002).

El despliegue térmico de la Pc reducida en la presencia de oxígeno es un proceso complejo comparado con el proceso en condiciones anaeróbicas, ya que aparecen dos picos endotérmicos y varios exotérmicos. Es igualmente complejo el proceso de desnaturalización de la Pc oxidada en condiciones aeróbicas. La Pc oxidada en condiciones anaeróbicas presenta varios picos endotérmicos que podrían deberse a la formación de dímeros, cuya fusión es reversible y ocurre a altas temperaturas (Sandberg *et al.*, 2003).

Guzzi *et al.* (2004) estudiaron la desnaturalización térmica de la Pc silvestre oxidada de álamo en condiciones aeróbicas, obteniendo un máximo endotérmico en

el espectro de calorimetría diferencial de barrido a 62,7 °C seguido de un pico exotérmico a 74,7 °C, mostrando una ruta de despliegue compleja no compatible con el modelo de dos estados. Un resultado parecido se había visto ya en la Pc de espinaca (Sandberg *et al.*, 2003; Milardi *et al.*, 1998). Dedujeron que la diferencia de estabilidad entre la Pc de álamo y la de espinaca se debía a cambios en la secuencia pero no en la topología de la proteína. La temperatura de transición dada por la densidad óptica a 596 nm se dio a 58,0 °C, constatándose así la modificación del centro de cobre precedente al despliegue global de la proteína.

Por último, Shosheva *et al.* (2005) estudiaron la Pc de *Arabidopsis*, en la cual se hallan dos genes codificantes de Pc, el gen *PETA1* y el gen *PETA2*. *Arabidopsis* requiere ambas isoformas para sobrevivir, pero se puede desarrollar parcialmente con sólo una de ellas. En sus estudios de despliegue térmico observaron dos picos endotérmicos más otro exotérmico. El menor de los picos endotérmicos se da a una temperatura más alta que el primero. Al igual que en estudios previos (Guzzi *et al.*, 2004; Sandberg *et al.*, 2003; Milardi *et al.*, 1998), el segundo pico fue explicado como resultado de la fusión de dímeros unidos por puentes disulfuro y el pico exotérmico se atribuyó a la agregación proteica posterior a la desnaturalización.

Balme *et al.* (2001), compararon la termoestabilidad de Pcs procedentes de cianobacterias, que hasta entonces no habían sido estudiadas. A un valor de pH de 7,5, las T_m s de las Pcs oxidadas fueron: 51,2 °C para la Pc de *Pseudanabaena*, 57,7 para la Pc-Syn, 64,1 °C para *Anabaena* y para la Pc-Pho, proveniente de una cianobacteria termófila, 65,6 °C.

1.5.2 La plastocianina de *Phormidium laminosum* y su comparativa con la plastocianina de *Synechocystis* sp. PCC 6803

Feio *et al.* (2004) realizaron un estudio sobre la estabilidad de la Pc-Pho. Mediante espectroscopia de fluorescencia siguieron, principalmente, el cambio de emisión del único residuo de triptófano de la proteína. Dicha emisión disminuye a lo largo del proceso de despliegue. A pH 5,5, observaron una T_m para la especie

reducida de 76,4 °C y de 83,1°C para la oxidada. A diferencia de lo observado en otros estudios (Sandberg *et al.*, 2003), la proteína reducida en condiciones anaeróbicas presentó un despliegue irreversible. Los estudios de NMR y EPR corroboraron la irreversibilidad del despliegue en condiciones aeróbicas y anaeróbicas así como las medidas de T_m realizadas por fluorescencia. La pérdida de la coordinación nativa del átomo de cobre resultó ser simultánea a la de estructura secundaria y terciaria.

Realizaron un estudio exhaustivo de la dependencia de la estabilidad térmica con el pH. Los resultados de T_m obtenidos fueron semejantes en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, siendo la Pc-*Pho* oxidada siempre más estable que la reducida. El máximo de estabilidad se dio a un pH de aproximadamente 5,5, un valor esperable para el lumen tilacoidal de las cianobacterias (Kramer *et al.*, 1999). Este hallazgo sugiere que las propiedades funcionales y la estabilidad de la Pc se hallan correlacionadas. Posteriormente, realizaron estudios cinéticos por fluorescencia. Los datos obtenidos volvían a indicar que el pH de estabilidad cinética máxima se daba entorno a valores de 5,5 en el caso de la especie oxidada. La especie reducida era tan inestable que se desplegaba dentro del tiempo de vida muerto de la técnica, apoyando la mayor estabilidad descrita para la especie oxidada.

Como se ha señalado anteriormente, la especie oxidada mostraba más resistencia a la temperatura que la reducida, al contrario de lo que sucedía en la Pc de espinaca (Sandberg *et al.*, 2003). Feio *et al.* sugirieron que esta diferencia debía responder a la distinta naturaleza de ambas Pcs, siendo la de espinaca más ácida, y observándose diferencias estructurales en la hélice α y la quinta hebra β .

En el 2006, Feio *et al.* continuaron el estudio de la termoestabilidad de la Pc-*Pho*, esta vez comparándola con una Pc proveniente de una cianobacteria mesófila, *Synechocystis*. A pH 5,5, los experimentos de desnaturalización seguidos por espectroscopia de fluorescencia rindieron unos valores de T_m de 66,1 y 71,9°C para la especie oxidada y reducida de la Pc-*Syn* respectivamente, valores inferiores a los correspondientes a la Pc-*Pho*. Cabe resaltar que, presentando ambas proteínas una

alta identidad de secuencia (63%) y un centro de cobre tipo-1 idéntico, la especie oxidada es menos estable que la reducida en *Synechocystis* y lo contrario sucede en *Phormidium*. Por otro lado, con respecto a la irreversibilidad de la desnaturalización, en la Pc-Syn se da un despliegue irreversible en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, al igual que en la Pc-Pho.

Ambas Pcs muestran un máximo de estabilidad a un valor de pH entorno a 5,5 (Feio *et al.*, 2006), valor de pH asumido para el lumen tilacoidal (Kramer *et al.*, 1999). Por otro lado, la cinética del despliegue observada en la Pc-Syn es distinta a la de la Pc-Pho. La forma reducida muestra una dependencia menos pronunciada con el pH que la forma oxidada de la Pc-Pho: la estabilidad cinética decae de 4,5 a 5,5, y a partir de este último valor se mantiene casi estable. Recordemos que la forma reducida de la Pc-Pho no se pudo medir por ser más rápida de lo que la resolución temporal del equipo experimental permitía. Por otro lado, la especie oxidada de la Pc-Syn muestra una mayor dependencia con el pH, dándose justamente el mínimo de estabilidad cinética a un pH de 5-5,5.

Estudios previos del despliegue de otras cupredoxinas como la rusticianina (Rc) o la Az también mostraron que la especie oxidada es más estable que la reducida (Alcaraz *et al.*, 2004, Leckner *et al.*, 1997). Este comportamiento se puede interpretar como consecuencia de distintas afinidades de la Pc por el átomo de cobre (Alcaraz *et al.*, 2004) o diferentes conformaciones del centro de cobre de la Pc desplegada según su estado redox (Leckner *et al.*, 1997).

Una especie oxidada desplegada más inestable que la especie reducida desplegada provocaría que el despliegue de la especie nativa oxidada fuese más costoso energéticamente (Leckner *et al.*, 1997). Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que pequeñas reorganizaciones estructurales en los lazos de la cara Norte de la Pc, dependientes del estado redox del cobre (Bertini *et al.*, 2001), puedan afectar a la estabilidad de la proteína. En la Tabla 2 se muestra un resumen de los valores de T_m de distintas Pcs, Am y Az, según su estado redox, en los que se

puede apreciar que no existe una relación clara entre el estado redox y la termoestabilidad de las BCPs.

Tabla 2. Valores de T_m (°C) de las plastocianinas de *Phormidium* (*Pho*), *Synechocystis* (*Syn*), *espinaca* (*Spinacia oleracea*, *Spi*) y álamo (*Populus sp.*, *Pop*), de la amicianina de *Paraccocus denitrificans* (*Am*) y de la azurina de *Pseudomonas aeruginosa* (*Az*) (Feio *et al.*, 2004; Feio *et al.*, 2006; Sandberg *et al.*, 2003; Guzzi *et al.*, 2004, Taneva *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2005; Leckner *et al.*, 1997).

	<i>Pho</i>	<i>Syn</i>	<i>Spi</i>	<i>Pop</i>	<i>Am</i>	<i>Az</i>
Cu(I)	76,4	71,9	71	66,7	62	85,4
Cu(II)	83,1	66,1	67,8	62,7	75,5	86,3

Feio *et al.* (2006) estudiaron la estabilidad de las respectivas apo-Pcs, siendo la de *Phormidium* la más resistente. En un intento de discernir los factores que gobiernan la estabilidad de dichas apoproteínas, determinaron la T_m a distintos valores de fuerza iónica. Observaron que una alta fuerza iónica desestabilizaba a ambas proteínas, siendo este efecto más acusado en la Pc-*Syn*, por lo que dedujeron que las interacciones electrostáticas jugaban un papel más importante en la Pc-*Syn* mientras que en la Pc-*Pho* prevalecerían las hidrófobas.

Por último, realizaron unos estudios de dinámica molecular (“*molecular dynamics*” o MD) en los que se observó que si bien la Pc-*Syn* comenzaba a desestabilizarse por las hebras $\beta 1$ y $\beta 2$, la Pc-*Pho* lo hacía por la cara Este, es decir, donde se encuentran situadas la hélice α y las hebras $\beta 5$ y $\beta 6$.

1.6 Objetivos

Como hemos visto a lo largo de esta introducción, todavía resulta difícil entender como las interacciones intra o intermoleculares afectan a la estabilidad de una proteína. En el caso concreto de las metaloproteínas, si bien es sabido que los cofactores juegan un papel importante en la estabilización de las mismas, la forma en la que este proceso tiene lugar no se ha llegado a conocer con detalle, especialmente la dependencia que la estabilidad de estas proteínas muestra con respecto al estado redox del sitio metálico. Así pues, los objetivos del trabajo presentado en esta tesis son:

- Determinar las interacciones intramoleculares específicas de la plastocianina de *Phormidium laminosum* que le confieren mayor termoestabilidad respecto a la plastocianina de *Synechocystis* sp. 6803.
- Investigar la modulación que ejerce el estado redox del centro metálico (Cu(I) o Cu(II)) sobre la estabilidad global de la proteína.

1.7 Publicaciones

La mayor parte del trabajo expuesto en esta tesis doctoral ha sido publicado en los siguientes artículos:

Muñoz-López, F.J.; Raugei, S.; De la Rosa, M.A.; Díaz-Quintana, A. y Carloni, P. (2010) Changes in non-core regions stabilise plastocyanin from the thermophilic cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *J Biol Inorg Chem* 15, 329-338.

Muñoz-López, F.J.; Frutos Beltrán, E.; Díaz-Moreno, S.; Díaz-Moreno, I.; Subías, G.; De la Rosa, M.A. y Díaz-Quintana, A. (2010) Modulation of copper site properties by remote residues determines the stability of plastocyanins. *FEBS Lett* 584, 2346-2350.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Dinámica Molecular

2.1.1 Parametrización del centro de cobre

Las cargas de los átomos del sitio activo se calcularon según el protocolo descrito por Comba y Remenyi (2002), con la salvedad del modelo usado. Comba usó un modelo que incluía el átomo de cobre y las cadenas laterales de los residuos que ligan al mismo. Esto hacía que las cargas calculadas por Comba para los átomos de las cadenas laterales de cada residuo ligando sumadas con las cargas del campo de fuerza de Amber desarrollado por Wang *et al.* (2000) para los átomos del esqueleto, rindiese un número decimal y no entero. Además, con el objeto de obtener una aproximación más realista del centro de cobre insertado en la proteína, en nuestros cálculos, cada residuo se consideró ligado a un grupo amino y acetilo. El grupo amino contenía las coordenadas del nitrógeno amino del correspondiente aminoácido posterior en la secuencia proteica e igualmente, al grupo acetilo se le asignaron las coordenadas del carbono metil, carbono carbonil y oxígeno carbonil del residuo precedente.

Todas las coordenadas atómicas de la Pc-Pho y la Pc-Syn se obtuvieron de los respectivos archivos depositados en la base de datos de proteínas PDB (“*protein data bank*”, Bernstein *et al.*, 1977) con entrada 1BAW y 1J5C (Bond *et al.*, 1999; Bertini *et al.*, 2001), a excepción de los hidrógenos de los grupos amino y acetilo y los hidrógenos provenientes del fichero de estructura de difracción de rayos X de la proteína termofílica. Estos se añadieron con el módulo xleap del paquete de programas AMBER9 (Case *et al.*, 2006). Posteriormente las posiciones de los hidrógenos se relajaron por el método semiempírico AM1 (Dewar *et al.*, 1985) implementado en el programa Gaussian03 (Frisch *et al.*, 2004).

2.1.2 Simulaciones de dinámica molecular

Como se ha indicado, las proteínas estudiadas poseen una estructura tridimensional conocida y disponible en la base de datos PDB (Bernstein *et al.*,

1977), los códigos de entrada son 1BAW para la Pc-Pho y 1J5C y 1PCS para la Pc-Syn oxidada. El paquete de simulación molecular AMBER9 (Case *et al.*, 2006) se utilizó en la minimización y equilibrado del sistema y GROMACS 3.3.1 (Berendsen *et al.*, 1995, Lindahl *et al.*, 2001) se usó en el equilibrado final, fase de producción y análisis de datos. El campo de fuerza empleado fue AMBER99 (Wang *et al.*, 2000) para los residuos estándar y para los residuos ligandos los parámetros aportados por Comba (2002). Para estos últimos las cargas atómicas se recalcularon en este trabajo según se ha descrito previamente.

Las proteínas se solvataron con moléculas de agua TIP3P (Jorgensen *et al.*, 1983) en una caja cúbica que guarda una distancia (cutoff) mínima de 10 Å con respecto a la proteína. Esta caja contenía 4599 moléculas de agua en la simulación de la Pc-Pho y 4935 en la de la Pc-Syn. Se añadieron los iones de sodio necesarios para neutralizar las cargas del sistema. Las cadenas laterales de los residuos proteicos se minimizaron con 2000 pasos del método máxima pendiente (“*steepest descent*”), seguidos de una minimización por el método de gradientes conjugados (“*conjugate gradient*”) que se prolongó hasta que se alcanzó el criterio de convergencia de la misma (0,04 kJ mol⁻¹). El mismo procedimiento se aplicó con las moléculas de agua aunque, en este caso, el número de pasos de máxima pendiente fue de 4000. El criterio de convergencia se satisfacía cuando el gradiente energético era menor de 0,04 kJ mol⁻¹. El volumen se mantuvo constante durante los primeros 50 ps; posteriormente fue la presión la que se mantuvo constante a la vez que se aumentó la temperatura del sistema durante 300 ps, alcanzándose así una densidad adecuada. Las moléculas de disolvente se equilibraron en una simulación de dinámica molecular de 50 ps a 298 K y volumen constante, seguida de una simulación en la que se mantuvo la presión constante, permitiendo al sistema calentarse durante 300 ps hasta que se alcanzase una densidad constante. Posteriormente se calentó el sistema entero, en el conjunto NVE (número de moléculas, volumen y energía constantes) incrementando la temperatura de 0 a 300 K en 50 ps, usando el termostato de Langevin (Langevin, 1908; Adelman y Doll, 1976) con una

frecuencia de colisión de 1 ps^{-1} . Por último, el sistema en su conjunto se calentó gradualmente, a presión constante (conjunto NTP: número de moléculas, temperatura y presión constantes) usando el termostato de Berendsen (Berendsen *et al.*, 1984), hasta que la densidad, de nuevo, alcanzase un valor de equilibrio.

Usando el programa amb2gro, las coordenadas del último fotograma de la dinámica, así como la topología, se transfirieron a archivos compatibles con GROMACS 3.3.1 (Berendsen *et al.*, 1995, Lindahl *et al.*, 2001), programa con el que se ejecutaron las dinámicas de producción. Estas se lanzaron a las siguientes temperaturas: temperatura ambiente (298 K), temperatura de interrupción del proceso *in vivo* de transferencia de electrones en el que la plastocianina actúa (323 y 333 K para la Pc-Syn y Pc-Pho respectivamente según Durán *et al.*, 2005), temperatura de fusión de la proteína *in vitro* (338 y 354 K para la Pc-Syn y Pc-Pho respectivamente) y por último, una temperatura suficientemente alta (495 K) para desencadenar el inicio del despliegue de la proteína. Con el fin de poder comparar los resultados de las dinámicas de ambas proteínas a la misma temperatura se corrió una dinámica más de la Pc-Pho a 338 K y otra de la Pc-Syn a 354 K. Las velocidades iniciales se generaron según una distribución maxwelliana para cada temperatura. Las simulaciones poseen una duración mínima de 11 ns y se prolongaron en los casos donde no se había alcanzado la convergencia. El intervalo de tiempo de integración fue de 1,5 fs, un tiempo menor del habitual (2 fs), debido a las altas temperaturas de algunas simulaciones. Las distancias de los enlaces en los que un átomo cualquiera de hidrógeno estuviera implicado se mantuvieron constantes. La lista de átomos vecinos se actualizó cada 100 pasos de simulación. Las interacciones electrostáticas se trataron con el método Fast Particle Mesh Ewald (Darden *et al.*, 1993; Essmann *et al.*, 1995), el límite de evaluación (*cutoff*) seleccionado fue de 1,4 nm. El sistema se acopló a un termostato de Berendsen (Berendsen *et al.*, 1984), usando una constante de tiempo de 0,5 ps. Para elevar la temperatura del sistema de trabajo desde la temperatura inicial de partida (temperatura ambiente) a la temperatura deseada se utilizó un escalado sencillo a una velocidad de $0,5 \text{ K ps}^{-1}$. El

mismo tipo de gradiente de temperatura se empleó para calentar ambas proteínas desde 298 a 498 K en 10 ns.

Como controles, se realizaron tres simulaciones más a temperatura ambiente de la proteína mesofílica. El objeto de estas simulaciones fue ver si utilizando distintas estructuras iniciales y distintos protocolos de equilibrado el resultado obtenido era semejante. Para ello se utilizó la estructura obtenida por difracción de rayos X del triple mutante de la Pc-Syn (Ala44Asp/Asp49Pro/Ala65Leu) (código PDB: 1PCS. Romero *et al.*, 1998). Las mutaciones se revertieron obteniendo la proteína silvestre, para lo que se utilizó el módulo xleap de AMBER. Se realizó una simulación con el mismo protocolo de equilibrado que el descrito anteriormente pero con las nuevas coordenadas atómicas obtenidas del archivo PDB 1PCS. Una segunda simulación partió de estas mismas coordenadas pero la simulación del solvente a volumen y presión constantes se llevó a cabo a 300 K. Por último, en el tercer caso, se procedió como en la segunda simulación y además, el movimiento de los átomos del esqueleto proteico se restringió con una constante de fuerza de 208,4 kJ mol⁻¹ mientras se calentó el sistema a 300 K, después esta constante se redujo a 20,8 kJ mol⁻¹ durante 75 ps, a 4,2 kJ mol⁻¹ posteriormente, durante 75 ps y por último la constante se redujo a 0 kJ mol⁻¹.

Las trayectorias fueron analizadas con los programas VMD (Humphrey *et al.*, 1996) y GROMACS 3.3.1 (Berendsen *et al.*, 1995, Lindahl *et al.*, 2001).

La convergencia del muestreo conformacional se evaluó mediante el análisis de componentes principales, usando los módulos g_covar y g_aneig del paquete GROMACS 3.3.1 (Berendsen *et al.*, 1995, Lindahl *et al.*, 2001). Los movimientos de las proteínas se caracterizaron por medio de los vectores propios de la matriz de covarianza $c_{ij,\alpha\beta} = \langle \delta x_{i\alpha}; \delta x_{j\beta} \rangle$, donde δx representa el vector de desplazamiento instantáneo (una vez eliminados los movimientos de cuerpo rígido) del átomo $C\alpha_i$ con respecto a la coordenada promedio de este átomo durante la trayectoria, α y β son las componentes cartesianas de dichos vectores y los paréntesis representan el

promedio en el tiempo (Arcangeli *et al.*, 2001; deGroot *et al.*, 1996). Una estimación del grado de convergencia del muestreo se obtuvo a partir del solapamiento entre los vectores propios de distintos intervalos de tiempo (Arcangeli *et al.*, 2001):

$$\text{Solapamiento}(v, w) = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (v_i \cdot w_j)^2$$

donde v y w son los conjuntos de vectores ortonormales de los distintos intervalos de tiempo mencionados anteriormente. Dado que cada conjunto se compone de vectores ortonormales, el solapamiento es 1 cuando los dos conjuntos son idénticos y 0 cuando los vectores v son ortonormales a los vectores w .

Los órdenes de contacto se refieren a la separación promedio, relativa a la secuencia, de los contactos nativos (Barrat *et al.*, 2004). Su determinación y análisis topológico se realizaron utilizando la consola Tk y un módulo (Toponet) escrito por el Dr. Díaz-Quintana, que corrige la numeración de residuos en el fichero de coordenadas. Se tomaron las coordenadas de los C_α y un radio de corte de 6 Å. Los análisis topológicos y estadísticos de la red de contactos se llevaron a cabo usando un radio de corte de 4,5 Å de distancia entre los átomos pesados, y un radio de corte de tres residuos de distancia, eliminando así los contactos triviales de corta distancia (Robinson-Rechavi *et al.*, 2006). El grado de un nodo o conectividad, se define como:

$$k_i = \sum_{j=1}^n a_{ij}$$

donde a_{ij} son los elementos de la matriz adjunta, la cual adquiere el valor de 1, si una arista conecta los nodos i y j , o de 0 si dicha conexión no tiene lugar. Para calcular el promedio de los coeficientes de agrupamiento de los nodos, cada unión entre nodos se ponderó según el número de pares de átomos pesados en contacto de los dos residuos implicados, según la siguiente ecuación (Plaxco *et al.*, 1998):

$$C_i^w = \frac{1}{(k_i - 1) \sum_{j=1}^n a_{ij} \cdot w_{ij}} \cdot \sum_{j,h} a_{ij} a_{ih} a_{jh} \left(\frac{w_{ij} + w_{ih}}{2} \right)$$

donde w_{ij} es el peso relativo de una unión cualquiera.

El número de puentes salinos se calculó con el módulo `g_mindist` del paquete GROMACS 3.3.1 (Berendsen *et al.*, 1995, Lindahl *et al.*, 2001). Se promediaron a lo largo de la trayectoria las distancias entre los pares de átomos de oxígeno carboxílico de los residuos aspartato y glutamato con los átomos de nitrógeno amina de las lisinas o guanidinio de las argininas, usando un radio de restricción de 4 Å de distancia (Vogt *et al.*, 1997).

2.2 Análisis de la termoestabilidad de la Pc-Pho mediante mutagénesis dirigida

2.2.1 Organismos y condiciones de cultivo

En la realización de esta tesis doctoral sólo se utilizó un tipo de organismo, de la especie *Escherichia coli* (en adelante, *E. coli*). Las estirpes empleadas se describen en la Tabla 3. Para todos los trabajos de manipulación de DNA se empleó la estirpe de *E. coli* DH5 α (Hanahan, 1983; Bethesda Research Laboratories).

Tabla 3. Genotipo de las estirpes de *E. coli* empleadas en este trabajo.

NOMBRE	GENOTIPO
DH5 α	F ⁻ , ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rK</i> ⁻ <i>rK</i> ⁺), <i>pboA</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>
JM109	F [<i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacIϕ</i> , <i>LacZ</i> Δ M15]/ <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rB</i> ⁻ <i>mB</i> ⁺), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>)
BL21 (DE3)	F ⁺ ::Tn10 <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ , <i>lacIϕ</i> , Δ (<i>lacZ</i>)M15/ <i>ompT(lon)</i> , <i>hsdSB</i> (<i>rB</i> ⁻ <i>mB</i> ⁻), una <i>E. coli</i> B) con DE3 (profago de λ con la polimerasa de ARN de λ fago)
XL1-Blue	F ⁺ ::Tn10 <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ , <i>lacIϕ</i> , Δ (<i>lacZ</i>)M15/ <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , (Nal ^r), <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> , (<i>rK</i> ⁻ <i>mK</i> ⁺), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i>
MC1061	F ⁻ , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7696, <i>galE15</i> , <i>galK16</i> , Δ (<i>lac</i>)X74, <i>rpsL</i> , (Str ^r) <i>hsdR2</i> (<i>rK</i> ⁻ <i>mK</i> ⁺), <i>mcrA</i> , <i>mcrB1</i>
GM119	F ⁻ , <i>fbuA2dam-3</i> , <i>dcm-6</i> , <i>metB1</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>lacY1</i> , <i>tsx78</i> , <i>supE44</i> (<i>thi1 tomA31 mtl1</i>)
K12	Silvestre
XL1-Blue	<i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> (<i>nal^R</i>), <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , <i>ghnV44</i> F ⁺ [<i>::Tn10 proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ , <i>lacIϕ</i> , Δ (<i>lacZ</i>)M15] <i>hsdR17</i> (<i>rK</i> ⁻ <i>mK</i> ⁺)
HB101	F ⁻ , <i>mcrB</i> , <i>mrr</i> , <i>hsdS20</i> (<i>rB</i> ⁻ <i>mB</i> ⁻), <i>recA13</i> , <i>leuB6</i> , <i>ara-14</i> , <i>proA2</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>rpsL20</i> (Sm ^R) <i>ghnV44</i> λ ⁻
CC118 (λ pir)	D(<i>ara-leu</i>), <i>araD</i> , D <i>lacX74</i> , <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>pboA20</i> , <i>thi1</i> , <i>rpsE</i> , <i>rpoB</i> , <i>argE</i> (AM), <i>recA1</i> , lisogenizada con un fago <i>pir</i>

El medio de crecimiento habitual para los cultivos líquidos o sólidos de *E. coli* fue el de Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989). La esterilización de los medios y del diverso material empleado se llevó a cabo en autoclave, a 1 atmósfera de sobrepresión y 121 °C durante 20 minutos. Distintos suplementos, esterilizados por filtración, se añadieron al medio previamente autoclavado en función de los objetivos. A continuación se indican las concentraciones finales de dichos suplementos:

Ampicilina (100 µg L⁻¹) para la selección de plásmidos con resistencia al antibiótico.

Sulfato de Cobre (100 µM).

5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-Gal) (0,2 µM) e isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) (16 µM) para la selección, en medios con agar, de colonias que tengan el gen *lacZ* inactivado por un inserto.

Los cultivos en medio sólido se realizaron en cajas de Petri incubadas a 37 °C. Los cultivos líquidos rutinarios se realizaron en tubos de ensayo y en matraces Erlenmeyer de 250 mL o 5 L, según uso.

2.2.2 Procesamiento de DNA

El plásmido pGEMT-easy conteniendo el gen *petE* que codifica la P_c-*Pho* fue amablemente cedido por la doctora B. Schlarlb-Ridley (Cambridge, Reino Unido). Sobre este plásmido se llevó a cabo una restricción enzimática con la enzima *EcoRI*. El corte endonucleolítico se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante de la enzima de restricción empleada (Roche).

Para la separación de los fragmentos de DNA obtenidos tras la restricción, se emplearon geles de agarosa (Seakem LE, FMC) al 1% (p/v) preparados en tampón TBE (Tris-borato 90 mM, pH 8,0, EDTA 2 mM) diluido al 50% y con bromuro de etidio a una concentración de 1 µg mL⁻¹. Las electroforesis se realizaron en aparatos “DNA Sub Cell” (Bio-Rad). Cada muestra se aplicó al gel mezclada con 1/10 volúmenes de tampón de carga.

Como patrón para estimar el tamaño de los fragmentos de DNA sometidos a electroforesis se empleó la mezcla comercial XIII (Roche). Tras la electroforesis, el DNA se visualizó iluminándolo con luz ultravioleta de 312 nm empleando una lámpara Vilber Lourmat. Los geles se fotografiaron en un equipo UVP Imagestore GDS-5000.

Para extraer el DNA de los geles de agarosa también se utilizó el sistema comercial “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (Amersham), siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante.

La desfosforilación del plásmido pBS II SK(+) cortado por la endonucleasa *EcoRI* (Roche) se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante.

La mezcla de reacción para la ligación del producto de PCR contenía, en un volumen final de 10 μL , el gen *petE* obtenido a partir del gel de agarosa y el plásmido vector desfosforilado en una proporción 3:1, 3 unidades de ligasa de DNA del bacteriófago T4 (Promega) y el tampón de ligación rápida (Promega). Dicha mezcla se incubó durante 1 hora a 4 °C.

La preparación de células competentes de *E. coli* la realizó el Servicio Técnico de Cultivos del Centro de Investigaciones Científicas “Isla de la Cartuja” siguiendo el procedimiento descrito por Hanahan (1985). A dichas células se les insertó el gen *petE* en el plásmido pBS II SK(+) mediante transformación por choque térmico o por electroporación.

Para favorecer el crecimiento de bacterias conteniendo la inserción del gen *petE* en el plásmido pBS II SK(+) bajo el control del promotor Lac, el medio LB se suplementó con un 2% (p/v) de glucosa. A continuación, las células se inocularon bien en medio LB líquido para obtener cultivos bacterianos o en placas de medio LB sólido, suplementadas con ampicilina (100 $\mu\text{g L}^{-1}$), para la selección de transformantes. Las placas se recogieron aproximadamente a las 16 horas de incubación. Para seleccionar los clones portadores de vectores con el recombinante, el medio se suplementó con IPTG y X-Gal (Apartado 2.2.1). Así, debido a la interrupción del gen *lacZ* por inserción del gen recombinante, las

colonias con plásmidos recombinantes, sin actividad β -galactosidasa, mostraron color blanco frente al color azul de los clones carentes de inserto.

Para el aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala se emplearon métodos basados en la lisis alcalina. Utilizando los sistemas comerciales “High Pure Plasmid Isolation Kit” (Roche) o “Fastplasmid Mini Kit” (Eppendorf) y siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

La secuenciación del gen *petE* clonado, tanto silvestre como mutado, se realizó en el servicio de secuenciación automática de la empresa Sistemas Genómicos S. L. (Valencia).

Para la obtención de los mutantes de plastocianina se realizó la mutagénesis dirigida del gen *petE* de *Phormidium laminosum* utilizando el “QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit” (Stratagen Inc, La Jolla, CA).

Para este proceso se empleó como molde el plásmido pBS II SK(+) con el gen *petE* insertado, denominado a partir de ahora en este trabajo, pBS-WT, purificado a partir de extracciones de DNA plasmídico de cultivos de *E. coli*. Se realizó una reacción de PCR con dos cebadores complementarios, cuyas secuencias incluían la mutación deseada, para amplificar el plásmido pBS-WT. Para dicha reacción se utilizó la polimerasa termoestable de *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*), que posee actividad correctora 3'-5'.

Tras la PCR, la mezcla de reacción contenía una población de DNA molde metilado y otra de DNA producto no metilado, tanto circular como abierto por cortes de cadena simple. Para eliminar el DNA molde se añadió a la mezcla de reacción la endonucleasa *DpnI*, que genera cortes endonucleolíticos en las secuencias GATC metiladas. Posteriormente, se transformaron células de *E. coli* DH5 α con el producto de la digestión, donde se generaron plásmidos completos con la mutación deseada.

Los cebadores se diseñaron con la ayuda del programa de la casa comercial Sigma.

2.2.3 Pruebas de expresión y producción de plastocianinas

2.2.3.1 Pruebas de expresión

Se realizaron pruebas de expresión de la *Pc-Pho* para determinar las condiciones óptimas de producción. Para ello se probaron distintas estirpes de *E. coli* electroporables (GM119, K12, BL21 (DE3)) y transformables por golpe térmico (DH5 α , MC1061, XL1-Blue, JM109, HB101, CC118 λ pir) (Apartado 2.2.1). También se realizó una prueba de expresión por inducción con IPTG con la estirpe BL21 (DE3).

Las células transformadas o electroporadas con el plásmido pBS-WT se inocularon en matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad conteniendo 50 mL de medio líquido LB estéril enriquecido con CuSO₄ (100 μ M) y ampicilina (100 μ g L⁻¹). En el caso de la estirpe BL21 (DE3), se añadió IPTG en concentración 1 mM después de que hubieran pasado 2, 4, y 6 horas desde que el cultivo alcanzase la densidad óptica de 0,6 a 600 nm.

Se seleccionaron las 2 estirpes con mejores rendimientos de producción de Pc. Se volvieron a inocular en distintas condiciones de oxigenación, variando el volumen de medio LB líquido en los matraces y la velocidad de incubación, así se probaron las siguientes condiciones: 50 mL de medio con una agitación orbital continua de 200 rpm, y 100 mL de medio a una agitación de 150 rpm

Se utilizó la estirpe que rindió mayor producción para hacer pruebas con 50, 100, 125 y 175 ml de medio con una agitación orbital continua de 150 y 200 rpm.

Las condiciones de producción óptimas para la *Pc-Pho* también se consideraron como idóneas para la producción de las proteínas mutantes.

2.2.3.2 Producción

Para producir las proteínas, las células de la estirpe K12 de *E. coli* se electroporaron con el plásmido de expresión pBS II SK(+) en el que se encontraba insertado el gen *petE* (plásmido pBS-WT) silvestre o modificado mediante

mutagénesis. Estas células se inocularon en proporción 1:1000 en matraces Erlenmeyer de 5 litros conteniendo 3 litros de medio líquido LB suplementado con CuSO_4 y ampicilina. Los cultivos se incubaron bajo agitación continua a 100 rpm durante 24 horas a 35 °C. Las células se recogieron por centrifugación a $12000\times g$ durante 6 minutos, en una centrífuga preparativa refrigerada Avanti J-25 (Beckman Coulter).

2.2.4 Purificación de la plastocianina y sus mutantes

Tras centrifugar los cultivos celulares, se desechó el líquido sobrenadante, y el extracto celular sedimentado se resuspendió en tampón frío tris/HCl 10mM, pH 8, enriquecido con inhibidores de proteasas: benzamidina, ácido -6-amino-hexanoico y fluoruro de fenil-metil-sulfonilo. La fracción periplásmica se extrajo mediante un ciclo de congelación en N_2 líquido y descongelación, seguido de otro ciclo de congelación a -20 °C y descongelación, con el objeto de reducir la cantidad de DNA en el extracto proteico. La separación del extracto periplásmico de los demás restos celulares se hizo centrifugando la suspensión celular a $37000\times g$ durante 15 minutos y desechando el sedimento formado. Se prosiguió con 2 ciclos de diálisis de 4 horas cada uno, con tampón tris/HCl 5 mM, pH 8, en agitación continua, seguidos de una tercera diálisis durante la noche en las mismas condiciones. El extracto dializado fue centrifugado a $37000\times g$ durante 20 minutos, para eliminar los precipitados formados durante la diálisis, y posteriormente se aplicó a una columna de intercambio aniónico de dietilaminoetil (DEAE) celulosa (Sigma) pre-equilibrada con tampón tris/HCl 10 mM a pH 8. La proteína se eluyó con el uso de un gradiente de 10 a 180 mM de concentración de tampón, recogándose la solución saliente mediante un colector de fracciones FRAC-100 (Pharmacia).

La pureza de las fracciones recogidas se determinó mediante espectrofotometría, a partir del coeficiente de absorbancias a 280 y 597 nm: A_{280}/A_{597} (Varley *et al.*, 1995), entendiéndose que la absorbancia a 597 nm es específica de la Pc. La razón de pureza de la Pc-*Pho* alcanza su mínimo en un valor de 3

(Varley *et al.*, 1995), por lo cual, cuanto mayor sea el valor de esta razón menor será la pureza de la Pc de la fracción. El máximo de pureza se alcanzó a una concentración de eluyente de 120 mM. Las fracciones recogidas con una razón de pureza inferior a 10, fueron concentradas mediante ultrafiltración por presión con el sistema Aminco (Millipore, membrana YM3) y posteriormente por filtración por centrifugación con filtros de centrifugación centración (Millipore, membrana YM3).

Se prosiguió con un segundo paso de purificación por filtración en gel. La muestra se centrifugó a 12000xg durante 15 minutos a 4 °C, para eliminar posibles agregados, y se cargó en la columna de filtración HiLoad 16/60 Sephadex-75 (Pharmacia) equilibrada con tampón citrato 10 mM, pH 6, NaCl a 0,1 mM.

Finalmente las fracciones puras (R=3) (Varley *et al.*, 1995) se volvieron a concentrar por centrifugación con los filtros centración (Millipore, membrana YM3). En el caso del mutante F80A un nuevo paso de purificación por la columna de filtración fue necesario. La Pc-Syn fue amablemente cedida por Dña. Estrella Frutos Beltrán.

2.2.5 Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida

La electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Schäfer y von Jagow (1987), usando geles discontinuos de SDS-poliacrilamida, con un gel de concentración y otro de separación, en un aparato Mini-Protean II (BioRad) según las instrucciones del fabricante.

2.2.6 Espectroscopia de dicroísmo circular

Las muestras fueron preparadas a una concentración de Pc 5 µM en tampón tris/HCl 2 mM, pH 6. Las muestras reducidas contenían una cantidad equimolar de ascorbato sódico.

Se midieron los espectros a temperatura ambiente en el espectropolarímetro MOS 450 (BioLogic) provisto con un fotomultiplicador PMS-450, usando una

cubeta de 1 mm de paso óptico tras la purga con nitrógeno de todo el sistema óptico y el previo calentamiento de la lámpara de arco voltaico de xenón.

Con el software biokine32 (BioLogic), se suavizó cada punto del espectro promediándolo con los 5 puntos anteriores y posteriores al mismo. Los datos se analizaron con el programa CDpro (Sreerama *et al.*, 2000) usando el patrón de referencia de dicho programa SP43 (Sreerama *et al.*, 2000).

Las muestras estudiadas en la región del espectro visible contenían Pc 165 μM en tampón citrato 20 mM, pH 6.

2.2.7 Medidas potenciométricas

Las valoraciones redox de la plastocianina y sus mutantes se realizaron en condiciones de anaerobiosis siguiendo el método descrito por Ortega *et al.* (1988).

El potencial redox se midió con un electrodo combinado de Pt-Ag/AgCl MI-800 (Microelectrodes Inc.) de 4 mm de diámetro, calibrado previamente con una solución saturada de quinhidrona en tampón fosfato 200 mM ($E_m +280$ mV a 20 °C). Los cambios de potencial se registraron en un potenciómetro digital Metrohm 654. Los cambios de absorbancia se midieron en el espectrofotómetro de matriz de diodos Hewlett Packard 8452A.

2.2.8 Medidas de estabilidad mediante espectroscopia de fluorescencia

Para los experimentos de espectroscopia de fluorescencia se siguió el protocolo descrito por Feio *et al.* (2004). Las muestras contenían Pc a una concentración de 25 μM en tampón citrato sódico 10 mM, pH 6, en condiciones aeróbicas. Las muestras reducidas contenían una concentración equimolar de ascorbato sódico, para evitar la autoxidación de la proteína a lo largo del experimento.

Para el ajuste de los datos experimentales se utilizó la ecuación de Bolen y Santoro (1988) adaptada a los procesos de desnaturalización térmica según la literatura (Sinha *et al.*, 2000):

$$\Phi(T) = \frac{\Phi_U(T) + \Phi_F(T)e^{\frac{-\Delta H_m}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m}\right)}}{\left(1 + e^{\frac{-\Delta H_m}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m}\right)}\right)}$$

En la que ϕ , ϕ_U y ϕ_F son los rendimientos cuánticos de fluorescencia del total de la muestra, de la porción desplegada (U) y plegada (F), respectivamente. R es la constante universal de los gases, ΔH_m es el cambio de entalpía de transición asociado con el despliegue de la proteína y la T_m es la temperatura de fusión a la que la mitad de la población proteica se encuentra en su estado plegado y la otra mitad en el correspondiente desplegado. La dependencia de ϕ_U y ϕ_F con respecto a la temperatura se ajusta a una función parabólica, aproximación que hace los valores de ΔH_m comparables a los que se puedan obtener mediante calorimetría diferencial de barrido en caso de que la desnaturalización sea reversible (Sinha *et al.*, 2000). El análisis de los datos se realizó con el programa Microcal Origin Versión 6.0.

2.2.9 Medida de la estabilidad proteica mediante espectrofotometría UV-visible

Los experimentos se llevaron a cabo con las especies oxidadas, responsables del pico de absorbancia a 597 nm. Se siguió la disminución de la absorbancia dependiente de la temperatura mediante el detector de diodos Hewlett Packard 8452A, en condiciones idénticas a las de los experimentos de fluorimetría.

A los valores de absorbancia a 598 nm se les sustrajo los correspondientes a 500 nm que fueron considerados como línea base, pues corresponden al punto isobéptico de la Pc. La absorbancia a 597 nm no se pudo medir pues el detector de diodos utilizado sólo mide en valores pares de longitudes de onda.

La ecuación utilizada para el ajuste de los datos fue la misma que en el apartado anterior -adaptada a los fenómenos de absorción en lugar de fluorescencia- y asumiendo una dependencia lineal de los coeficientes de extinción del cobre con

respecto a la temperatura (Ma *et al.*, 2005). En este caso, la T_{Cu} es la temperatura a la que se ha perdido el 50% de la absorbancia a 598 nm. El análisis de los datos se realizó con el programa Microcal Origin Versión 6.0.

2.2.10 Medidas y análisis de los datos de espectroscopia de rayos-X

Para estudiar los umbrales K de absorción del cobre a 8979 eV, se utilizó la radiación sincrotrón de la *European Radiation Synchrotron Facility* (ESRF, Grenoble, Francia). Las medidas de absorción de rayos-X se llevaron a cabo en la línea BM29 del ESRF usando un monocromador de doble cristal ajustado con un par de cristales planos de Si(1 1 1). Las medidas se realizaron a 77 K en modo fluorescencia, usando un criostato y un detector de germanio en estado sólido de 13 elementos.

Para registrar la intensidad de los rayos-X se usaron cámaras de ionización delante y detrás de la muestra y de la referencia, que consistió en una lámina de cobre metálico. Esto permitió registrar de forma simultánea la absorción de la muestra estándar de cobre y de la muestra proteica. Esta medida interna permite la calibración de la escala de energía con una precisión de $\pm 0,1$ eV.

Se preparó una disolución 1 mM de proteína en 5 mM de tampón fosfato sódico a pH 7,0 y 40% de glicerol. Utilizando la misma muestra de Pc, la especie oxidada se obtuvo añadiendo cantidades equimolares de $K_3[Fe(CN)_6]$, posteriormente eliminado por filtración en gel. Las muestras líquidas se cargaron en células de aluminio 5754 con dos láminas de Kapton de 12 μ m. La forma reducida se consiguió mediante adición de ascorbato sódico, a una concentración dos veces superior a la de la proteína. Cada punto experimental se registró durante 4 segundos. Se tomaron 14 y 7 espectros de la forma oxidada y reducida respectivamente de la Pc-Pho, 6 y 7 espectros de la forma oxidada y reducida respectivamente del doble mutante de *Phormidium* P49G/G50P y 8 y 7 espectros de la forma oxidada y reducida respectivamente de la Pc-Syn.

Cada espectro requirió, aproximadamente, 45 minutos de tiempo de adquisición, sin que se presentaran signos relevantes de foto-reducción. En todos los

casos, los barridos se promediaron para obtener una buena relación señal ruido. En las especies oxidadas, el umbral se mantuvo en una energía fija desde el primer hasta el último barrido, confirmándose la ausencia de fotorreducción. La ausencia de cambios inducidos por la radiación se confirmó con medidas de UV-Vis antes y después de las medidas de XAS.

2.2.10.1 Análisis de los datos de XAS

Para obtener el promedio de los espectros, la substracción de la señal de fondo y la normalización de la amplitud requerida para obtener la funciones $\chi(k)$ de estructura fina de absorción de rayos-X, se utilizó el módulo Athena (versión 0.8.058) de IFEFFIT (versión 1.2.11c) (Rehr *et al.*, 1992). E_0 se definió como el máximo de la primera derivada del pico de absorción. El intervalo de k excluido de los cálculos de la señal de fondo (Rbkg) fue de 1,1 Å y 1,2 Å para las especies oxidadas y reducidas respectivamente. Para analizar los espectros de EXAFS, las amplitudes y fases teóricas se calcularon usando el código IFEFFIT (versión 1.2.11c) (Rehr *et al.*, 1992). El ajuste de los datos experimentales a distintos modelos se realizó con el programa Artemis (versión 0.8.013) (Newville, 2001; Ravel y Newville, 2005).

3. RESULTADOS

3.1 Dinámica molecular

3.1.1 Análisis de la secuencia primaria

La comparativa entre las secuencias de la *Pc-Pho* y de la *Pc-Syn* indica que ambas proteínas poseen la misma proporción de aminoácidos polares con carga, polares sin carga y apolares. La única diferencia apreciable corresponde a los aminoácidos aromáticos, de los que hay 1,14 veces más en la *Pc-Pho* que en la *Pc-Syn*. Esta diferencia viene dada por la presencia de dos fenilalaninas en la *Pc-Pho* (Phe3 y Phe80) que participan en agrupaciones hidrófobas.

Las dos proteínas estudiadas comparten una identidad de secuencia del 63 % (Figura 5). La zona con menor identidad de secuencia contiene los aminoácidos de las hebras $\beta 5$ y $\beta 6$, el lazo L_5 y la hélice α . A partir de ahora, denominaremos a esta zona Región A (del aminoácido 40 al 65 en el alineamiento). La identidad de secuencia de la Región A en ambas proteínas es del 43%. Por otro lado, el entorno del centro de cobre es la parte más conservada, siendo la identidad de secuencia de la primera y segunda esfera de ligandos del cobre del 92%.

		10	20	30	40
<i>Pc-Pho</i>	ETFTVKMGAD	SGLLQFEPAN	VTVHPGDTVK	WVNNKLPPHN	
<i>Pc-Syn</i>	-NATVKMGSD	SGALVFEPST	VTIKAGEEVK	WVNNKLSPHN	
	.	*****:*	** * ***:.	**::.*: **	*****.***
		50	60	70	80
<i>Pc-Pho</i>	ILFDDKQVPG	ASKELADKLS	HSQLMFSPGE	SYEITFSSDF	
<i>Pc-Syn</i>	IVFAAD---G	VDADTAAKLS	HKGLAFAAGE	SFTSTFT---	
	: . *	.. : * ***	*. * *:.**	*: **:	
		90	100		
<i>Pc-Pho</i>	PAGTYTYICA	PHRGAGMVGK	ITVEG		
<i>Pc-Syn</i>	EPGTYTYICE	PHRGAGMVGK	VVVE-		
	.*****	*****	:.**		

Figura 5. Alineamiento de secuencia de la *Pc-Pho* y la *Pc-Syn*. Los residuos idénticos en ambas proteínas están marcados con un asterisco, residuos muy parecidos con dos puntos, residuos parecidos con un punto y los residuos distintos no están marcados.

Diferencias entre ambas proteínas también se encuentran en las hebras $\beta 1$ y $\beta 2$, destacando la presencia de la Phe3 en la Pc-Pho en vez de una Ala, como sucede en la Pc-Syn. Feio *et al.* (2006) sugirieron que esta Phe3 podía jugar un papel relevante en la termorresistencia de la Pc-Pho. Un residuo aromático en la posición tres también se encuentra en la plastocianina no termofílica de la cianobacteria *Nostoc*, por lo que esta diferencia entre la Pc-Pho y la Pc-Syn no puede explicar por sí sola las distintas termoestabilidades observadas.

3.1.2 Cargas del centro de cobre

En este trabajo hemos calculado las cargas atómicas tipo RESP (“*restrained electrostatic potential*”) (Bayly *et al.*, 1993) de los átomos correspondientes a los ligandos del átomo de cobre, así como de este último. Estas cargas ya habían sido previamente calculadas por Comba y Remenyi (2002), pero decidimos calcularlas de nuevo porque la suma de las cargas en dicha referencia no resultaba un número entero, como sería de esperar, sino 0,350. La razón es que en el trabajo de Comba y Remenyi se empleó un modelo (ver Figura 6) en el que no se consideraron los átomos del esqueleto peptídico así como los C_{β} de las cadenas laterales.

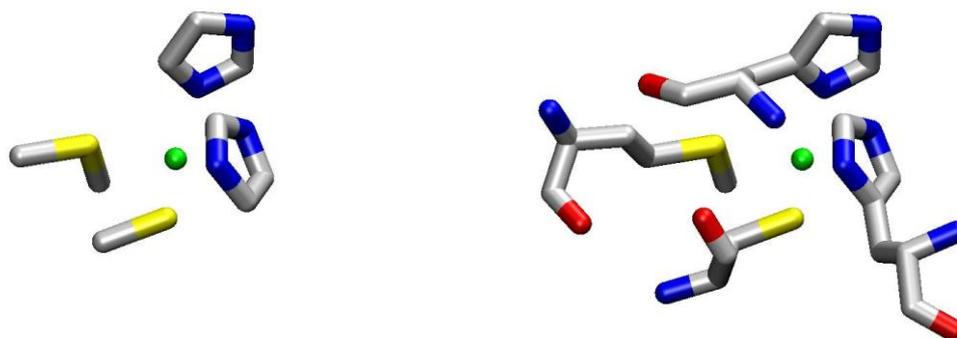


Figura 6. Representación del centro de cobre de las plastocianinas. A la izquierda se muestra el modelo utilizado en el trabajo de Comba *et al.* (2002) y a la derecha el modelo usado en este trabajo para calcular las cargas atómicas del centro de cobre. Se omiten los átomos de hidrógeno en la figura, para simplificar la imagen. Los átomos están coloreados según el esquema: cobre, verde; carbono, gris; nitrógeno, azul; oxígeno, rojo; azufre, amarillo. Para esta representación se utilizó el programa VMD (Humphrey *et al.*, 1996).

En las Tablas 4 y 5 se muestran las cargas calculadas para el átomo de cobre y los átomos de la primera esfera de ligandos. En el caso de la *Pc-Syn*, la estructura de partida para estos cálculos fue un modelo de NMR en el que el entorno del cobre no se pudo determinar con precisión. Por ello, una vez obtenido el primer juego de cargas atómicas, éstas se usaron para optimizar la geometría del centro activo con AMBER9, obteniendo unas nuevas coordenadas que dieron lugar a las cargas atómicas definitivas.

Tabla 4. Cargas atómicas calculadas para los átomos de la *Pc-Pho* de la primera esfera de ligandos del cobre, incluido este último.

Átomo	q	Átomo	q	Átomo	q	Átomo	q
N His39	-0,280	N His92	-0,386	N Cys89	-0,300	N Met97	-0,300
H _N His39	0,234	H _N His92	0,261	H _N Cys89	0,211	H _N Met97	0,199
C _α His39	0,032	C _α His92	0,066	C _α Cys89	0,081	C _α Met97	0,007
H _α His39	0,866	H _α His92	0,133	H _α Cys89	0,156	H _α Met97	0,085
C _β His39	-0,089	C _β His92	0,098	C _β Cys89	-0,587	C _β Met97	-0,025
H _β His39	0,097	H _β His92	0,022	H _β Cys89	0,265	H _β Met97	0,057
C _γ His39	-0,036	C _γ His92	-0,032	S _γ Cys89	0,197	C _γ Met97	-0,009
N _{δ₁} His39	0,044	N _{δ₁} His92	-0,011	C Cys89	0,307	H _γ Met97	0,092
C _{ε₁} His39	0,061	C _{ε₁} His92	-0,034	O Cys89	-0,319	S _δ Met97	-0,286
H _{ε₁} His39	0,099	H _{ε₁} His92	0,121			C _ε Met97	-0,067
N _{ε₂} His39	-0,147	N _{ε₂} His92	-0,141			H _ε Met97	0,070
H _{ε₂} His39	0,321	H _{ε₂} His92	0,328			C Met97	0,423
C _{δ₂} His39	-0,263	C _{δ₂} His92	-0,208			O M97	-0,432
H _{δ₂} His39	0,230	H _{δ₂} His92	0,201				
C His39	0,497	C His92	0,398				
O His39	-0,497	O His92	-0,450				
Cu His39	0,140						

Además de las cargas, también se analizó si las distancias o ángulos entre dichos átomos se modificaban en las simulaciones de dinámica molecular bien por el efecto de la matriz proteica o bien por las altas temperaturas de dichas modificaciones. En ningún caso se observó modificación alguna.

Tabla 5. Cargas atómicas calculadas para los átomos de la Pc-Syn de la primera esfera de ligandos del cobre, incluido este último.

Átomo	q	Átomo	q	Átomo	q	Átomo	q
N His39	-0,435	N His86	-0,390	N Cys83	-0,390	N Met91	-0,357
H _N His39	0,307	H _N His86	0,239	H _N Cys83	0,247	H _N Met91	0,236
C _α His39	0,031	C _α His86	0,012	C _α Cys83	0,048	C _α Met91	0,028
H _α His39	0,136	H _α His86	0,095	H _α Cys83	0,097	H _α Met91	0,140
C _β His39	-0,077	C _β His86	0,018	C _β Cys83	0,323	C _β Met91	0,062
H _β His39	0,074	H _β His86	0,055	H _β Cys83	0,019	H _β Met91	-0,005
C _γ His39	0,173	C _γ His86	0,007	S _γ Cys83	-0,459	C _γ Met91	0,076
N _{δ₁} His39	-0,192	N _{δ₁} His86	-0,033	C Cys83	0,449	H _γ Met91	0,003
C _{ε₁} His39	-0,113	C _{ε₁} His86	-0,074	O Cys83	-0,436	S _δ Met91	-0,172
H _{ε₁} His39	0,178	H _{ε₁} His86	0,182			C _ε Met91	-0,282
N _{ε₂} His39	-0,176	N _{ε₂} His86	-0,229			H _ε Met91	0,132
H _{ε₂} His39	0,341	H _{ε₂} His86	0,358			C Met91	0,441
C _{δ₂} His39	-0,199	C _{δ₂} His86	-0,109			O Met91	-0,463
H _{δ₂} His39	0,195	H _{δ₂} His86	0,171				
C His39	0,501	C His86	0,502				
O His39	-0,485	O His86	-0,507				
Cu His39	0,291						

3.1.3 Convergencia del muestreo conformacional de las simulaciones

Hemos realizado simulaciones de MD a distintas temperaturas desde 298 a 498 K. A pesar de la disponibilidad de un campo de fuerzas para el Cu(I) (Deeth,

2007), éste no es compatible ni con los parámetros disponibles para el Cu(II) ni con el campo de fuerzas de AMBER, por lo que las simulaciones se realizaron exclusivamente con las especies oxidadas. A partir de estas simulaciones hemos calculado propiedades relacionadas con la estabilidad térmica de las proteínas.

Las cuatro simulaciones de la Pc-Syn a 298 K, realizadas bien con distintos protocolos o bien con diferentes estructuras de partida, convergen a conjuntos conformacionales parecidos con propiedades estructurales idénticas, véanse las Figura 7 y 8 en las que se muestra las fluctuaciones medias (“*Root mean square fluctuation*” o RMSF) de los C_{α} de la Pc-Syn, calculadas a lo largo de la fase estable de la trayectoria.

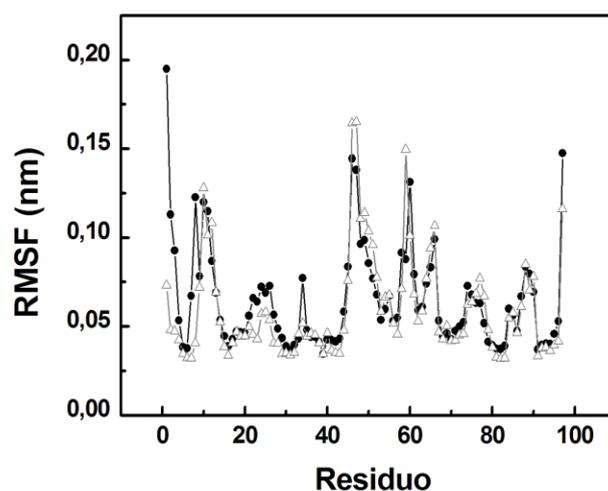


Figura 7. Comparación de las fluctuaciones de los C_{α} de la Pc-Syn en distintas simulaciones de dinámica molecular a 298 K, usando como estructura inicial el modelo estructural de NMR (negro, círculos) y la estructura procedente de difracción de rayos-X (gris, triángulos).

En el caso de la Pc-Syn, para cálculos posteriores o equilibrar la simulación a 333 K, se utilizaron los datos de la trayectoria que partió del modelo silvestre de NMR.

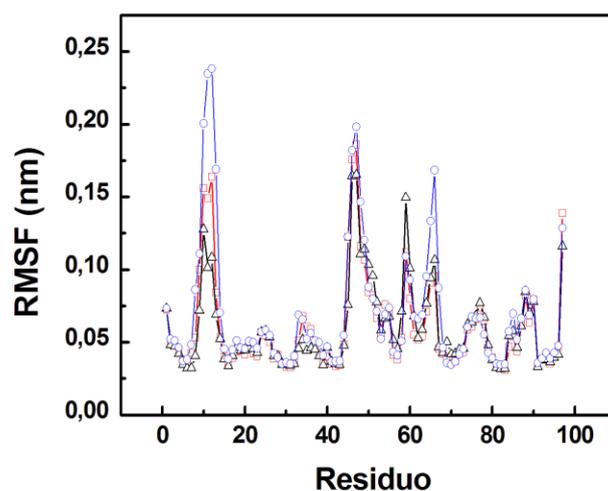


Figura 8. Comparación de las fluctuaciones de los C_{α} de la Pc-Syn en distintas simulaciones, usando como estructura inicial la de difracción de rayos-X (Código PDB: 1PCS) y tres protocolos de equilibrado distintos. El primer protocolo (ver materiales y métodos) se representa en negro (triángulos), el segundo se representa en rojo (cuadrados) y el tercero se representa en azul (círculos).

Las desviaciones medias (“*Root mean square deviation*” o RMSD) a lo largo de las trayectorias con respecto a las coordenadas iniciales, calculadas a 298 K y considerando los átomos del esqueleto de la Pc-Pho y la Pc-Syn, son 0,97 y 1,89 Å respectivamente (Tabla 6). El valor de RMSD para el total de los átomos de la Pc-Pho es similar al de un estudio anterior de MD de la Pc de espinaca (1,8 Å) (Arcangeli *et al.*, 2001) y por lo tanto indicativo de reproducibilidad. La Pc-Syn muestra un valor más alto de RMSD (2,6 Å), el cual podría deberse a la imprecisión del modelo estructural en la esfera de coordinación del cobre, al haberse utilizado la estructura en disolución como coordenadas de partida. De hecho, el RMSD de los giros y lazos del entorno del cobre, donde se encuentran las mayores incertidumbres (Bertini *et al.*, 2001), es de 4,1 Å mientras que para el resto de la proteína es de 2,0 Å. El RMSD de los átomos del esqueleto del modelo de partida (Bertini *et al.*, 2001) se encuentra en el rango de 2-3 Å. Otros parámetros como el RMSF y el radio de giro (Tabla 6) muestran pequeñas fluctuaciones, sugiriendo que la estabilidad de las simulaciones se ha obtenido exceptuando el caso de 498 K, en el que como es de esperar, las proteínas se mueven considerablemente.

Tabla 6. Datos estadísticos de las propiedades de la Pc calculados a lo largo de las trayectorias^a.

Proteína	Temperatura (K)	Tiempo (ns)	bb-RMSD ^b (Å)	RMSD ^c (Å)	C _α -RMSF ^d (Å)	$\langle R_g \rangle$ ^e (Å)
Pc-Pho	298	20,7	0,97 ± 0,11	1,54 ± 0,10	0,60 ± 0,28	13,01 ± 0,05
Pc-Pho	333	11,0	1,30 ± 0,34	1,90 ± 0,33	0,77 ± 0,54	13,00 ± 0,08
Pc-Pho	338	13,0	1,23 ± 0,30	1,77 ± 0,27	0,77 ± 0,49	13,03 ± 0,06
Pc-Pho	354	11,0	1,74 ± 0,15	2,31 ± 0,12	0,86 ± 0,48	13,00 ± 0,06
Pc-Pho	498	14,0	4,00 ± 0,55	4,66 ± 0,50	1,96 ± 1,01	12,98 ± 0,17
Pc-Syn	298	11,0	1,89 ± 0,13	2,65 ± 0,10	0,65 ± 0,29	12,58 ± 0,05
Pc-Syn	323	11,5	1,26 ± 0,13	1,84 ± 0,15	0,68 ± 0,38	12,56 ± 0,05
Pc-Syn	338	11,0	1,37 ± 0,10	2,33 ± 0,08	0,78 ± 0,38	12,55 ± 0,06
Pc-Syn	354	13,0	1,40 ± 0,17	1,88 ± 0,17	0,89 ± 0,50	12,58 ± 0,07
Pc-Syn	498	11,0	3,63 ± 0,93	4,10 ± 0,85	2,02 ± 1,28	12,77 ± 0,16

^a Todos los valores se calcularon en la parte de la trayectoria donde el valor de RMSD se mantiene estable.

^b bb-RMSD: Desviación media de los átomos del esqueleto de la proteína con respecto a la estructura inicial de la simulación.

^c RMSD: Desviación media de los átomos de la proteína con respecto a la estructura inicial de la simulación.

^d C_α-RMSF: Fluctuación media de los C_α.

^e $\langle R_g \rangle$: Radio de giro.

La convergencia del muestreo conformacional también se evaluó por medio del análisis de componentes principales. Los primeros 8 vectores propios de la matriz de covarianza se calcularon a partir de los desplazamientos cartesianos de la posición promedio. A temperatura ambiente, el solapamiento de los primeros ocho vectores propios de cada una de las mitades de la simulación es 0,46 para la Pc-Pho (véase Figura 9) y 0,54 para la Pc-Syn, indicando que el tiempo de la simulación es lo suficientemente largo para obtener un muestreo significativo del sistema, según criterios establecidos en la literatura (deGroot *et al.*, 1996).

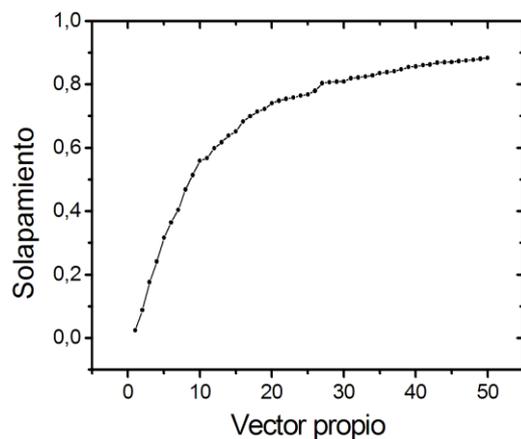


Figura 9. Solapamiento del subespacio de los vectores propios correspondientes al análisis de componentes principales de la matriz de covarianza de la primera mitad de la simulación con los correspondientes a la segunda mitad de la simulación de la *Pc-Pho* a temperatura ambiente. Los $C\alpha$ alineados previamente se usaron para construir la matriz de covarianza.

3.1.4 Flexibilidad de las proteínas

Los puntos más flexibles de ambas proteínas se identificaron calculando los RMSFs de los $C\alpha$ a distintas temperaturas. Los RMSFs máximos se sitúan en los giros y lazos. En la mayoría de las simulaciones las fluctuaciones más altas se encuentran en los aminoácidos 10-12 y 50-52 de la *Pc-Pho* y 10-12, 46-48 de la *Pc-Syn*, secuencias que se encuentran en los lazos L_1 y L_5 (Figura 10).

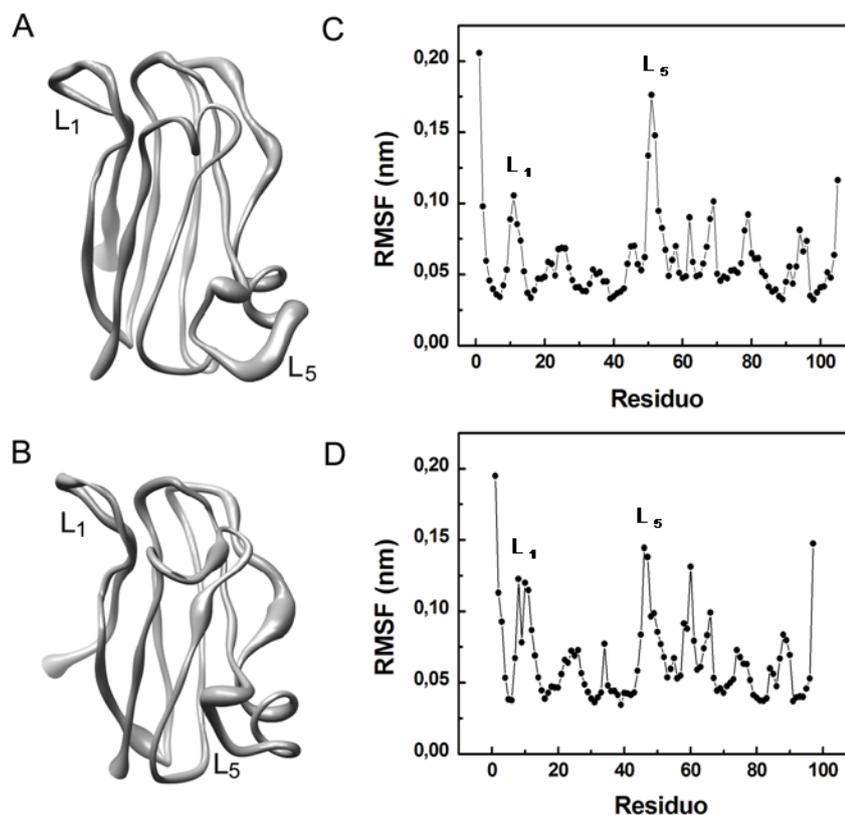


Figura 10. Fluctuaciones medias a 298 K. Los paneles A y B muestran las regiones con mayor movilidad de la *Pc-Pho* y la *Pc-Syn* respectivamente. El diámetro de la traza del esqueleto peptídico es proporcional a los valores de RMSF. Los lazos primero y quinto están etiquetados como L_1 y L_5 . Los paneles C y D muestran el RMSF de cada residuo de la *Pc-Pho* y la *Pc-Syn* respectivamente. Las imágenes A y B se generaron con el paquete de software UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).

El L_1 forma parte de la cara Norte de la proteína (ver Figura 10) donde se ubica el átomo de cobre, mientras que el lazo L_5 pertenece a la Región A, también conocida como cara Este. Dichos lazos se localizan en extremos opuestos del barril β , donde los residuos poseen un menor número de enlaces de hidrógeno con el resto de la proteína que los residuos que se encuentran en la parte central de las dos láminas β . Estudios previos de dinámica molecular también subrayan que estos dos lazos son muy móviles (Feio *et al.*, 2006).

3.1.5 Características proteicas relacionadas con la estabilidad térmica

3.1.5.1 Contenido de estructura secundaria

Un mayor contenido de estructura secundaria se relaciona con un aumento de la estabilidad térmica (Chakravaty *et al.*, 2002). En la Figura 11 se muestra la evolución de la estructura secundaria de las dos Pcs a lo largo de tres simulaciones. Como ya habían descrito Feio *et al.* (2006), las hebras $\beta 1$ y $\beta 2$ son menos estables en la Pc-Syn que en la Pc-Pho. En nuestro estudio, es de destacar que las hebras $\beta 5$ y $\beta 6$ son claramente menos estables en la Pc-Syn que en la Pc-Pho. En la Figura 11 se puede apreciar como, al aumentar la temperatura, las hebras $\beta 5$ y $\beta 6$ de la Pc-Pho se desestabilizan, mostrando una estructura de lazo similar a la de la Pc-Syn a temperatura ambiente.

El mismo comportamiento de las hebras $\beta 5$ y $\beta 6$ se observó en la simulación en la que la temperatura se elevaba de 298 a 498 K progresivamente, es decir, las hebras eran estables al inicio de la simulación y al ir incrementando la temperatura se desestabilizaron.

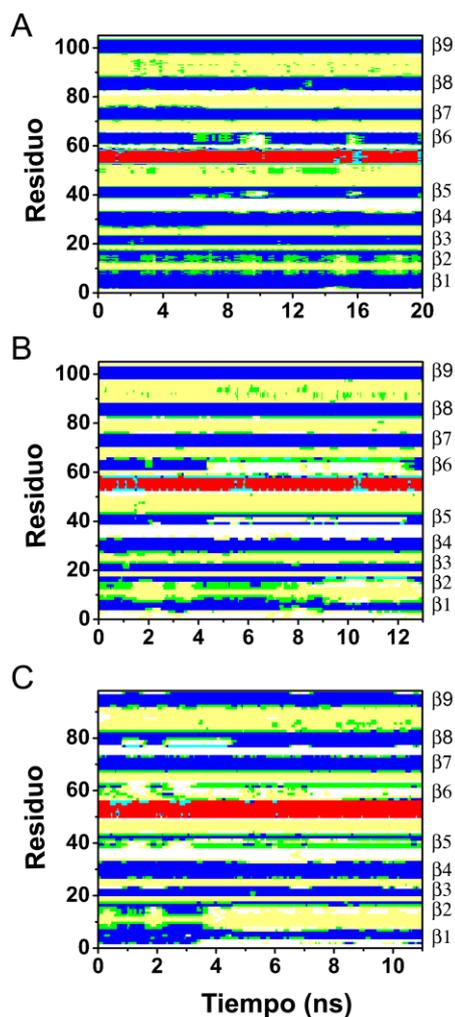


Figura 11. Evolución de la estructura secundaria de las dos Pcs a lo largo del tiempo de simulación. En el panel A y B se muestran el contenido de estructura secundaria de la Pc-*Pho* a 298 y 338 K respectivamente, en el panel C se muestra el contenido de estructura secundaria de la Pc-*Syn* a 298 K. Código de colores: hebra β , azul; puente β , verde; hélice α , rojo; hélice π , celeste; giro, amarillo; lazo, blanco. Estos cálculos y las correspondientes imágenes se realizaron con el programa VMD (Humphrey *et al.*, 2003).

3.1.5.2 Órdenes de contacto

Los órdenes de contacto (OC) dan cuenta de las distancias promedio a lo largo de la secuencia entre residuos que contactan, y están relacionados empíricamente con la velocidad de plegamiento (Plaxco *et al.*, 1998). Estudios de genómica estructural (Robinson-Rechavi *et al.*, 2006) sugieren que la organización de los contactos entre distintos residuos juega un papel fundamental en la estabilidad de las proteínas de organismos termófilos. Esta organización se cuantifica

mediante las conectividades de nodo (promedio del número de contactos por nodo, siendo los residuos aminoacídicos los nodos de la red de interacciones) y los coeficientes de agrupación (“*clustering coefficients*”, C ; ver Figura 12). Estos últimos evalúan la cohesión de la red midiendo la probabilidad de conexión entre dos nodos (residuos) cuando ambos están ligados a un tercer nodo, pudiendo estar ponderados según la intensidad del contacto.

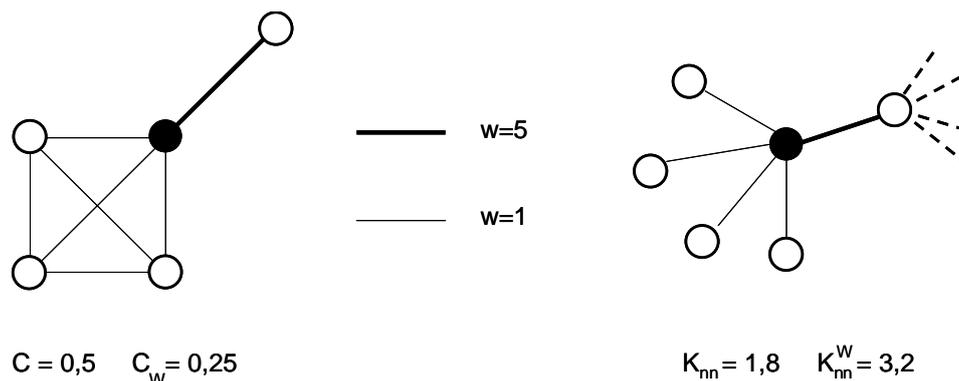


Figura 12. Ejemplos de configuraciones locales cuyos parámetros topológicos y ponderados son distintos. En ambos casos, el vértice central (relleno) presenta una unión muy fuerte con uno de sus vecinos. El coeficiente de agrupación ponderado (C_w) y el promedio del grado de vecinos más cercanos (K_{nn}^w) reflejan con mayor precisión la cohesividad y afinidad debidas a la fuerza de interacción (ver materiales y métodos para la definición de los parámetros). Adaptado de Barrat *et al.*, 2004.

Calculamos los OC de las estructuras de las dos Pcs (entrada PDB: 1BAW, Bond *et al.*, 1999; entrada PDB: 1PCS, Romero *et al.*, 1998), disponibles en la base de datos de PDB (Bernstein *et al.*, 1977), y de las trayectorias de MD, usando un radio límite de 6 Å centrado en los C_α o de 4,5 Å centrado en los átomos pesados para el análisis topológico. En el caso de las trayectorias de MD, los OC se ponderaron según el número de átomos de cada proteína y la frecuencia de los contactos durante las trayectorias. Los OC de las dos estructuras experimentales son 16,2 y 15,5 para la Pc-Pho y la Pc-Syn respectivamente. Considerando el número de residuos de cada proteína, los OC relativos son muy parecidos, 0,154 y 0,158 respectivamente. Este resultado basado en las estructuras experimentales es contrario a la tendencia general hallada en la bibliografía, que indica un mayor orden de contacto relativo en las proteínas termofílicas (Robinson-Rechavi *et al.*, 2006).

También las conectividades son mayores en la *Pc-Syn* (hay más contactos por residuos) que en la *Pc-Pho* aunque, por otro lado, y esta vez acorde a lo esperable según los datos bibliográficos (Robinson-Rechavi *et al.*, 2006), los coeficientes de agrupación ponderados son mayores en la *Pc-Pho*. Sin embargo, estas diferencias desaparecen al promediar los datos obtenidos por MD a temperatura ambiente (Tabla 7).

Tabla 7. Topología de los contactos de las estructuras cristalográficas de la *Pc-Pho* y la *Pc-Syn* y de las trayectorias de MD a distintas temperaturas.

Proteína	Datos	Contactos	No triviales	Orden contacto	OC relativo ^a	$\langle k \rangle^b$	$\langle C_w^i \rangle^c$	$\langle k_{nn}^{i,w} \rangle^d$
<i>Pc-Pho</i>	XR	12225	1558	16,23	0,154	2,56	0,198	3,19
	298	43267	7695	19,03	0,181	5,21	0,342	6,08
	338	42934	7637	18,94	0,180	5,57	0,340	6,42
	354	42288	7297	18,53	0,177	6,12	0,366	6,95
	498	40671	6693	17,28	0,165	9,21	0,450	10,15
<i>Pc-Syn</i>	XR	13792	3669	15,49	0,158	4,11	0,098	4,75
	298	37366	6591	18,16	0,185	5,21	0,323	6,12
	338	38123	6790	18,16	0,185	5,63	0,346	6,53
	354	38223	6789	18,40	0,188	5,83	0,358	6,70
	498	36550	6064	17,35	0,177	8,54	0,436	9,35

^a OC: Orden de contacto.

^b $\langle k \rangle$: Conectividad media.

^c $\langle C_w^i \rangle$: Coeficiente de agrupación ponderado.

^d $\langle k_{nn}^{i,w} \rangle$: Grado de conectividad promedio ponderado de los vecinos próximos.

De hecho, después de efectuar el promedio, la *Pc-Pho* sólo posee una mayor conectividad entre los residuos 45-48 y 76-81 (lazos L_5 y L_7 respectivamente). Dichos residuos forman parte de las inserciones que la *Pc-Pho* presenta respecto a la *Pc-Syn* (ver alineamiento en Figura 5).

Al aumentar la temperatura, el número de contactos decrece y se observan pequeños cambios en los OCs. En la *Pc-Pho*, los OCs decrecen monótonicamente

con la temperatura, indicando que los contactos formados por residuos distantes en la secuencia son los que se pierden principalmente. Esta tendencia no es tan clara en la *Pc-Syn*, salvo en la simulación de 498 K. Por otro lado, el análisis de la red de interacción muestra que las conectividades aumentan con la temperatura, indicando que cada residuo contacta más residuos como resultado del aumento de las fluctuaciones atómicas, aunque cada una de estas interacciones es más débil que a temperatura ambiente, según la menor cantidad de átomos implicados en estos contactos. Este efecto es también más acusado en la *Pc-Pho*.

3.1.5.3 Área accesible al solvente

La razón entre el SAS apolar y el SAS polar debe alcanzar un máximo en el estado desplegado, donde la mayoría de los átomos apolares se encuentran expuestos al solvente, al contrario de lo que sucedería en el estado plegado. De aquí que esta razón se haya usado para evaluar la estabilidad térmica según la fuerza del efecto hidrófobo presente en la proteína (Szilagyi *et al.*, 2000). La razón promedio entre el SAS apolar y polar se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Razones promedio entre el área accesible al solvente (SAS) apolar y SAS polar de la *Pc-Pho* y *Pc-Syn* así como de los residuos comprendidos en la Región A de cada proteína (39-65 en la *Pc-Pho* y 39-62 en la *Pc-Syn*). Dichas razones se promediaron a lo largo de las simulaciones de MD.

Temperatura (K)	<i>Pc-Pho</i>		<i>Pc-Syn</i>	
	Proteína	Residuos 39-65	Proteína	Residuos 39-62
298	1,11	1,04	1,35	1,44
338	1,16	1,05	1,33	1,49
354	1,16	1,05	1,37	1,35
498	1,32	1,31	1,38	1,53

A todas las temperaturas probadas, con la excepción de 498 K, la razón de SAS apolar/polar es menor en la *Pc-Pho* que en la *Pc-Syn*. Esto indica que la *Pc-Pho* presenta una solvatación más óptima que la *Pc-Syn* en cuanto a la estabilidad térmica se refiere. Así, el cambio de capacidad calorífica desarrollado durante el despliegue de la *Pc-Pho* debería ser mayor que en la *Pc-Syn* debido a una exposición de grupos apolares al solvente más extensa (Murphy *et al.*, 1991). En la Región A, en la que podemos encontrar aminoácidos apolares principalmente en las hebras $\beta 5$ y $\beta 6$, estas diferencias son aún más pronunciadas.

3.1.5.4 Enlaces de hidrógeno

El papel de los enlaces de hidrógeno (EH) en la termoestabilidad proteica ha sido ampliamente discutido, como ya hemos explicado en la introducción (Robinson-Rechavi *et al.*, 2006). Generalmente, se piensa que su papel es estabilizador (Querol *et al.*, 1996, Sadeghi *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 1999). Las dos Pcs objeto de estudio en este trabajo contienen un número similar de EH intramoleculares. En la *Pc-Pho*, el número total de EH, normalizado por el número total de residuos, es 1,1 veces mayor que en la *Pc-Syn* ($0,67 \pm 0,04$ y $0,59 \pm 0,04$ respectivamente). Sin embargo, en la Región A, estas diferencias son más significativas. A temperatura ambiente, la *Pc-Pho* consta de $4,8 \pm 0,8$ EH establecidos entre la hebra $\beta 5$ y la hebra $\beta 6$, mientras que en la *Pc-Syn* solamente se establecen $3,2 \pm 0,8$ entre estas mismas hebras β (Figura 13). La diferencia en el número de EH entre las dos hebras podría deberse a la presencia de un residuo glicina (G59) en la hebra $\beta 6$ de la *Pc-Syn*, que causa un desajuste en el patrón de EH establecidos entre los residuos de ambas hebras β con respecto a la *Pc-Pho*. El mayor número de enlaces de hidrógeno en la Región A de la *Pc-Pho* podría contribuir positivamente a su termoestabilidad. Cuando se aumenta la temperatura no se observa una clara correlación con cambios en el número de EH en la Región A de ambas proteínas, posiblemente debido a que dichas hebras se encuentran en una conformación de lazo (ver apartado 3.1.5.1).

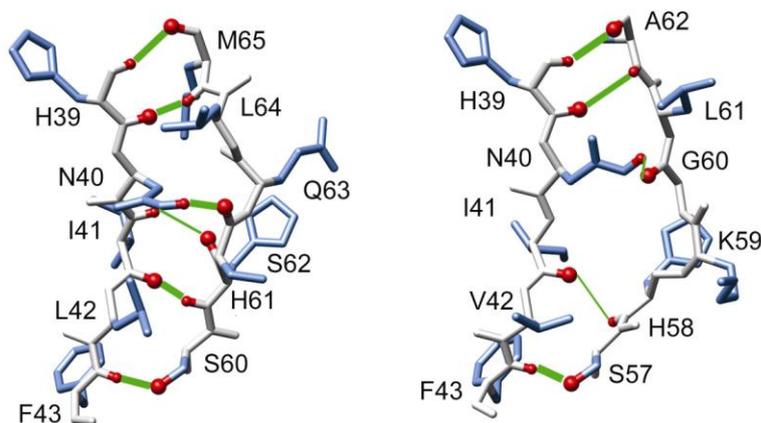


Figura 13. Enlaces de hidrógeno entre la quinta y sexta hebra β de las *Pc-Pho* (izquierda) y *Pc-Syn* (derecha) a 298 K. La traza de esqueleto se muestra en gris, las cadenas laterales en azul, los átomos de hidrógeno y oxígeno implicados en los enlaces de hidrógeno en rojo y los enlaces de hidrógeno se representan con líneas verdes cuya anchura es proporcional a la intensidad de los mismos. Esta figura se realizó con el programa UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).

3.1.5.5 Puentes salinos

A temperatura ambiente, la formación de un puente salino (PS) no contribuye a la estabilidad proteica debido al coste energético, en términos de desolvatación, que conlleva un establecimiento de un PS (Xiao *et al.*, 1999; Waldburger *et al.*, 1995). A altas temperaturas, sin embargo, los PS ganan importancia ya que el valor de la constante dieléctrica del agua disminuye, produciéndose por lo tanto un descenso en la penalización por desolvatación (Archer *et al.*, 1990).

La mayor densidad de carga de ambas proteínas se encuentra en la Región A, concretamente en los residuos situados entre las hebras β_5 y β_6 . De hecho, residuos ionizables de la Región A interactúan con cargas superficiales de sus compañeros fisiológicos (Haehnel *et al.*, 1994; Díaz-Moreno *et al.*, 2005). Consideramos el número de PS como el número de contactos que se producían en un radio de 4 Å entre los átomos de oxígeno carboxílicos de los residuos de aspartato o glutamato y los átomos de nitrógeno de los grupos amino o guanidinio de las lisinas o argininas (Vogt *et al.*, 1997). Como se puede observar en la Figura 14, la *Pc-Pho* en la Región

A forma más PS atractivos que en la *Pc-Syn*. Estos datos apoyan la idea del papel fundamental de la Región A en la diferencia entre las termoestabilidades de las dos Pcs estudiadas.

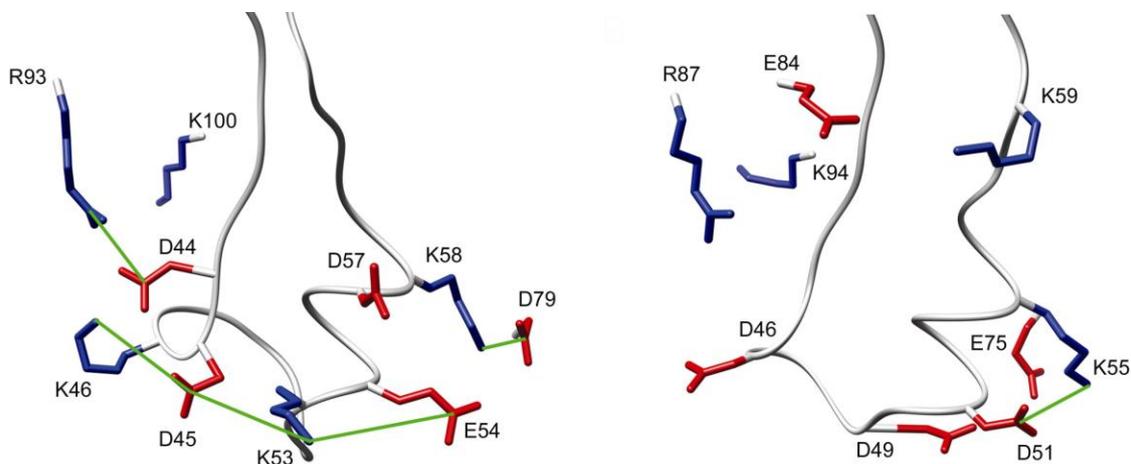


Figura 14. Interacciones iónicas atractivas con ocupaciones superiores al 60% a una temperatura de 498 K en la región A de la *Pc-Pho* (izquierda) y la *Pc-Syn* (derecha). La traza del esqueleto se muestra en gris, las cadenas laterales con carga negativa (rojo) y positiva (azul) se representan como “palos” (“sticks”). Esta figura se realizó con el programa UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).

3.1.5.6 Interacciones hidrófobas

La *Pc-Pho* contiene dos inserciones con respecto a la *Pc-Syn*. Éstas se hallan en el L_5 (Región A) y L_7 , lazos que interactúan entre sí por medio de interacciones hidrófobas. Los residuos implicados en esta agrupación hidrófoba son la Val48 y Pro49 del L_5 ; la Phe80, Pro81 y Tyr85 del L_7 ; y la Ile55. En la *Pc-Syn* se encuentra una agrupación análoga pero formada por menos residuos debido a la ausencia de las inserciones mencionadas. Los residuos formadores de esta agrupación en la *Pc-Syn* son la Pro49, la Ile55 y la Phe80 (Figura 15).

Es de destacar que el resto de agrupaciones hidrófobas se conservan con un gran porcentaje de identidad en ambas proteínas.

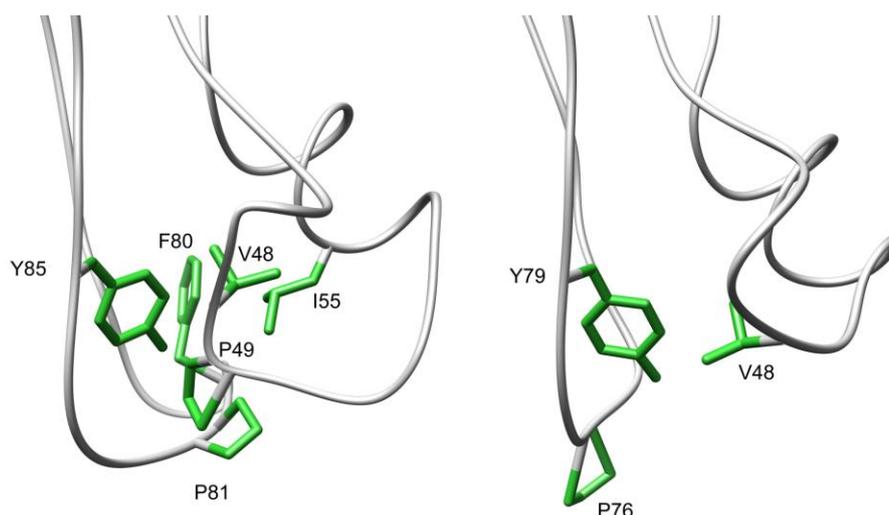


Figura 15. Agrupaciones hidrófobas de los residuos localizados en los lazos que conectan la quinta y sexta hebra β y la séptima y octava hebra β de las *Pc-Pho* (izquierda) y *Pc-Syn* (derecha). La traza del esqueleto se muestra en gris y las cadenas laterales de los residuos hidrófobos se representan como “palos” (“sticks”) verdes. Esta figura se realizó con el programa UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).

3.2 Análisis de la termoestabilidad de la *Pc-Pho* mediante mutagénesis dirigida

3.2.1 Diseño de los mutantes

Nos hemos centrado en el papel que las interacciones hidrófobas pueden jugar en la termoestabilidad de la *Pc-Pho*. Estas interacciones están más localizadas que las interacciones electrostáticas y además, como se indicó en el apartado 3.1.1, la comparativa entre el tipo de aminoácidos presentes en las dos *Pcs* indica que la única diferencia apreciable se da con respecto a los aminoácidos aromáticos, habiendo 1,14 veces más aminoácidos aromáticos en la *Pc-Pho* que en la *Pc-Syn*. Esta diferencia viene dada por la presencia de dos fenilalaninas en la *Pc-Pho* formadoras de agrupaciones hidrófobas (Phe3 y Phe80). Además, Feio *et al.* (2006) ya indicaron que las interacciones hidrófobas podrían tener un papel más relevante en la *Pc-Pho* que en la *Pc-Syn*.

Partiendo del alineamiento de secuencias de las *Pc-Pho* y *Pc-Syn*, pudimos determinar los aminoácidos no conservados, entre los que se encuentran aquéllos responsables de diferentes termoestabilidades entre las dos Pcs. En los mutantes diseñados de la *Pc-Pho* se sustituye un aminoácido no conservado por su análogo en la proteína mesofílica o bien se pretende interrumpir una interacción existente en la proteína termofílica mas no en la mesofílica. Por lo tanto las mutaciones deben tener un efecto desestabilizador.

Las conclusiones obtenidas de estudios previos de dinámica molecular (Feio *et al.*, 2006; Muñoz-López *et al.*, 2010) realizados sobre ambas proteínas, así como la disrupción de posibles núcleos hidrófobos estabilizadores de la proteína termofílica se han tenido en cuenta para decidir los aminoácidos a sustituir en este estudio.

Una breve explicación de la razón de ser de cada mutante se encuentra a continuación.

3.2.1.1 Mutante F3A

Se ha sugerido que la *Pc-Syn*, a alta temperatura, sufre una cierta desestabilización en las dos primeras hebras β . Esta desestabilización conduce a la pérdida de parte de la estructura secundaria de la tercera hebra, con un aumento concomitante de la movilidad de toda esta región (Feio *et al.*, 2006). Por el contrario, la *Pc-Pho* exhibe una mayor estabilidad estructural en esta zona.

La *Pc* termorresistente presenta un residuo fenilalanina en la posición 3 que mantiene contactos de Van der Waals con las cadenas laterales de la Val21 y la Val23 (Figura 16) durante toda la trayectoria, a pesar de la alta movilidad que presentan los residuos 1 y 2. La Phe3 no se conserva en la proteína mesofílica sino que en la posición análoga se encuentra una alanina. Así pues, decidimos producir el mutante F3A, eliminando un residuo que podría ser clave para la motilidad del extremo amino de la proteína termofílica.

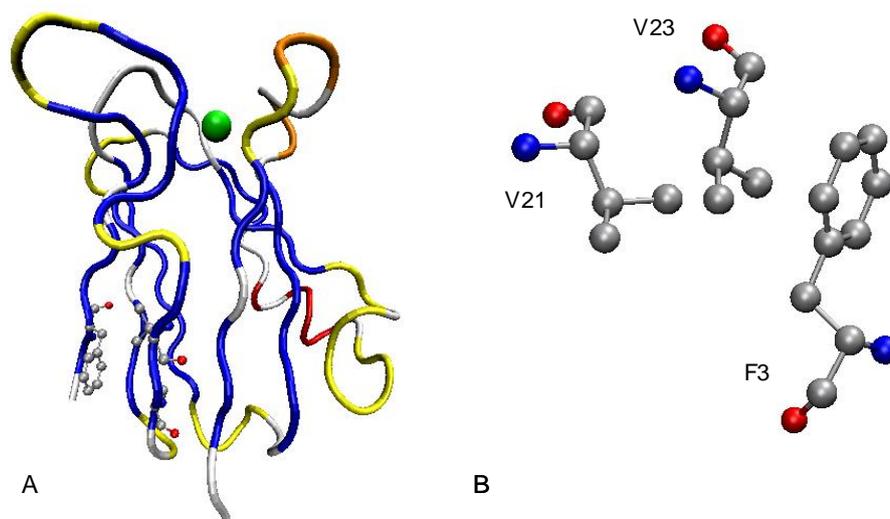


Figura 16. a) Estructura tridimensional de la Pc-Pho (código pdb: 1BAW, Bond *et al.*, 1999). Los residuos Phe3, Val21 y Val23 se representan según el modelo “bolas y palos” (“balls and sticks”). Los elementos de estructura secundaria, determinados con los criterios de Kabsch y Sander, muestran el siguiente código de colores: azul marino, hebras β ; rojo, hélice α ; naranja, hélice 3_{10} ; amarillo, giros; blanco, otras estructuras no regulares (“ovillos”). b) Detalle de la llamada cara Oeste de la Pc en la que los aminoácidos Phe3, Val21 y Val23 interactúan hidrófobamente. Los átomos están coloreados de la siguiente manera: carbono, gris; nitrógeno, azul marino; oxígeno, rojo. Para la representación se utilizó el programa VMD (Humphrey *et al.*, 2003).

3.2.1.2 Mutante doble P49G/ G50P

La Pc posee una pequeña hélice α que forma parte de una protuberancia de la cadena polipeptídica hacia fuera del barril β , flanqueada por las hebras β_5 y β_6 . Esta parte, conocida como cara Este, o Región A en este trabajo, presenta una alta densidad de carga y es responsable de interacciones electrostáticas intermoleculares con su donante y su aceptor de electrones fisiológico. Los análisis de dinámica molecular en esta tesis indican que la Región A es la principal responsable de las diferencias de termoestabilidad entre las dos Pcs. En esta zona la proteína termofílica posee una inserción con respecto a la mesofílica en un giro β tipo II, justo anterior a la hélice α y que conecta a ésta con una hebra β en cuyo extremo se encuentra la His39, que aporta un ligando al átomo de cobre.

Esta inserción contiene una prolina, Pro49, que podría conferir cierta rigidez a la proteína así como estabilizarla por medio de una interacción con la Tyr85 (Figura 17).

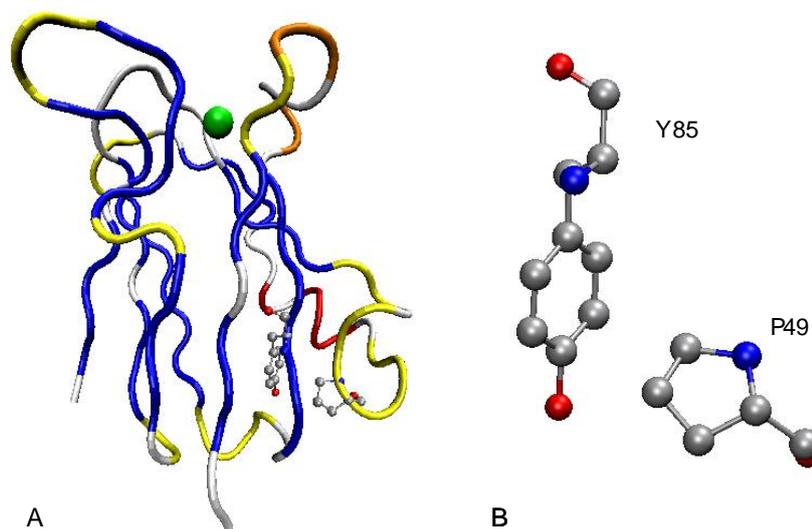


Figura 17. a) Estructura tridimensional de la Pc-Pho (código pdb: 1BAW, Bond *et al.*, 1999). Los residuos Pro49 y Tyr85 se representan según el modelo “bolas y palos” (“balls and sticks”). b) Detalle de los residuos Pro49 y Tyr85 con sus respectivos anillos dispuestos perpendicularmente.

Decidimos producir un mutante doble invirtiendo el orden de la Pro49 y la Gly50, que en el mutante pasan a ser Gly49 y Pro50. La prolina en posición 50 no sería compatible con la conformación de giro β tipo II, aunque permite la presencia de un giro. Se decidió invertir el par Pro-Gly por Gly-Pro, con el fin de mantener la entropía conformacional de la forma desplegada, dadas las restricciones que impone el anillo de pirrolidina a la conformación proteica. En resumen, la doble mutación pretende eliminar la posible interacción entre la Pro49 y la Tyr85, pero afectando en la menor extensión posible a la conformación de la proteína y a la entropía del plegamiento.

3.2.1.3 Mutante F80A

La Pc termorresistente posee una inserción de 4 aminoácidos entre el residuo Phe76 y Pro81. Esta inserción aporta un residuo aromático, la Phe80, que podría ejercer de núcleo de una agrupación hidrófoba que no está presente en la Pc-Syn.

Esta agrupación está formada por la Phe76 y 80, situadas en el barril β de la proteína y dos leucinas de la Región A, la Leu55 en la hélice α y la Leu59 en el lazo consecutivo a dicha hélice (Figura 18). Así pues, este núcleo actúa de interfase entre el barril β y la Región A.

El mutante F80A pretende revelar si la presencia de este agrupamiento puede ser relevante para la estabilidad global de la proteína termofílica.

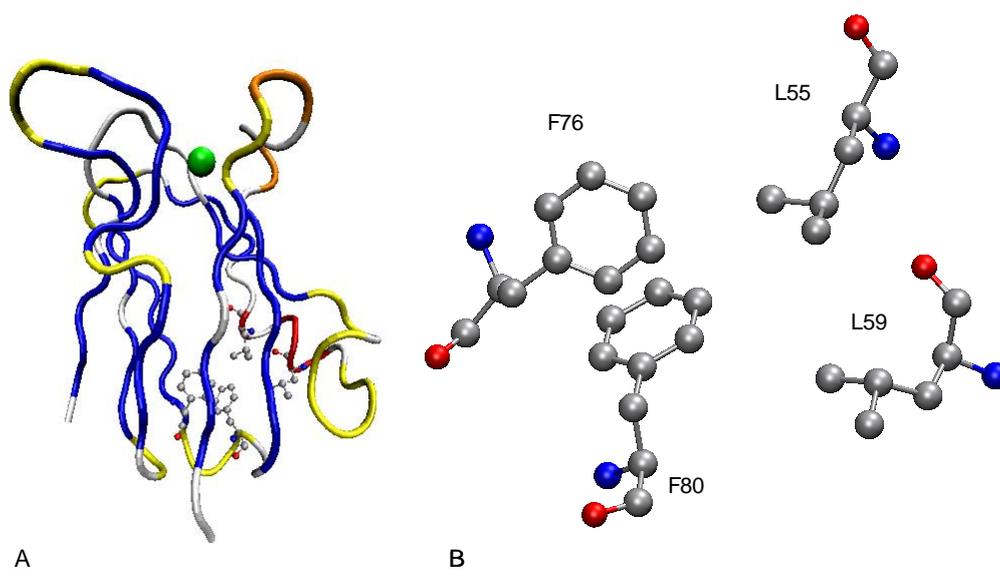


Figura 18. a) Estructura tridimensional de la Pc-Pho (código pdb: 1BAW, Bond *et al.*, 1999). Los residuos Leu55, Leu59, Phe76 y Phe80 se representan según el modelo "bolos y palos" ("balls and sticks"). El área marcada muestra los dos anillos aromáticos de las Phe76 y Phe80 así como la situación de las Leu55 y Leu59 en la cara Este. b) Detalle de los residuos responsables de la agrupación hidrófoba adicional de la Pc termorresistente, a saber: Phe76, Phe80, Leu55 y Leu59.

3.2.2 Pruebas de expresión y producción

Los rendimientos de producción de las pruebas de expresión de la Pc silvestre se muestran en la Tabla 9. Los mejores resultados se obtuvieron con la estirpe BL21 (DE3), al inducir con 1 mM de IPTG una vez transcurridas 6 horas desde el momento en que la densidad óptica del cultivo a 600 nm alcanzó el valor de 0,6. Se obtuvieron resultados similares con las estirpes K12 y MC1061, las cuales no requieren inducción, atenuándose así el coste del experimento, por lo que

se decidió optimizar las producciones en estas dos últimas estirpes. Tras nuevas pruebas, los mejores rendimientos se consiguieron cultivando la estirpe K12 en condiciones microaeróbicas.

Tabla 9. Rendimientos de producción obtenidos con distintas estirpes.

Estirpe	Rendimiento (mg/l)
GM119	0,87
BL21 (DE3)	0,00
K12	1,76
DH5 α	1,05
MC1061	1,33
XL1-Blue	0,00
JM109	0,80
HB101	0,00
CC118 λ_{pir}	0,00
BL21 (DE3) ^{*1}	0,95
BL21 (DE3) ^{*2}	1,30
BL21 (DE3) ^{*3}	2,17

^{*1} Cultivo inducido con IPTG a las 2 horas de que la densidad óptica alcanzase el valor de 0,6.

^{*2} Cultivo inducido con IPTG a las 4 horas de que la densidad óptica alcanzase el valor de 0,6.

^{*3} Cultivo inducido con IPTG a las 6 horas de que la densidad óptica alcanzase el valor de 0,6.

El rendimiento de la producción de la Pc silvestre y sus mutantes en matraces de 5 litros así como el de la producción de la Pc silvestre en volúmenes de 30 litros se resume en la Tabla 10.

Tabla 10. Rendimiento de las producciones de la Pc-*Pho* silvestre y sus mutantes en distintos volúmenes de cultivo y condiciones de aerobividad.; N.D., no detectable.

Proteína	Volumen	Condiciones	Rendimiento (mg L ⁻¹)
Pc WT	5 L	Aeróbicas	6,1
Pc F3A	5 L	Aeróbicas	1,7
Pc P49G/G50P	5 L	Aeróbicas	1,9
Pc F80A	5 L	Aeróbicas	5,5
Pc WT	30 L	Aeróbicas	0,7
Pc WT	30 L	Microaeróbicas	5,9

3.2.3 Purificación

En la Tabla 11 se resumen los datos de recuperación de la plastocianina a lo largo de los distintos pasos de su purificación por la columna de intercambio iónico y tras la purificación por la columna de filtración.

Tabla 11. Porcentajes de recuperación en los pasos de purificación de intercambio iónico y de filtración molecular.

Proteína	II ^a (%)	FL ^b (%)	FL ^c (%)	Global
Pc WT	68	70	--	47,7
Pc F3A	57	81	--	46,7
Pc P49G/G50P	48	85	--	40,8
Pc F80A	90,5	52	64	30,1

^a II: Intercambio iónico.

^b FL: Filtración

^c El mutante F80A precisó de un segundo paso de filtración ya que con el primero sólo se alcanzó una razón de pureza de 3,5.

Las muestras se consideraron puras cuando la razón de pureza, definida como el cociente entre las absorbencias a 280 y 597 nm, alcanzaba el valor de 3, de acuerdo con los coeficientes de extinción de los anillos aromáticos de la proteína a 280 nm, por un lado, y el del cofactor de la misma a 597 nm, por otro (Varley *et al.*, 1995). En el caso del doble mutante P49G/G50P se alcanzó una pureza máxima

de 3,2, sin embargo, la electroforesis en gel de acrilamida teñido con azul coomassie no mostró contaminación alguna (Figura 19). Este cambio en la razón de pureza podría explicarse bien por una variación del coeficiente de extinción del centro metálico en dicho mutante o quizás por la presencia de apoproteína en la muestra.

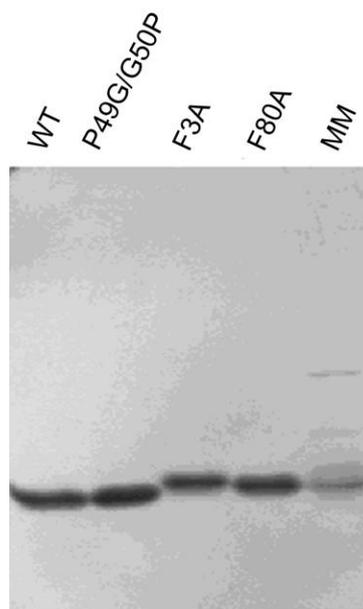


Figura 19. Gel de electroforesis de acrilamida teñido con azul de coomassie. De izquierda a derecha se encuentran la *Pc-Pho*, el mutante P49G/G50P, el mutante F3A, el mutante F80A y finalmente el marcador de peso molecular (MM). En cada pocillo se cargó 10 μ g de proteína.

3.2.4 Determinación de la estructura secundaria por espectroscopia de dicroísmo circular

Con el fin de determinar los posibles cambios en la estructura secundaria de la *Pc-Pho*, inducidos por las mutaciones que en este trabajo se describen, se han obtenido los espectros de CD de la *Pc* silvestre y de los distintos mutantes en sus correspondientes estados reducidos. Si bien el contenido de estructura secundaria ya fue determinado por Bond *et al.* (1999), que resolvieron la estructura de la *Pc-Pho*, decidimos obtener también el espectro de la *Pc-Pho* para validar nuestros resultados. Éstos últimos, como era de esperar, coincidieron con la estructura determinada por difracción de rayos-X por Bond *et al.* (1999). Como se resume en la Tabla 12, no se

encontraron diferencias significativas en la estructura secundaria de la Pc silvestre con respecto a los distintos mutantes salvo en el caso del mutante P49G/G50P. Los ajustes obtenidos muestran que la estructura predominante es la lámina β , como corresponde a una proteína con topología de llave griega, siendo el porcentaje de hélice α inferior al 5%. Estos resultados sugieren que el descenso de estabilidad de los mutantes F3A y F80A no se debe particularmente a cambios en la estructura secundaria del estado plegado, la cual se mantiene inalterada.

En el caso del mutante P49G/G50P, cuyo espectro se compara con el del silvestre en la Figura 20B, los datos indican una pequeña desestabilización del barril β . En dicha figura se aprecia que el mutante en cuestión presenta una menor elipticidad molar a longitudes de onda inferiores a 205 nm, consistente con un aumento de la proporción de estructura irregular a costa de la simultánea pérdida en contenido de hebra β , como se puede apreciar en la Tabla 12. Asimismo se observa que en el mutante el pico negativo a 226 nm se ve desplazado hacia longitudes de onda inferiores mientras que en la región de 230-240 nm se da un aumento de la elipticidad molar.

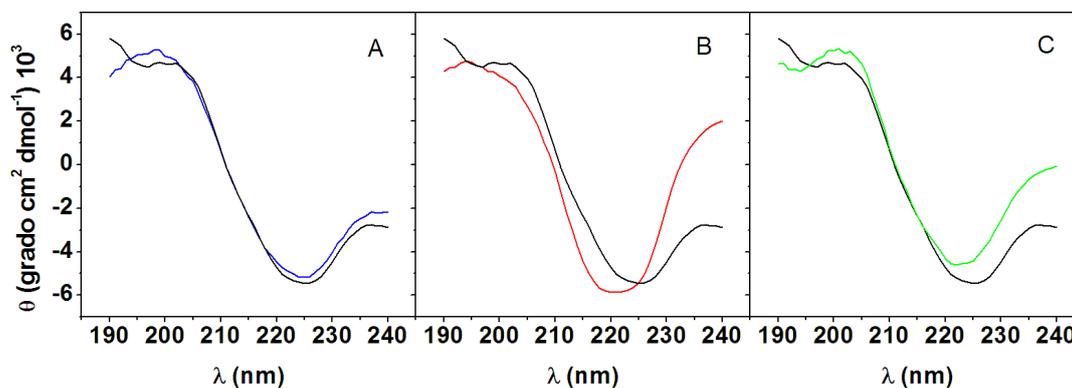


Figura 20. Espectros de CD de la Pc-Pho (negro) y de los mutantes F3A (azul, A), P49G/G50P (rojo, B) y F80A (verde, C) a temperatura ambiente en tampón citrato sódico 2 mM, pH 6, a una concentración final de proteína de 5 μ M. Los espectros se realizaron en una cubeta de 1 mm de paso de luz. Cada espectro es la media de diez barridos completos.

Tabla 12. Porcentajes de estructura secundaria de la *Pc-Pho* y sus mutantes en el estado redox Cu(I). El análisis de los espectros de CD se realizó con el programa CDpro, usando el patrón de referencia SP43 de dicho programa. Los espectros se analizaron en el rango de 190-240 nm.

	Hélice α	Hebra β	Giro	Irregular
<i>Pc-Pho</i>	3,1 \pm 1,0	40,0 \pm 1,1	22,4 \pm 1,2	33,9 \pm 1,4
F3A	3,5 \pm 0,7	38,4 \pm 1,9	23,2 \pm 0,6	35,6 \pm 1,7
P49G/G50P	5,3 \pm 1,2	33,3 \pm 1,2	23,3 \pm 0,7	37,1 \pm 1,5
F80A	3,9 \pm 1,2	41,3 \pm 1,4	21,4 \pm 1,0	32,9 \pm 0,5

En el mutante P49G/G50P se observan pequeñas diferencias en la estructura secundaria, según los ajustes. La disminución en contenido de hebra β puede explicarse por cambios locales en el entorno de la mutación. Concretamente se explicaría por una desestabilización del inicio de la hebra β 8 que hace contacto con la Pro49, y del final de la hebra β 5 donde se inicia el lazo que contiene la mutación.

3.2.5 Determinación del potencial redox

A fin de saber si las mutaciones en la *Pc-Pho* podían afectar en algún modo las propiedades del centro de cobre, decidimos determinar los potenciales redox de la *Pc-Pho* y sus mutantes (Tabla 13 y Figura 21).

Los datos obtenidos para la *Pc-Pho* coinciden con los previamente descritos en la bibliografía (Balme *et al.*, 2001). En el caso de los mutantes, los valores de potencial redox obtenidos se asemejan en gran medida a los de la *Pc-Pho*, presentando pequeñas diferencias que se encuentran en el rango del error experimental de esta determinación.

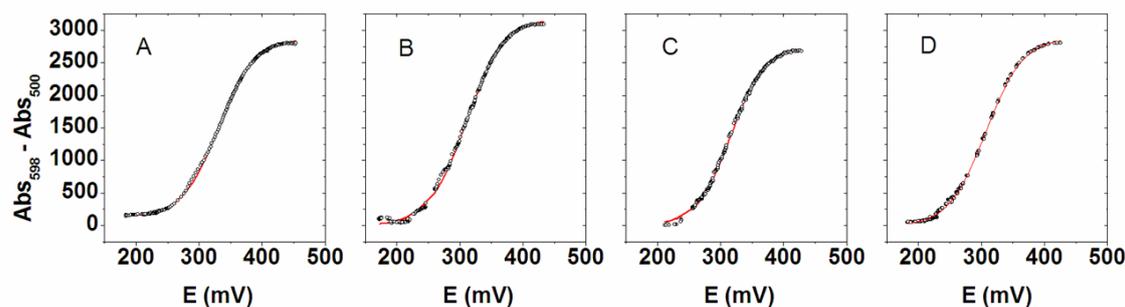


Figura 21. Valoraciones redox de la *Pc-Pho* (A), y sus mutantes F3A (B), P49G/G50P (C) y F80A (D), a una concentración de 6 μM en tampón citrato 50 mM, pH 6, en condiciones de anaerobiosis, siguiendo el método descrito por Ortega *et al.* (1988). Los datos experimentales se muestran como círculos y los ajustes a la ecuación de Nernst mediante líneas rojas.

Tabla 13. Valores del potencial redox de la *Pc-Pho* y sus mutantes.

	<i>Pc-Pho</i>	F3A	P49G/G50P	F80A
E_m (mV)	321 ± 8	311 ± 10	317 ± 14	311 ± 6

3.2.6 Determinación de la temperatura de desnaturalización de la *Pc* mediante espectroscopia de fluorescencia

La espectroscopia de fluorescencia es una técnica útil para el estudio del despliegue proteico debido a la alta sensibilidad de la señal con respecto al entorno de los residuos aromáticos de la proteína. Estos actúan como sondas de los cambios estructurales. La *Pc-Pho* presenta un alto contenido en aminoácidos aromáticos, pero debido a la eficacia de la transferencia de excitación de estos residuos al triptófano y a que el rendimiento cuántico de las fenilalaninas y tirosinas es considerablemente bajo, el espectro de emisión de fluorescencia depende principalmente del residuo Trp31. En el estado nativo, el máximo de emisión se da a 325 nm. El despliegue hace que el triptófano se exponga al disolvente, por lo que se atenúa su emisión y el máximo se ve desplazado a 350 nm. Una curva típica de despliegue siguiendo la emisión del triptófano a 350 nm se muestra en la Figura 22B.

El ajuste de esta curva (Figura 22B) proporciona los valores de temperatura de fusión (T_m) correspondientes a la proteína en cuestión, es decir, la *Pc-Pho* o sus

mutantes. Se ha comprobado que otras técnicas como la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR) o de resonancia paramagnética electrónica (EPR) rinden valores muy parecidos en la determinación de la T_m (Feio *et al.*, 2004). Para cada proteína se hicieron dos medidas independientes. Los promedios de los resultados obtenidos de tales ajustes se resumen en la Figura 23. Según dichos datos, los tres mutantes experimentan una disminución relevante y de magnitud similar en su termoestabilidad, siendo ésta especialmente acusada en el caso de las especies oxidadas, en las que el valor de T_m decrece en torno a unos 10 °C. Las especies reducidas también se desestabilizan pero en menor medida y adquieren un valor de T_m muy próximo al de la Pc mesofílica.

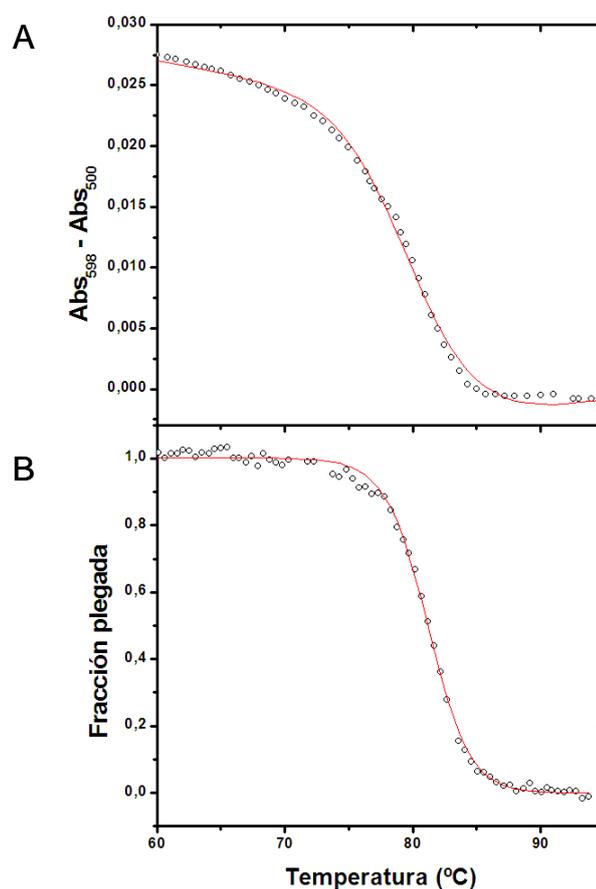


Figura 22. A) Pérdida de la absorbancia visible de la Pc-Pho dependiente de la temperatura. La proteína oxidada en tampón citrato sódico 10 mM, pH 6, fue sometida a un gradiente de temperatura de 1°C min⁻¹. B) Desnaturalización térmica de la Pc-Pho oxidada (25 μM) seguido por fluorescencia de emisión a 350 nm en las condiciones anteriormente mencionadas. En rojo se muestra el ajuste de los datos a la ecuación de Bolen y Santoro (1988).

Al contrario que en la *Pc-Pho*, las diferencias entre las estabildades de los estados reducido y oxidado de los distintos mutantes son pequeñas. No obstante, el mutante que presenta mayor ΔT_m entre ambas especies, el P49G/G50P, es más estable en su estado reducido, al igual que ocurre en la *Pc-Syn* y contrastando con las tendencias exhibidas por la *Pc-Pho* y los demás mutantes (Figura 23). Pensamos que este comportamiento puede deberse o bien a un cierto cambio en la geometría del centro de cobre, ya que el giro en el que se haya la mutación es continuación de la hebra β en cuyo extremo se encuentra la His39 (residuo que aporta un ligando al átomo de cobre), o bien podría ser consecuencia de un cambio de las interacciones electrostáticas entre la cara Este y el átomo de cobre, pues recordamos que esta zona, en la que se encuentra ubicado dicho giro, se caracteriza por una alta densidad de carga.

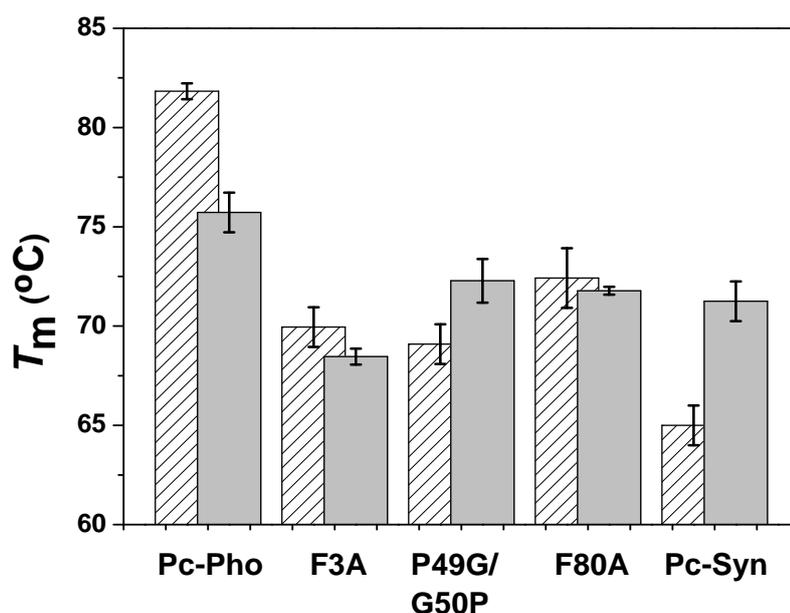


Figura 23. Valores de T_m (°C) correspondientes al despliegue en ambos estados de oxidación de las Pcs silvestres de *Phormidium* (*Pc-Pho*) y *Synechocystis* (*Pc-Syn*) y de los mutantes de *Phormidium*. Las barras en blanco representan las especies oxidadas y las barras en gris las reducidas. Las barras de error representan el error relativo de la media de dos experimentos independientes. *Feio *et al.*, 2006.

3.2.7 Monitorización de la pérdida de absorbancia a 597 nm de la Pc por calentamiento

El átomo de cobre de la Pc se encuentra en una cavidad formada por las hebras β y está separado del solvente mediante el ligando His92. El color azul se asocia a la transferencia de carga ligando-metal entre el S_γ de la Cys89 y el ión de Cu(II), que da lugar a la intensa banda de absorción con un máximo característico a 597 nm ($\epsilon=4,3 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Los cambios estructurales que afectan al centro de cobre se pueden monitorizar siguiendo la absorbancia 597 nm, resultando una curva de desnaturalización similar a la de la Figura 22A. Cabe destacar que no hubo cambio en la longitud de onda del máximo de absorción a lo largo de la rampa de temperatura.

De esta manera hemos determinado el parámetro T_{Cu} que se define como la temperatura a la cual el 50% de la absorbancia inicial a 597 nm se ha perdido. Dicho parámetro se ha determinado en las mismas condiciones experimentales que la T_m , al objeto de que ambos parámetros se pudieran comparar. Tanto la Pc silvestre como los mutantes muestran valores de T_{Cu} iguales o ligeramente inferiores a los de T_m (Figura 24).

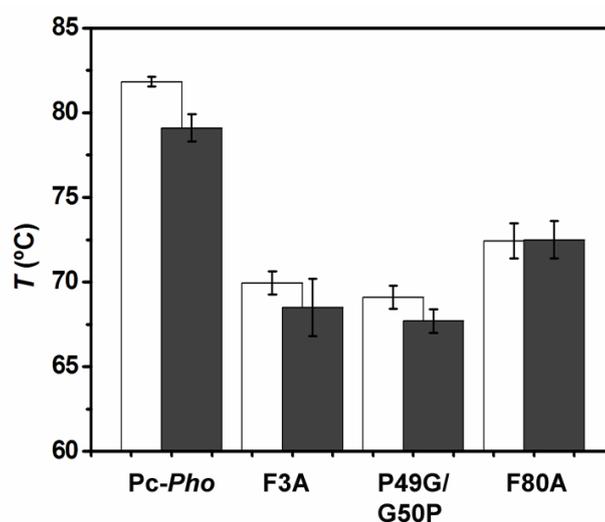


Figura 24. Valores de T_m (blanco) y T_{Cu} (gris oscuro) correspondientes a las especies oxidadas de la Pc silvestre de *Phormidium* (Pc-Pho) y sus mutantes, ambos determinados en las mismas condiciones experimentales. Las barras de error representan el error relativo de la media.

Las diferencias entre los valores de T_m y T_{Cu} son pequeñas, lo cual parece indicar que la disrupción de la conformación nativa del centro de cobre forma parte de un paso ligeramente anterior al despliegue total de la proteína, actuando quizá como desencadenante del mismo. Esta observación corrobora la hipótesis de que el despliegue de la *Pc-Pho* tiene lugar según el modelo de dos estados, pues no existe un tercer estado en el que el centro de cobre se haya desorganizado pero la estructura de la proteína se mantenga inalterada.

3.2.8 Determinación de la estructura del centro de cobre por espectroscopia de dicroísmo circular

Con respecto a la estructura del centro de cobre, Solomon *et al.* (1976) correlacionaron las bandas que aparecen en los espectros de CD y CD magnético con las distintas transferencias de carga entre el átomo de cobre y sus ligandos. En la Figura 25 se muestran los espectros de la *Pc-Pho* y del doble mutante P49G/G50P registrados en la región visible. Se aprecian pequeñas diferencias en las transiciones de transferencia de carga, en concreto en la de la Met a_1 , la His π y la Cys pseudo σ . Esto sugiere que el centro de cobre se puede afectar por las mutaciones y, concretamente, por la P49G/G50P.

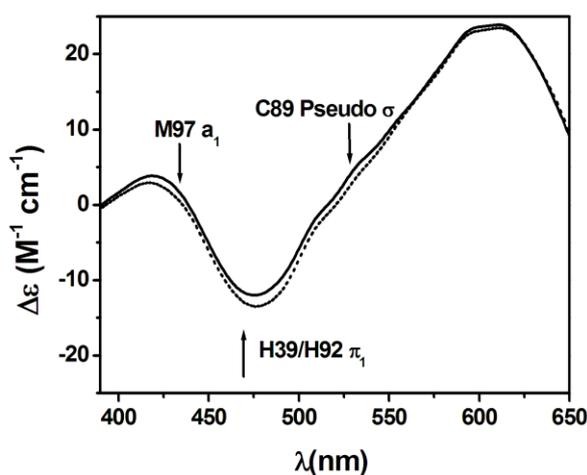


Figura 25. Espectros de dicroísmo circular de la región visible de la *Pc-Pho* (línea continua) y del doble mutante P49G/G50P (línea discontinua). Las flechas indican las distintas transferencias de carga entre los residuos ligandos y el átomo de cobre (Solomon *et al.*, 1976; Gewirth y Solomon, 1988).

Para obtener información precisa sobre la geometría del sitio de cobre recurrimos a la espectroscopia de absorción de rayos-X (XAS).

3.2.9 Determinación de la geometría del centro de cobre mediante espectroscopia de absorción de rayos-X

La Figura 26 muestra una comparación del umbral y la región XANES de la *Pc-Pho*, el mutante P49G/G50P y la *Pc-Syn*, en sus estados oxidados. Los espectros son casi idénticos (Figura 26A) exceptuando el rango entre 9,014 y 9,060 keV de la región XANES (Figura 26B) y las energías de los umbrales (Figura 26C).

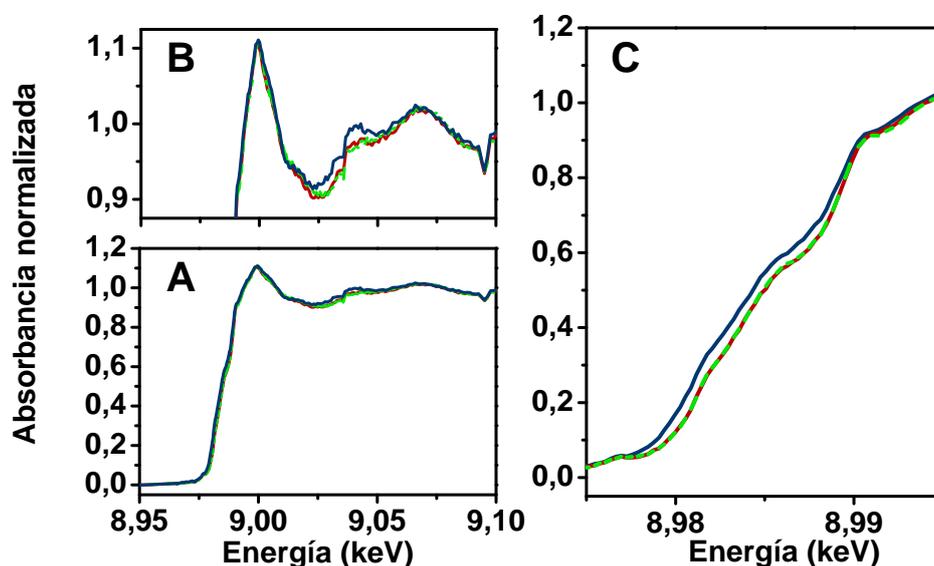


Figura 26. Región XANES y región del umbral de los espectros de rayos-X de absorción de la *Pc-Pho* (azul), el mutante P49G/G50P (rojo) y la *Pc-Syn* (verde). A) Espectros de absorción de rayos-X completos. B) Ampliación de la región XANES. C) Detalles de la región del umbral. La energía se calibró alineando los picos máximos de la primera derivada de los espectros de la lámina de cobre de referencia, los cuales se registraron simultáneamente a los de la muestra de *Pc*.

En la *Pc-Pho*, el umbral se desplaza 0,6 eV hacia energías inferiores con respecto al umbral de la *Pc-Syn*. Sin embargo, los espectros de la *Pc-Syn* y del mutante P49G/G50P coinciden claramente. Este cambio se interpreta como una diferencia en la distribución electrónica del centro de cobre en comparación con las otras dos *Pcs*. No se observó ningún signo de fotorreducción de las muestras durante los experimentos. Sin embargo, para descartar la posibilidad de que la

Pc-Pho fuera más sensible a la radiación y, por tanto, se redujera específicamente, se repitieron los experimentos desenfocando el monocromador y por lo tanto, disminuyendo la intensidad de la luz incidente sobre la muestra. No se observó ningún cambio en el umbral entre los distintos experimentos (Figura 27). Por consiguiente, el cambio del umbral en la *Pc-Pho* viene como consecuencia de una diferencia en la distribución electrónica del centro de cobre en comparación con las otras dos *Pcs*.

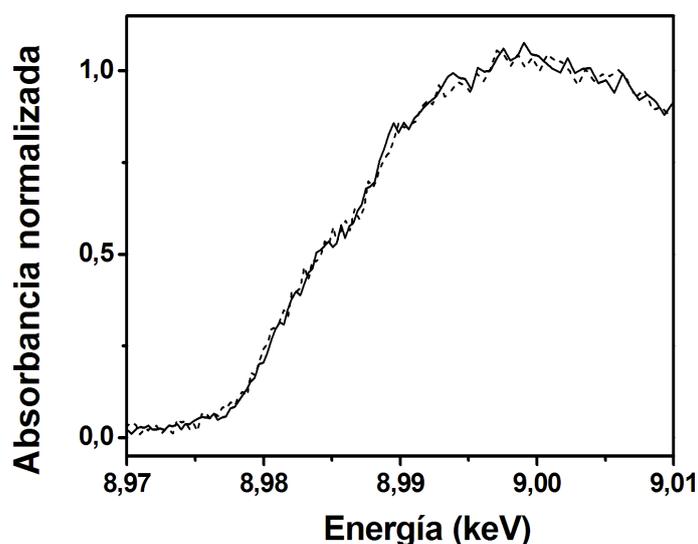


Figura 27. Prueba de desenfoco del monocromador para estudiar la posible fotorreducción de las muestras. Los espectros XANES de la *Pc-Pho* se registraron en condiciones ópticas normales (línea continua) y desenfocando el monocromador (línea discontinua) haciendo que la intensidad de la luz incidente menguase.

Por otro lado, los espectros correspondientes a las especies reducidas son idénticos. Como era de esperar, los umbrales de las formas reducidas se desplazan hacia menores energías, 3,9 eV en la *Pc-Syn* y el mutante P49G/G50P, y 3,3 eV en la *Pc-Pho*, siendo el valor final para las tres proteínas idéntico.

Al contrario de lo que ocurre con las regiones XANES y umbral de los espectros de absorción, las ondas EXAFS de las diferentes muestras son muy parecidas (Figura 28).

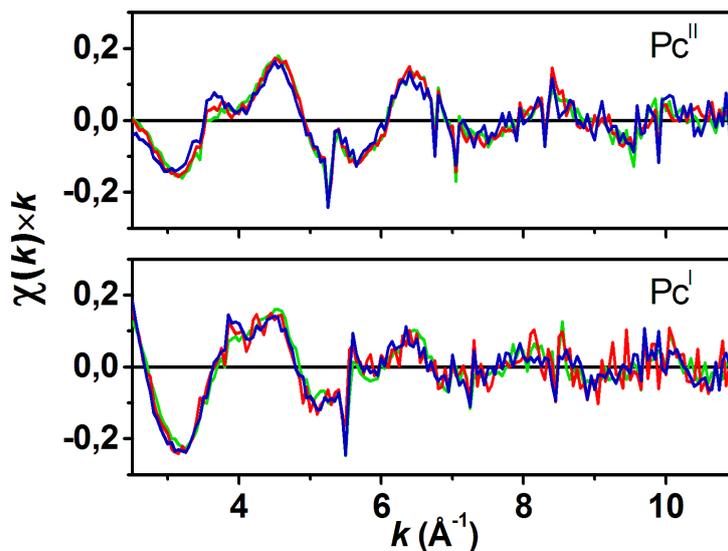


Figura 28. Ondas EXAFS, ponderadas según el valor de k , obtenidas a partir de los espectros de absorción de rayos-X. Los datos correspondientes a la Pc-Pho, el mutante P49G/G50P y la Pc-Syn se muestran en azul, rojo y verde, respectivamente. Las especies oxidadas se encuentran en el panel superior y las reducidas en el inferior.

Por lo tanto, las distancias del átomo de cobre con la primera esfera de ligandos son muy similares en las tres proteínas (Tabla 14).

Un análisis de la región EXAFS se llevó a cabo para caracterizar la geometría del centro de cobre. Inicialmente, se procesaron los datos con diferentes rangos de la señal EXAFS. Sin embargo, la presencia de artefactos en las ondas, así como la pobre relación señal ruido impidió el análisis más allá de $10,3 \text{\AA}^{-1}$. La complejidad de la señal indica que se dan muchas contribuciones de átomos vecinos a diferentes distancias del átomo de cobre. La Figura 29 muestra las transformadas de Fourier de las señales EXAFS ponderadas según el valor de k para las formas de Pc oxidadas y reducidas.

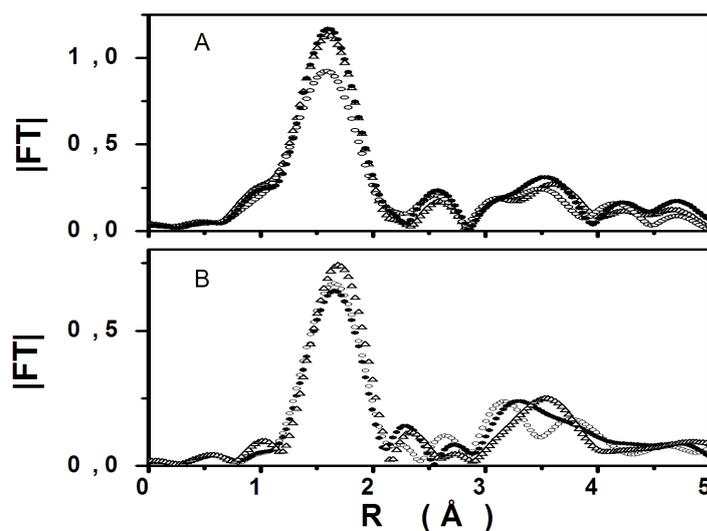


Figura 29. Módulos de las transformadas de Fourier de las ondas EXAFS obtenidas a partir de espectros de absorción en el umbral-K del cobre. Los círculos abiertos, sólidos y los triángulos corresponden a los espectros de las *Pc-Pho*, el mutante P49G/G50P y la *Pc-Syn*, respectivamente. A) Formas oxidadas y B) formas reducidas.

El primer pico es menos intenso en la *Pc-Pho* oxidada que en las demás, lo que sugiere un mayor desorden dinámico en la primera esfera de coordinación del sitio metálico que en la *Pc-Syn* o en el mutante P49G/G50P. Al igual que en la región del umbral, el mutante P49G/G50P se acerca más al comportamiento de la *Pc-Syn* que al de la *Pc-Pho*. Por otro lado, las especies reducidas muestran sólo diferencias ínfimas entre sí.

Las principales señales de la Figura 29 se ajustaron a curvas teóricas, usando el programa Artemis (Ravel y Newville, 2005; Newville, 2001) y coordenadas de difracción de rayos-X de distintas Pcs disponibles en la base de datos PDB (Bernstein *et al.*, 1977). Para ajustar los datos, solamente se consideraron las tres vías de dispersión en las que participan los ligandos ecuatoriales. Se utilizaron dos parámetros para ajustar las distancias de los metales a los ligandos: el primero, Δr_1 , para los átomos de nitrógeno imidazol enlazados al átomo de cobre, y el segundo, Δr_2 , para el átomo de azufre tiolato. Para representar el desorden dinámico, se definió un único parámetro Debye-Waller para los tres ligandos. Los mejores

resultados se obtuvieron con las coordenadas 1BXU (Inoue *et al.*, 1999) o 2Q5B (Bukhman-De Ruyter *et al.*, sin publicar). Las distancias calculadas son idénticas para las tres proteínas. Como cabía esperar, las distancias de las especies oxidadas son más cortas que las de las especies reducidas (Tabla 14). Es de destacar que la especie oxidada de la Pc-*Pho* muestra un mayor desorden en el sitio metálico, según los valores del parámetro de Debye-Waller ($0,005 \pm 0,003$), que las especies oxidadas del mutante P49G/G50P y la Pc-*Syn* ($0,003 \pm 0,003$).

Tabla 14. Parámetros ajustados resultantes del análisis EXAFS de las Pcs recombinantes.

	ΔE_0 (eV)	Distancia del metal al ligando (Å)			σ_{M-L}^2 (Å ²)
		Cu-N $_{\delta_1-Hc}$	Cu-N $_{\delta_1-Hn}$	Cu-S $_{\gamma_1}$	
Cu(II)					
Pc- <i>Pho</i>	0	1,96±0,03	1,93±0,03	2,08±0,03	0,005±0,003
P49G/G50P	0	1,93±0,06	1,90±0,06	2,09±0,06	0,003±0,003
Pc- <i>Syn</i>	0	1,92±0,06	1,89±0,04	2,09±0,05	0,003±0,003
Cu(I)					
Pc- <i>Pho</i>	4	2,08±0,02	2,05±0,02	2,19±0,02	0,007±0,002
P49G/G50P	4	2,08±0,03	2,05±0,03	2,18±0,03	0,007±0,003
Pc- <i>Syn</i>	4	2,06±0,02	2,03±0,02	2,17±0,02	0,006±0,001

Hc se refiere a la His más cercana al extremo C-terminal de la proteína y Hn se refiere a la His más cercana al extremo N-terminal. Los átomos de nitrógeno se asignaron según el modelo estructural de difracción de rayos-X.

S_0^2 , el factor de reducción de amplitud, se fijó a 1 en todos los ajustes; σ^2 es el parámetro de Debye-Waller.

Para las proteínas oxidadas el rango de k fue: 3,3-10,3; el rango de R : 1,1-2,1; los factores R para la Pc-*Pho*, Pc-*Syn* y el mutante P49G/G50P fueron 0,3%, 0,4% y 0,5%, respectivamente. Para las proteínas reducidas el rango de k fue: 2,9-10,2; el rango de R : 1,2-2,1; los factores R fueron del 0,1% o menores en todos los ajustes.

Con el objetivo de seguir indagando en la relación existente entre la distribución electrónica del centro de cobre con la termoestabilidad de las Pcs, estudiamos la fortaleza del enlace Cu-S(tiolato). Para ello intentamos analizar el umbral K del azufre a 2472 eV en el sincrotrón Swiss Light Source (SLS). Desafortunadamente, se encontraron dificultades técnicas que imposibilitaron la

obtención de resultados fiables. En los espectros no se pudo discernir con claridad el pre-pico a 2469 eV correspondiente a los azufres de la proteína que ligan al átomo de Cu (Solomon *et al.*, 2005) y se hallaron señales no esperadas en el intervalo de energías entre 2479 y 2484 eV. Se pensó que la presencia de impurezas de sulfatos podrían estar enmascarando dicho pre-pico y a la vez producir la susodicha señal no esperada (Sekiyama *et al.*, 1986). Sin embargo, el lavado exhaustivo de muestras y celdas, así como el ensayo de distintos materiales en los diferentes componentes de la celda, no impidió una mejora substancial de los resultados (Figura 30). Por último, el uso de condiciones anaeróbicas que impidiese la aparición de sulfonas y sulfóxidos, debido a la posible oxidación de los residuos metionina, tampoco contribuyó a la mejora del espectro.

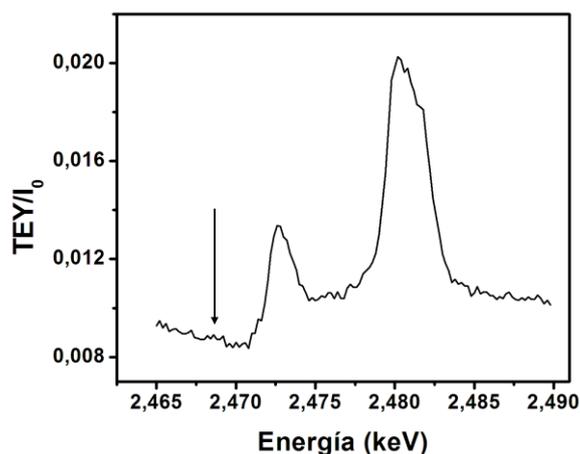


Figura 30. Región XANES y del pre-pico del espectro del umbral-K del azufre de la Pc-Syn. Se indica la posición del pre-pico (2469 eV) que debería aparecer en las BCPs. Por otro lado, también se observa una señal muy intensa a 2480 eV no identificada en la literatura existente.

4. DISCUSIÓN

En la primera parte de este trabajo hemos comparado simulaciones de dinámica molecular de la Pc termofílica de *Phormidium* con la Pc análoga de la cianobacteria menos termorresistente *Synechocystis*. El objetivo de esta comparación ha sido identificar los factores estructurales responsables de las distintas termoestabilidades de ambas proteínas.

Nuestros datos muestran resultados parecidos a los obtenidos con otros pares o conjuntos de proteínas: un mayor número de enlaces de hidrógeno y puentes salinos así como una mejor relación entre la SAS apolar y polar en la Pc-*Pho*, características propias de las proteínas termofílicas. De igual forma, así como se ha descrito en la literatura, no existe un solo factor estructural o interacción intramolecular responsable de la mayor termoestabilidad de la Pc-*Pho*, sino que más bien se da una combinación de factores estructurales que favorecen la estabilidad térmica (Matthews *et al.*, 1974, Kumar *et al.*, 2000). Por otro lado, es de destacar que los resultados de la comparación de la Pc-*Pho* y la Pc-*Syn* no siempre siguen los patrones típicos de la estabilidad térmica. De hecho, la secuencia de la Pc-*Pho* es más larga que la de la Pc-*Syn*, presentado aquélla dos inserciones en los lazos L₅ y L₇. Esta observación contrasta con la tendencia general de las proteínas termofílicas que suelen ser más cortas, y con lazos más pequeños, que sus análogas mesofílicas (Thompson y Eisenberg, 1999). Además, tampoco se aprecia ninguna diferencia en la proporción de residuos polares cargados y no cargados en las dos Pcs, a diferencia de lo que Kumar *et al.* (2000) y Sadeghi *et al.* (2006) concluyen al comparar secuencias mesofílicas y termofílicas.

Los resultados obtenidos sí muestran que las mayores diferencias entre parámetros relacionados con la termoestabilidad de estas Pcs se concentran en zonas específicas de la proteína, como la Región A y el lazo L₇. El papel de la Región A en la estabilidad de Pc-*Pho*, propuesto en esta tesis, podría ser complementario al papel que esta región también toma en la interacción fisiológica de la Pc con sus parejas de interacción fisiológica, el citocromo *f* y el fotosistema I. A diferencia de otras plastocianinas, en la Pc-*Pho* la Región A no contacta con el dominio menor de dicho

citocromo mediante interacciones electrostáticas de largo alcance (Crowley *et al.*, 2004; Díaz-Moreno *et al.*, 2005; Díaz-Quintana *et al.*, 2008). Así, la evolución de esta región podría haber sido afectada por la optimización de la estabilidad y la funcionalidad de la proteína.

En la segunda parte de esta tesis, hemos producido proteínas mutantes de la Pc-Pho, con el objeto de complementar los datos teóricos, así como de investigar la relación entre el estado redox del centro de cobre y la termoestabilidad. Estudios previos (Gross *et al.*, 1992) indicaban que la Pc reducida debería ser más termoestable que la oxidada debido a dos factores: en primer lugar el elevado coste energético de pasar una carga supuestamente solvatada, como sería el caso del estado desplegado, a un medio de baja constante dieléctrica como el del interior de una proteína plegada; en segundo lugar la observación de que el ión Cu(II) en complejos orgánicos prefiere un entorno tetragonal, con 5 o 6 ligandos, en vez de una geometría tetraédrica distorsionada como presenta en la Pc, por lo que la matriz proteica estaría forzando la geometría de coordinación del ión Cu(II). Este último argumento fue discutido por Ryde *et al.* (2000), mediante simulaciones del centro de cobre en vacío, desmintiendo que el Cu(II) prefiriese una geometría tetragonal en vez de una geometría trigonal piramidal. Sin embargo, posteriormente Jaszewski y Jezierska (2001) pusieron de manifiesto la importancia de la segunda o incluso tercera esfera de ligandos en las propiedades electrónicas y estructurales de las cupredoxinas, por lo que cabe la posibilidad de que los modelos usados por Ryde estuvieran excesivamente simplificados.

Como punto de partida de nuestra investigación utilizamos las simulaciones de MD anteriormente comentadas, así como las efectuadas por Feio *et al.* (2006). En éstas, las hebras $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ y $\beta 6$ son las primeras en sufrir un cambio conformacional al elevarse la temperatura. Así pues, los mutantes F3A, P49G/G50P y F80A, localizados en las proximidades de dichas hebras, podrían facilitar el despliegue proteico al favorecer el cambio conformacional de estas hebras a alta temperatura.

En el doble mutante P49G/G50P, se da un cambio en la termoestabilidad de la Pc que se debe simplemente al desplazamiento de la Pro49 a la posición 50 y de la Gly50 a la posición 49, sin que se modifique la composición de la secuencia primaria. Por lo tanto, estos datos dejan ver que la distribución de los aminoácidos en la proteína juega un papel fundamental en la estabilidad de la misma. Según los datos de CD, en dicho mutante se observa una ligera disminución de su contenido de hebra β a temperatura ambiente que podría explicar el descenso de la T_m . También, como se explica en la sección 3.2.1.2, en este mutante se interrumpe la interacción entre la Pro49 de la Región A y la Tyr85 del barril β , por lo que el alto grado de conectividad entre los lazos 5 y 7, presentes también en esta interfase barril β /Región A, debería decrecer, produciendo una disminución de la termoestabilidad de la proteína.

Por otra parte, en este doble mutante se revierte el efecto que ejerce el estado redox del metal en la T_m , comportándose de una forma más parecida a la Pc-Syn que a la Pc-Pho. La mutación, situada en la Región A, se encuentra a 20 Å del centro de cobre y podría modificar en alguna manera las propiedades del centro metálico. En la bibliografía se encuentran estudios de dinámica molecular, realizados con un mutante de la Pc de álamo, que explican cómo los efectos de la mutación insertada (introducción de un puente disulfuro), en términos del patrón de los enlaces de hidrógenos y de la flexibilidad de la Pc, se manifiestan en la región opuesta a la zona donde se localiza la misma (Ciochetti *et al.*, 1997; Arcangeli *et al.*, 2001). Esto concuerda con la idea desarrollada por Sturtevant (1994) de que la naturaleza cooperativa del plegamiento puede causar la transmisión del efecto energético de una mutación simple a lo largo de toda la proteína. Así también se conocen mutaciones de carga en la superficie proteica que afectan a la geometría de los sitios catalíticos de las BCP (Sato y Dennison, 2002).

En cuanto a los estudios de XAS, cabe mencionar que el desplazamiento a una menor energía del umbral de excitación de la Pc-Pho con respecto al umbral de la Pc-Syn es coherente con las cargas atómicas calculadas en este trabajo, siendo el

estado de oxidación del átomo de Cu menor en la *Pc-Pho* (0,140) que en la *Pc-Syn* (0,291). Cabe destacar que el S_{γ} del ligando cisteína muestra un comportamiento opuesto. Posiblemente, esto sugiere una menor donación de electrones de la cisteína al átomo de cobre en el enlace dativo. La región umbral de los espectros de XAS dan información de la distribución de densidad electrónica del centro metálico. Teniendo en cuenta las especies oxidadas, dicha distribución en el caso del mutante P49G/G50P es más parecida a la de *Pc-Syn* que a la de la *Pc-Pho*, al igual que sucede con la T_m de dicho mutante, por lo que se sugiere una correlación entre la distribución de densidad electrónica del centro metálico y la termoestabilidad de la proteína. Por otro lado, en el mutante P49G/G50P se observa una bajada del desorden de la primera esfera de coordinación del átomo de cobre oxidado, por lo tanto, las propiedades de los enlaces de dicha esfera están modulados por regiones remotas de la proteína, como podría ser la región donde se insertó dicha mutación. Los espectros de XAS de las especies reducidas son casi idénticos en las tres proteínas. Esta pequeña variación está correlacionada con el pequeño descenso de la T_m de las especies reducidas de las Pcs mutantes, a diferencia de las oxidadas.

Por último, también cabe la posibilidad de que la doble mutación afecte al estado energético de las especies desplegadas. Sin embargo, no esperamos que pequeños cambios en el estado desplegado contribuyan a la disminución de T_m del mutante P49G/G50P, dada la diversidad y dinámica de las conformaciones del mismo.

Para resumir, en este trabajo se propone la idea de que la Región A, con un papel funcional en las Pcs, también posee un papel determinante en su estabilidad. Así pues, el modelo de interacción de la Pc con el citocromo *f* podría ser consecuencia o estar afectado en cierto grado por la optimización de la estabilidad en dicha zona. También destacamos que en las Pcs (proteínas pequeñas con una estructura predominante de hoja β) mutaciones o cambios puntuales pueden afectar de forma drástica las propiedades del centro activo en el estado nativo y por último,

sugerimos un estudio más detallado del centro de Cu en su estado desplegado para entender los fundamentos de la estabilidad de estas proteínas.

Actualmente, Estrella Frutos, compañera de nuestro equipo de investigación, está desarrollando un proyecto en el que, basándose en los datos aquí expuestos, se pretende estabilizar la Pc-Syn. El resultado de sus indagaciones ayudará a resolver las incógnitas que esta tesis plantea.

5. CONCLUSIONES

Conclusiones:

- Según los cálculos de dinámica molecular, la zona con menor identidad de secuencia, denominada en este trabajo Región A, donde se encuentran las hebras $\beta 5$ y $\beta 6$, el lazo L_5 y la hélice α , es responsable de la diferencia de termoestabilidad entre las dos plastocianinas estudiadas.
- La mayor estabilidad de la plastocianina de *Phormidium laminosum* no es producto de una interacción puntual sino de la optimización conjunta de interacciones electrostáticas, hidrófobas y enlaces de hidrógeno en dicha región.
- Mutaciones neutras y distantes al centro de cobre, como la mutación P49G/G50P en la plastocianina de *Phormidium laminosum*, pueden afectar a la modulación que éste ejerce sobre la estabilidad de las plastocianinas.
- La estabilidad térmica y la distribución de carga en el centro metálico de las especies oxidadas muestran una mayor sensibilidad que las especies reducidas con respecto a mutaciones remotas en la matriz proteica.

6. BIBLIOGRAFÍA

Adelman, S.A. y Doll, J.D. (1976) Generalized Langevin Equation Approach for Atom-Solid-Surface Scattering - General Formulation for Classical Scattering Off Harmonic Solids. *J Chem Phys* 64, 2375-2388.

Adman, E. T. (1991) Copper protein structures. *Adv Protein Chem* 42, 145-197.

Alcaraz, L. A. y Donaire, A. (2004) Unfolding process of rusticyanin - Evidence of protein aggregation. *Eur J Biochem* 271, 4284-4292.

Arcangeli, C., Bizzarri, A. R. y Cannistraro, S. (2001) Concerted motions in copper plastocyanin and azurin: an essential dynamics study. *Biophys Chem* 90, 45-56.

Archer, D. G. y Wang, P. (1990) The Dielectric Constant of Water and Debye-Hückel Limiting Law Slopes. *J Phys Chem Ref Data* 19, 371-411.

Argos, P., Rossmann, M. G., Grau, U. M., Zuber, H., Frank, G. y Tratschin, J. D. (1979) Thermal stability and protein structure. *Biochemistry* 18, 5698-5703.

Bai, Y. W., Milne, J. S., Mayne, L. y Englander, S. W. (1993) Primary Structure Effects on Peptide Group Hydrogen-Exchange. *Prot-Struct Funct Genet* 17, 75-86.

Baker, D. (2000) A surprising simplicity to protein folding. *Nature* 405, 39-42.

Balme, A., Hervás, M., Campos, L. A., Sancho, J., De la Rosa, M. A. y Navarro, J. A. (2001) A comparative study of the thermal stability of plastocyanin, cytochrome c(6) and Photosystem I in thermophilic and mesophilic cyanobacteria. *Photosynth Res* 70, 281-289.

- Barrat, A., Barthelemy, M., Pastor-Satorras, R. y Vespignani, A. (2004) The architecture of complex weighted networks. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 3747-3752.
- Bayly, C. I., Cieplak, P., Cornell, W. D. y Kollman, A. (1993) A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *J Phys Chem* 97, 10269-10280.
- Becktel, W. J. y Schellman, J. A. (1987) Protein stability curves. *Biopolymers* 26, 1859-1877.
- BenTal, N., Sitkoff, D., Topol, I. A., Yang, A. S., Burt, S. K. y Honig, B. (1997) Free Energy of Amide Hydrogen Bond Formation in Vacuum, in Water, and in Liquid Alkane Solution. *J Phys Chem B* 101, 450-457.
- Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., Vangunsteren, W. F., Dinola, A., y Haak, J. R. (1984) Molecular-Dynamics with Coupling to an External Bath. *J Chem Phys* 81, 3684-3690.
- Berendsen, H. J. C., Vanderspoel, D. y Vandrunen, R. (1995) Gromacs - a Message-Passing Parallel Molecular-Dynamics Implementation. *Comput Phys Commun* 91, 43-56.
- Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J., Meyer, E. F. Jr., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T. y Tasumi, M. (1977) The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J Mol Biol* 112, 535-542.

Bertini, I., Ciurli, S., Dikiy, A., Fernandez, C. O., Luchinat, C., Safarov, N., Shumilin, S. y Vila, A. J. (2001) The first solution structure of a paramagnetic copper(II) protein: the case of oxidized plastocyanin from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *J Am Chem Soc* 123, 2405-2413.

Bond, C. S., Bendall, D. S., Freeman, H. C., Guss, J. M., Howe, C. J., Wagner, M. J. y Wilce, M. C. J. (1999) The structure of plastocyanin from the cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *Acta Crystallogr, Sect D* 55, 414-421.

Brandts, J. F. (1967) en *Thermobiology*. Rose, A. H., ed.; Academic Press, New York.

Britton, K. L., Baker, P. J., Borges, K. M., Engel, P. C., Pasquo, A., Rice, D. W., Robb, F. T., Scandurra, R., Stillman, T. J. y Yip, K. S. (1995) Insights into thermal stability from a comparison of the glutamate dehydrogenases from *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. *Eur J Biochem* 229, 688-95.

Brown, L. R., Demarco, A., Richarz, R., Wagner, G. y Wuthrich, K. (1978) Influence of a Single Salt Bridge on Static and Dynamic Features of Globular Solution Conformation of Basic Pancreatic Trypsin-Inhibitor - H-1 and C-13 Nmr-Studies of Native and Transaminated Inhibitor. *Eur J Biochem* 88, 87-95.

Cambillau, C. y Claverie, J. M. (2000) Structural and genomic correlates of hyperthermostability. *J Biol Chem* 275, 32383-32386.

Catanzano, F., Graziano, G., Capasso, S. y Barone, G. (1997) Thermodynamic analysis of the effect of selective monodeamidation at asparagine 67 in ribonuclease A. *Protein Sci* 6, 1682-93.

Chakravarty, S. y Varadarajan, R. (2002) Elucidation of factors responsible for enhanced thermal stability of proteins: a structural genomics based study. *Biochemistry* 41, 8152-61.

Chothia, C. (1974) Hydrophobic Bonding and Accessible Surface-Area in Proteins. *Nature* 248, 338-339.

Chothia, C. (1975) Structural Invariants in Protein Folding. *Nature* 254, 304-308.

Ciocchetti, A., Bizzarri, A. R. y Cannistraro, S. (1997) Long-term molecular dynamics simulation of copper plastocyanin in water. *Biophys Chem* 69, 185-198.

Co, M. S. y Hodgson, K. O. (1984) en *Copper Proteins and Copper Enzymes*. Lontie, R., ed.; CRC Press, California.

Colman, P. M., Freeman, H. C., Guss, J. M., Murata, M., Norris, V. A., Ramshaw, J. A. M. y Venkatappa, M. P. (1978) X-Ray Crystal-Structure Analysis of Plastocyanin at 2.7 Å Resolution. *Nature* 272, 319-324.

Comba, P. y Remenyi, R. (2002) A new molecular mechanics force field for the oxidized form of blue copper proteins. *J Comput Biol* 23, 697-705.

Creighton, T. E. (1983) An Empirical-Approach to Protein Conformation Stability and Flexibility. *Biopolymers* 22, 49-58.

Creighton, T. E. (1990) Protein Folding. *Biochem J* 270, 1-16.

Creighton, T. E. (1997) *Proteins: structures and molecular properties*. 2a ed. W. H. Freeman & Company.

Crowley, P. B., Hunter, D. M., Sato, K., McFarlane, W. y Dennison, C. (2004) The parsley plastocyanin-turnip cytochrome *f* complex: a structurally distorted but kinetically functional acidic patch. *Biochem J* 378, 45-51.

Darden, T., York, D. y Pedersen, L. (1993) Particle Mesh Ewald - an N.Log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems. *J Chem Phys* 98, 10089-10092.

DeBeer, S., Randall, D. W., Nersissian, A. M., Valentine, J. S., Hedman, B., Hodgson, K. O. y Solomon, E. I. (2000) X-ray absorption edge and EXAFS studies of the blue copper site in stellacyanin: Effects of axial amide coordination. *J Phys Chem B* 104, 10814-10819.

DeBeer, S., Wittung-Stafshede, P., Leckner, J., Karlsson, G., Winkler, J. R., Gray, H. B., Malmstrom, B. G., Solomon, E. I., Hedman, B. y Hodgson, K. O. (2000) X-ray absorption spectroscopy of folded and unfolded copper(I) azurin. *Inorg Chim Acta* 297, 278-282.

deGroot, B. L., vanAalten, D. M. F., Amadei, A. y Berendsen, H. J. C. (1996) The consistency of large concerted motions in proteins in molecular dynamics simulations. *Biophys J* 71, 1707-1713.

Dewar, M. J. S., Zoebisch, E. G., Healy, E. F. y Stewart, J. J. P. (1985) The Development and Use of Quantum-Mechanical Molecular-Models .76. Am1 - a New General-Purpose Quantum-Mechanical Molecular-Model. *J Am Chem Soc* 107, 3902-3909.

Díaz-Moreno, I., Díaz-Quintana, A., Díaz-Moreno, De la Rosa, M. A., Crowley, P. B. y Ubbink, M. (2005) Different modes of interaction in cyanobacterial complexes of plastocyanin and cytochrome *f*. *Biochemistry* 44, 3176-3183.

Díaz-Moreno, I., Díaz-Quintana, A., Díaz-Moreno, S., Subías, G., y De la Rosa, M. A. (2006) Transient binding of plastocyanin to its physiological redox partners modifies the copper site geometry. *FEBS Lett* 580, 6187-6194.

Díaz-Moreno, I., Muñoz-López, F. J., Frutos-Beltrán, E., De la Rosa, M. A. y Díaz-Quintana, A. (2009) Electrostatic strain and concerted motions in the transient complex between plastocyanin and cytochrome *f* from the cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *Bioelectrochemistry* 77, 43-52.

Díaz-Quintana, A., Navarro J. A., Hervás, M., Molina-Heredia, F. P., De la Cerda, B. y De la Rosa, M. A. (2003) A comparative structural and functional analysis of cyanobacterial plastocyanin and cytochrome *c6* as alternative electron donors to Photosystem I. *Photosynth Res* 75, 97–110.

Díaz-Quintana, A., Hervás, M., Navarro, J.A. y De la Rosa, M.A. (2008) en *Structure of Photosynthetic Proteins*. Fromme, P., ed.; Wiley-VCH, Weinheim.

Diao, Y., Ma, D., Wen, Z., Yin, J., Xiang, J. y Li, M. (2008) Using pseudo amino acid composition to predict transmembrane regions in protein: cellular automata and Lempel-Ziv complexity. *Amino Acids* 34, 111-117.

Dill, K. A. (1990) Dominant forces in protein folding. *Biochemistry* 29, 7133-7155.

- Durley, R., Chen, L. Y., Mathews, F. S. y Davidson, V. L. (1993) Crystal-Structure Analysis of Amicyanin and Apoamicyanin from *Paracoccus-Denitrificans* at 2.0-Angstrom and 1.8-Angstrom Resolution. *Protein Sci* 2, 739-752.
- Ellis, P. J. (1995) Studies of Metalloproteins using EXAFS and XRD. Thesis, University of Sydney.
- Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M. L., Darden, T., Lee, H. y Pedersen, L. G. (1995) A Smooth Particle Mesh Ewald Method. *J Chem Phys* 103, 8577-8593.
- FarzadFard, F., Gharaei, N., Pezeshk, H. y Marashi, S.-A. (2008) β -Sheet capping: Signals that initiate and terminate [beta]-sheet formation. *J Struct Biol* 161, 101-110.
- Feio, M. J., Navarro, J. A., Teixeira, M. S., Harrison, D., Karlsson, B. G. y De la Rosa, M. A. (2004) A thermal unfolding study of plastocyanin from the thermophilic cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *Biochemistry* 43, 14784-14791.
- Feio, M. J., Diaz-Quintana, A., Navarro, J. A. y De la Rosa, M. A. (2006) Thermal unfolding of plastocyanin from the mesophilic cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803 and comparison with its thermophilic counterpart from *Phormidium laminosum*. *Biochemistry* 45, 4900-4906.
- Fersht, A. (1998) Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding. W. H. Freeman Company.
- Fersht, A. R. (1971) Conformational Equilibria and Salt Bridge in Chymotrypsin. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 36, 71-73.

Fersht, A. R. (1972) Conformational Equilibria in Alpha-Chymotrypsin and Delta-Chymotrypsin - Energetics and Importance of Salt Bridge. *J Mol Biol* 64, 497-509.

Fields, P. A. (2001) Review: Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 129, 417-31.

Finkelstein, A. V. (2004) Physics of protein folding. *Phys Life Rev* 1, 23-56.

Floriano, W. B., Domont, G. B. y Nascimento, M. A. C. (2007) A molecular dynamics study of the correlations between solvent-accessible surface, molecular volume, and folding state. *J Phys Chem B* 111, 1893-1899.

Frank, H. S. y Evans, M. W. (1945) Free Volume and Entropy in Condensed Systems .3. Entropy in Binary Liquid Mixtures - Partial Molal Entropy in Dilute Solutions - Structure and Thermodynamics in Aqueous Electrolytes. *J Chem Phys* 13, 507-532.

Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Montgomery, J. A., Jr., Vreven, T., Kudin, K. N., Burant, J. C., Millam, J. M., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Barone, V., Mennucci, B., Cossi, M., Scalmani, G., Rega, N., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Klene, M., Li, X., Knox, J. E., Hratchian, H. P., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Ayala, P. Y., Morokuma, K., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Zakrzewski, V. G., Dapprich, S., Daniels, A. D., Strain, M. C., Farkas, O., Malick, D. K., Rabuck, A. D., Raghavachari, K., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cui, Q., Baboul, A. G., Clifford, S., Cioslowski, J., Stefanov, B. B., Liu, G., Liashenko, A., Piskorz, P.,

Komaromi, I., Martin, R. L., Fox, D. J., Keith, T., Al-Laham, M. A., Peng, C. Y., Nanayakkara, A., Challacombe, M., Gill, P. M. W., Johnson, B., Chen, W., Wong, M. W., Gonzalez, C. y Pople, J. A. (2004) Gaussian 03, Revision C.02. *Gaussian, Inc., Wallingford CT.*

Garrett, T. P. J., Clingeffer, D. J., Guss, J. M., Rogers, S. J. y Freeman, H. C. (1984) The Crystal-Structure of Poplar Apoplastocyanin at 1.8-Å Resolution - the Geometry of the Copper-Binding Site Is Created by the Polypeptide. *J Biol Chem* 259, 2822-2825.

George, S. J., Lowery, M. D., Solomon, E. I. y Cramer, S. P. (1993) Copper L-Edge Spectral Studies - a Direct Experimental Probe of the Ground-State Covalency in the Blue Copper Site in Plastocyanin. *J Am Chem Soc* 115, 2968-2969.

Gewirth, A. A. y Solomon, E. I. E.I. (1988) Electronic structure of plastocyanin – excited state spectral features. *J Am Chem Soc* 110, 3811-3819.

Goldenberg, D. P. y Creighton, T. E. (1985) Energetics of Protein-Structure and Folding. *Biopolymers* 24, 167-182.

Gray, H. B., Malmstrom, B. G. y Williams, R. J. P. (2000) Copper coordination in blue proteins. *J Biol Inorg Chem* 5, 551-559.

Gromiha, M. M., Oobatake, M. y Sarai, A. (1999) Important amino acid properties for enhanced thermostability from mesophilic to thermophilic proteins. *Biophys Chem* 82, 51-67.

Gross, E. L., Draheim, J. E., Curtiss, A. S., Crombie, B., Scheffer, A., Pan, B., Chiang, C. y Lopez, A. (1992) Thermal denaturation of plastocyanin: the effect of oxidation state, reductants, and anaerobicity. *Arch Biochem Biophys* 298, 413-419.

Guckert, J. A., Lowery, M. D. y Solomon, E. I. (1995) Electronic-Structure of the Reduced Blue Copper Active-Site - Contributions to Reduction Potentials and Geometry. *J Am Chem Soc* 117, 2817-2844.

Gunner, M. R., Saleh, M. A., Cross, E., ud-Doula, A. y Wise, M. (2000) Backbone Dipoles Generate Positive Potentials in all Proteins: Origins and Implications of the Effect. *Biophys J* 78, 1126-1144.

Guss, J. M., Bartunik, H. D. y Freeman, H. C. (1992) Accuracy and precision in protein structure analysis: restrained least-squares refinement of the structure of poplar plastocyanin at 1.33 Å resolution. *Acta Crystallogr B* 48 (Pt 6), 790-811.

Guzzi, R., Andolfi, L., Cannistraro, S., Verbeet, M. P., Canters, G. W. y Sportelli, L. (2004) Thermal stability of wild type and disulfide bridge containing mutant of poplar plastocyanin. *Biophys Chem* 112, 35-43.

Guzzi, R., Sportelli, L., La Rosa, C., Milardi, D., Grasso, D., Verbeet, M. P. y Canters, G. W. (1999) A spectroscopic and calorimetric investigation on the thermal stability of the Cys3Ala/Cys26Ala azurin mutant. *Biophys J* 77, 1052-1063.

Haehnel, W., Jansen, T., Gause, K., Klösgen, R. B., Stahl, B., Mich, D., Huvermann, B., Karas, M. y Herrmann, R. G. (1994) Electron transfer from plastocyanin to Photosystem I. *EMBO J* 13, 1028–1038.

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166, 557-580.

Hol, W. G., Halie, L. M. y Sander, C., 1981. Dipoles of the alpha-helix and beta-sheet: their role in protein folding. *Nature* 294, 532–536.

Hope, A. B. (2000) Electron transfers amongst cytochrome f, plastocyanin and photosystem I: kinetics and mechanisms. *Biochim Biophys Acta, Bioenerg* 1456, 5-26.

Horovitz, A., Serrano, L., Avron, B., Bycroft, M. y Fersht, A. R. (1990) Strength and co-operativity of contributions of surface salt bridges to protein stability. *J Mol Biol* 216, 1031-1044.

Ikai, A. (1980) Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *J Biochem* 88, 1895-1898.

Inoue, T., Gotowda, M., Sugawara, H., Kohzuma, T., Yoshizaki, F., Sugimura, Y. y Kai, Y. (1999) Structure comparison between oxidized and reduced plastocyanin from a fern, *Dryopteris crassirhizoma*. *Biochemistry* 38, 13853-13861.

Inoue, T., Sugawara, H., Hamanaka, S., Tsukui, H., Suzuki, E., Kohzuma, T. y Kai, Y. (1999) Crystal structure determinations of oxidized and reduced plastocyanin from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Biochemistry* 38, 6063-6069.

Jaenicke, R. (1991) Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *Eur J Biochem* 202, 715-728.

Jaenicke, R. y Zavodszky, P. (1990) Proteins under Extreme Physical Conditions. *FEBS Lett* 268, 344-349.

Jaszewski, A. R. y Jezierska, J. (2001) Hybrid density functional approach to the isotropic and anisotropic hyperfine couplings with ^{14}N and ^1H nuclei in the blue copper proteins. *Chem Phys Lett*, 343, 571-580.

Kannan, N. y Vishveshwara, S. (2000) Aromatic clusters: a determinant of thermal stability of thermophilic proteins. *Protein Eng* 13, 753-761.

Karshikoff, A. y Ladenstein, R. (2001) Ion pairs and the thermotolerance of proteins from hyperthermophiles: a 'traffic rule' for hot roads. *Trends Biochem Sci* 26, 550-556.

Kauzmann, W. (1959) Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv Protein Chem* 14, 1-63.

Klotz, I. M. (1958) Protein Hydration and Behavior. *Science* 128, 815-822.

Koide, S., Dyson, H. J. y Wright, P. E. (1993) Characterization of a folding intermediate of apoplastocyanin trapped by proline isomerization. *Biochemistry* 32, 12299-12310.

Kramer, D. M., Sacksteder, C. A. y Cruz, J. A. (1999) How acidic is the lumen? *Photosynth Res* 60, 151-163.

Kumar, S., Tsai, C. J. y Nussinov, R. (2000) Factors enhancing protein thermostability. *Protein Eng* 13, 179-191.

La Rosa, C., Milardi, D., Grasso, D. M., Verbeet, M. P., Canters, G. W., Sportelli, L. y Guzzi, R. (2002) A model for the thermal unfolding of amicyanin. *Eur Biophys J* 30, 559-570.

La Rosa, C., Milardi, D., Grasso, D., Guzzi, R. y Sportelli, L. (1995) Thermodynamics of the Thermal Unfolding of Azurin. *J Phys Chem* 99, 14864-14870.

Ladbury, J. E., Wynn, R., Thomson, J. A. y Sturtevant, J. M. (1995) Substitution of charged residues into the hydrophobic core of Escherichia coli thioredoxin results in a change in heat capacity of the native protein. *Biochemistry* 34, 2148-2152.

Lancaster, K. M., Sproules, S., Palmer, J. H., Richards, J. H. y Gray H. B. (2010) Outer-Sphere Effects on Reduction Potentials of Copper Sites in Proteins: The Curious Case of High Potential Type 2 C112D/M121E *Pseudomonas aeruginosa* Azurin. *J Am Chem Soc* 132, 14590–14595.

Leckner, J., Bonander, N., WittungStafshede, P., Malmstrom, B. G. y Karlsson, B. G. (1997) The effect of the metal ion on the folding energetics of azurin, a comparison of the native, zinc and apoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1342, 19-27.

Leckner, J., Wittung, P., Bonander, N., Karlsson, B. G. y Malmstrom, B. G. (1997) The effect of redox state on the folding free energy of azurin. *J Biol Inorg Chem* 2, 368-371.

Lee, B. y Richards, F. M. (1971) Interpretation of Protein Structures - Estimation of Static Accessibility. *J Mol Biol* 55, 379-400.

-
- Li, W. F., Zhou, X. X. y Lu, P. (2005) Structural features of thermozymes. *Biotechnol Adv* 23, 271-281.
- Lim, W. A. y Sauer, R. T. (1989) Alternative Packing Arrangements in the Hydrophobic Core of Lambda-Repressor. *Nature* 339, 31-36.
- Lindahl, E., Hess, B. y van der Spoel, D. (2001) GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *J Mol Model* 7, 306-317.
- Lumry, R. y Eyring, H. (1954) Conformation Changes of Proteins. *J Phys Chem* 58, 110-120.
- Ma, J. K., Bishop, G. R. y Davidson, V. L. (2005) The ligand geometry of copper determines the stability of amicyanin. *Arch Biochem Biophys* 444, 27-33.
- Makhatadze, G. I. y Privalov, P. L. (1995) Energetics of protein structure. *Adv Protein Chem* 47, 307-425.
- Malmstrom, B. G. (1994) Rack-Induced Bonding in Blue-Copper Proteins. *Eur J Biochem* 223, 711-718.
- Marcus, R. A. y Sutin, N. (1985) Electron Transfers in Chemistry and Biology. *Biochim Biophys Acta* 811, 265-322.
- Maruccio, G., Visconti, P., Biasco, A., Bramanti, A., D'Amone, E., Cingolani, R. y Rinaldi, R. (2004) Metalloprotein-based field-effect transistor: a prototype. *2004 4th Ieee Conference on Nanotechnology*, 113-115.

- Matthews, B. W., Weaver, L. H. y Kester, W. R. (1974) Conformation of Thermolysin. *J Biol Chem* 249, 8030-8044.
- Merchant, S. y Bogorad, L. (1986) Rapid Degradation of Apoplastocyanin in Cu(Li)-Deficient Cells of *Chlamydomonas-Reinhardtii*. *J Biol Chem* 261, 5850-5853.
- Merchant, S. y Bogorad, L. (1986) Regulation by Copper of the Expression of Plastocyanin and Cytochrome-C552 in *Chlamydomonas-Reinhardtii*. *Mol Cell Biol* 6, 462-469.
- Milardi, D., La Rosa, C., Grasso, D., Guzzi, R., Sportelli, L. y Fini, C. (1998) Thermodynamics and kinetics of the thermal unfolding of plastocyanin. *Eur Biophys J Biophys Lett* 27, 273-282.
- Morozov, A. V. y Kortemme, T. (2005) Potential functions for hydrogen bonds in protein structure prediction and design. *Adv Protein Chem* 72, 1-38.
- Murphy, L. M., Hasnain, S. S., Strange, R. W., Harvey, I. y Ingledew, W. J. (1991) en X-ray Absorption Fine Structure; Hasnain, S. S., ed.; Ellis Horwood, Londres.
- Myers, J. K. y Pace, C. N. (1996) Hydrogen bonding stabilizes globular proteins. *Biophys J* 71, 2033-2039.
- Navarro, J. A., Hervas, M. y DelaRosa, M. A. (1997) Co-evolution of cytochrome c(6) and plastocyanin, mobile proteins transferring electrons from cytochrome b(6)f to photosystem I. *J Biol Inorg Chem* 2, 11-22.

-
- Newville, M. (2001). IFEFFIT : interactive XAFS analysis and FEFF fitting. *J Synchrotron Radiat* 8, 322-324.
- Ortega, J. M., Hervas, M. y Losada, M. (1988) Redox and acid-base characterization of cytochrome b-559 in photosystem II particles. *Eur J Biochem* 171, 449-455.
- Pace, C. N. (1995) Evaluating contribution of hydrogen bonding and hydrophobic bonding to protein folding. *Method Enzymol* 259, 538-554.
- Pace, C. N., Shirley, B. A., McNutt, M. y Gajiwala, K. (1996) Forces contributing to the conformational stability of proteins. *Faseb J* 10, 75-83.
- Pack, S. P. y Yoo, Y. J. (2004) Protein thermostability: structure-based difference of amino acid between thermophilic and mesophilic proteins. *J Biotechnol* 111, 269-277.
- Pantazaki, A. A., Tsolkas, G. P. y Kyriakidis, D. A. (2008) A DING phosphatase in *Thermus thermophilus*. *Amino Acids* 34, 437-448.
- Pauling, L., Corey, R. B. y Branson, H. R. (1951) The structure of proteins; two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proc Nat Acad Sci USA* 37, 205-211.
- Penfield, K. W., Gay, R. R., Himmelwright, R. S., Eickman, N. C., Norris, V. A., Freeman, H. C. y Solomon, E. I. (1981) Spectroscopic Studies on Plastocyanin Single-Crystals - a Detailed Electronic-Structure Determination of the Blue Copper Active-Site. *J Am Chem Soc* 103, 4382-4388.

- Perutz, M. F. (1978) Electrostatic effects in proteins. *Science* 201, 1187-1191.
- Perutz, M. F. y Raidt, H. (1975) Stereochemical basis of heat stability in bacterial ferredoxins and in haemoglobin A2. *Nature* 255, 256-259.
- Plaxco, K. W., Simons, K. T. y Baker, D. (1998) Contact order, transition state placement and the refolding rates of single domain proteins. *J Mol Biol* 277, 985-994.
- Pozdnyakova, I., Guidry, J. y Wittung-Stafshede, P. (2001) Probing copper ligands in denatured *Pseudomonas aeruginosa* azurine: unfolding His117Gly and His46Gly mutants. *J Biol Inorg Chem* 6, 182-188.
- Priev, A., Almagor, A., Yedgar, S. y Gavish, B. (1996) Glycerol decreases the volume and compressibility of protein interior. *Biochemistry* 35, 2061-2066.
- Privalov, P. L. (1979) Stability of proteins: small globular proteins. *Adv Protein Chem* 33, 167-241.
- Privalov, P. L. y Gill, S. J. (1988) Stability of protein structure and hydrophobic interaction. *Adv Protein Chem* 39, 191-234.
- Ravel, B. y Newville, M. (2005). Athena and Artemis: interactive graphical data analysis using Ifeffit. *J Synchrotron Radiat* 12, 537-541.
- Rehr, J. J., Albers, R. C. y Zabinsky, S. I. (1992) High-order multiple-scattering calculations of X-ray-absorption fine-structure. *Phys Rev Lett.* 69, 3397-3400.

Redinbo, M. R., Yeates, T. O. y Merchant, S. (1994) Plastocyanin - Structural and Functional-Analysis. *J Bioenerg Biomembr* 26, 49-66.

Richards, F. M. (1974) Interpretation of Protein Structures - Total Volume, Group Volume Distributions and Packing Density. *J Mol Biol* 82, 1-14.

Richards, F. M. (1977) Areas, Volumes, Packing, and Protein-Structure. *Annu Rev Biophys Bioeng* 6, 151-176.

Richmond, T. J. (1984) Solvent Accessible Surface-Area and Excluded Volume in Proteins - Analytical Equations for Overlapping Spheres and Implications for the Hydrophobic Effect. *J Mol Biol* 178, 63-89.

Robinson-Rechavi, M., Alibes, A. y Godzik, A. (2006) Contribution of electrostatic interactions, compactness and quaternary structure to protein thermostability: Lessons from structural genomics of *Thermotoga maritima*. *J Mol Biol* 356, 547-557.

Russell, R. J., Hough, D. W., Danson, M. J. y Taylor, G. L. (1994) The crystal structure of citrate synthase from the thermophilic archaeon, *Thermoplasma acidophilum*. *Structure* 2, 1157-1167.

Ryde, U., Olsson, M. H. M., Pierloot, K. y Roos, B. O. (2000) The cupric geometry of blue copper proteins is not strained. *J Mol Biol*, 261, 586–596.

Sadeghi, M., Naderi-Manesh, H., Zarrabi, M. y Ranjbar, B. (2006) Effective factors in thermostability of thermophilic proteins. *Biophys Chem* 119, 256-270.

- Sali, D., Bycroft, M. y Fersht, A. R. (1988) Stabilization of Protein-Structure by Interaction of Alpha-Helix Dipole with a Charged Side-Chain. *Nature* 335, 740-743.
- Sambrook, J., Fritsch, E. y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandberg, A., Harrison, D. J. y Karlsson, B. G. (2003) Thermal denaturation of spinach plastocyanin: Effect of copper site oxidation state and molecular oxygen. *Biochemistry* 42, 10301-10310.
- Sandberg, A., Leckner, J. y Karlsson, B. G. (2004) Apo-azurin folds via an intermediate that resembles the molten-globule. *Protein Sci* 13, 2628-2638.
- Sandberg, A., Leckner, J., Shi, Y., Schwarz, F. P. y Karlsson, B. G. (2002) Effects of metal ligation and oxygen on the reversibility of the thermal denaturation of *Pseudomonas aeruginosa* azurin. *Biochemistry* 41, 1060-1069.
- Santoro, M. M. y Bolen, D. W. (1988) Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry* 27, 8063-8068.
- Sato, K. y Dennison, C. (2002) Effect of histidine 6 protonation on the active site structure and electron-transfer capabilities of pseudoazurin from *Achromobacter cycloclastes*. *Biochemistry* 41, 120-130.
- Scandurra, R., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Politi, L. y Engel, P. C. (1998) Protein thermostability in extremophiles. *Biochimie* 80, 933-941.

Schellman, J. A. (1955) The stability of hydrogen-bonded peptide structures in aqueous solution. *C R Trav Lab Carlsberg [Chim]* 29, 230-259.

Scheraga, H. A. (1963) en *The Proteins*. Neurath, H., ed; Academic Press, Nueva York.

Scholtz, J. M., Marqusee, S., Baldwin, R. L., York, E. J., Stewart, J. M., Santoro, M. y Bolen, D. W. (1991) Calorimetric determination of the enthalpy change for the alpha-helix to coil transition of an alanine peptide in water. *Proc Nat Acad Sci USA* 88, 2854-2858.

Scott, R. A., Hahn, J. E., Doniach, S., Freeman, H. C. y Hodgson, K. O. (1982) Polarized X-Ray Absorption-Spectra of Oriented Plastocyanin Single-Crystals - Investigation of Methionine Copper Coordination. *J Am Chem Soc* 104, 5364-5369.

Sekiyama, H., Kosugi, N., Kuroda, H., Ohta, T. (1986) Sulphur K-edge absorption spectra of Na_2SO_4 , Na_2SO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_x$ ($x=5-8$). *Bull Chem Soc Jpn* 59, 575-579.

Shirley, B. A., Stanssens, P., Hahn, U. y Pace, C. N. (1992) Contribution of hydrogen bonding to the conformational stability of ribonuclease T1. *Biochemistry* 31, 725-732.

Shosheva, A., Donchev, A., Dimitrov, A., Kostov, G., Toromanov, G., Getov, V. y Alexov, E. (2005) Comparative study of the stability of poplar plastocyanin isoforms. *Biochim Biophys Acta, Proteins Proteomics* 1748, 116-127.

Sigfridsson, K. (1998) Plastocyanin, an electron-transfer protein. *Photosynth Res* 57, 1-28.

- Sinclair-Day, J. D., Sisley, M. J., Sykes, A. G., King, G. C. y Wright, P. E. (1985) Acid Dissociation-Constants for Plastocyanin in the Cu-I State. *J Chem Soc, Chem Commun*, 505-507.
- Sinha, A., Yadav, S., Ahmad, R. y Ahmad, F. (2000) A possible origin of differences between calorimetric and equilibrium estimates of stability parameters of proteins. *Biochem J* 345 Pt 3, 711-717.
- Solomon, E. I., Hare, J. W. y Gray, H. B. (1976) Spectroscopic studies and a structural model for blue copper centers in proteins. *Proc Nat Acad Sci USA* 73, 1389-1393.
- Solomon, E. I. y Lowery, M. D. (1993) Electronic structure contributions to function in bioinorganic chemistry. *Science* 259, 1575-1581.
- Solomon, E. I., Szilagyi, R. K., DeBeer George, S. y Basumallick, L. (2004) Electronic structures of metal sites in proteins and models: contributions to function in blue copper proteins. *Chem Rev* 104, 419-458.
- Solomon, E. I., Hedman, B., Hodgson, K. O., Dey, A., Szilagyi, R. K. (2005) Ligand K-edge X-ray absorption spectroscopy: covalency of ligand–metal bonds. *Coord Chem Rev* 249, 97-129.
- Spasov, V. Z., Karshikoff, A. D. y Ladenstein, R. (1994) Optimization of the electrostatic interactions in proteins of different functional and folding type. *Protein Sci* 3, 1556-1569.

Sreerama, N. y Woody, R. W. (2000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem* 287, 252-260.

Sturtevant, J. M. (1994) The Thermodynamic Effects of Protein Mutations. *Curr Opin Struct Biol* 4, 69-78.

Sundaralingam, M., Sekharudu, Y. C., Yathindra, N. y Ravichandran, V. (1987) Ion-Pairs in Alpha-Helices. *Proteins-Struct Funct Genet* 2, 64-71.

Sykes, A. G. (1991) Active-Site Properties Of The Blue Copper Proteins *Adv Inorg Chem* 36, 377-408.

Szilagyi, A. y Zavodszky, P. (2000) Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey. *Structure* 8, 493-504.

Tanaka, Y., Tsumoto, K., Yasutake, Y., Umetsu, M., Yao, M., Fukada, H., Tanaka, I. y Kumagai, I. (2004) How oligomerization contributes to the thermostability of an archaeon protein. Protein L-isoaspartyl-O-methyltransferase from *Sulfolobus tokodaii*. *J Biol Chem* 279, 32957-32967.

Taneva, S. G., Kaiser, U., Donchev, A. A., Dimitrov M. I., Mantele, W. y Muga, A. (1999) Redox-induced conformational changes in plastocyanin: An infrared study. *Biochemistry* 38, 9640-9647.

Tanford, C. (1962) Contribution of Hydrophobic Interactions to Stability of Globular Conformation of Proteins. *J Am Chem Soc* 84, 4240-4247.

- Tomazic, S. J. y Klibanov, A. M. (1988) Mechanisms of irreversible thermal inactivation of Bacillus alpha-amylases. *J Biol Chem* 263, 3086-3091.
- Thompson, M. J. y Eisenberg, D. (1999) Transproteomic evidence of a loop-deletion mechanism for enhancing protein thermostability. *J Mol Biol* 290, 595-604.
- Tullius, T. D. (1979) Structures of Metal Complexes in Biological Systems: EXAFS Studies of Blue Copper Proteins, Xanthine Oxidase y Vanadocytes. Thesis, Stanford University.
- Varley, J. P., Moehrle, J. J., Manasse, R. S., Bendall, D. S., y Howe, C. J. (1995) Characterization of plastocyanin from the cyanobacterium *Phormidium laminosum*: copper-inducible expression and SecA-dependent targeting in Escherichia coli. . *Plant Mol Biol* 27, 179-190.
- van de Vossenberg, J. L., Driessen, A. J. y Konings, W. N. (1998) The essence of being extremophilic: the role of the unique archaeal membrane lipids. *Extremophiles* 2, 163-170.
- Vieille, C. y Zeikus, G. J. (2001) Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol Mol Biol Rev* 65, 1-43.
- Vogt, G., Woell, S. y Argos, P. (1997) Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs. *J Mol Biol* 269, 631-643.
- Waldburger, C. D., Schildbach, J. F. y Sauer, R. T. (1995) Are Buried Salt Bridges Important for Protein Stability and Conformational Specificity? *Nat Struct Biol* 2, 122-128.

Wang, J. M., Cieplak, P. y Kollman, P. A. (2000) How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *J Comput Chem* 21, 1049-1074.

Watanabe, K., Hata, Y., Kizaki, H., Katsube, Y. y Suzuki, Y. (1997) The refined crystal structure of *Bacillus cereus* oligo-1,6-glucosidase at 2.0 Å resolution: structural characterization of proline-substitution sites for protein thermostabilization. *J Mol Biol* 269, 142-153.

Xiao, L. y Honig, B. (1999) Electrostatic contributions to the stability of hyperthermophilic proteins. *J Mol Biol* 289, 1435-1444.

Xu, Z., Liu, Y., Yang, Y., Jiang, W., Arnold, E. y Ding, J. (2003) Crystal structure of D-Hydantoinase from *Burkholderia pickettii* at a resolution of 2.7 Ångstroms: insights into the molecular basis of enzyme thermostability. *J Bacteriol* 185, 4038-49.

Yamada, T., Fialho, A. M., Punj, V., Bratescu, L., Das Gupta, T. K., y Chakrabarty, A. M. (2005) Internalization of bacterial redox protein azurin in mammalian cells: entry domain and specificity. *Cell Microbiol* 7, 1418-1431.

Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D. y Somero, G. N. (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217, 1214-1222.