

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis,
cicCartuja, Universidad de Sevilla – CSIC



ESTRUCTURA Y ESTABILIDAD EN PLASTOCIANINAS DE CIANOBACTERIAS

Trabajo presentado por la Licenciada **D^a. Estrella Frutos Beltrán**
para optar al título de Doctor en Bioquímica por la Universidad de
Sevilla.

Sevilla, 2015

Directores

**Dr. D. Miguel Ángel
De la Rosa Acosta**

**Dr. D. Antonio Jesús
Díaz Quintana**

Catedrático de Bioquímica y
Biología Molecular
Universidad de Sevilla

Profesor Titular de Bioquímica
y Biología Molecular
Universidad de Sevilla

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido financiado por la Junta de Andalucía (P06-CVI-01713, BIO-198 y P011-CVI-7216) y por el Ministerio de Economía y Competividad (BFU2009-07190).

En su mayor parte, la investigación descrita en la presente memoria ha sido realizada en el Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja (cicCartuja), centro mixto entre la Universidad de Sevilla y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y cofinanciado por la Consejería de Economía, Innovación Ciencia y Empleo de la Junta de Andalucía.

Las estructuras cristalográficas de los mutantes de plastocianina se han resuelto a lo largo de dos estancias de tres meses en Diamond Light Source Ltd. (Reino Unido) bajo la supervisión del Dr. Armin Wagner, financiadas por dicha institución a través de acuerdo con la Universidad de Sevilla.

En este instante, me gustaría agradecer a mis directores de tesis, Miguel Ángel De la Rosa y Antonio Díaz, la oportunidad, la paciencia y la dedicación durante estos, a veces, muy largos años. A Armin Wagner, por toda su atención durante mis estancias y mi introducción en la hermosa materia que es la cristalografía de proteínas.

No puedo dejar pasar esta oportunidad sin agradecer también a mis compañeros del L1 y L5, a todos, porque gracias a ellos los buenos momentos fueron mejores, y los duros, más livianos. A Francisco Muñoz, por introducirme en todas las técnicas que posteriormente se convertirían en rutinarias; A Jonathan, por compartir este camino desde el primer día, aunque al final me acabara sacando mucho trecho (qué alto pusiste el listón); A Katuska González, por toda su

ayuda durante mis últimos meses; A Blas Moreno, por toda su preocupación hacia mí (por fin Blas, por fin); A Cristina Albarrán, a quien debería haber hecho mucho más caso; A Pilar Alcántara, porque sin ella el trabajo se hubiera hecho aún más duro.

Agradezco también a mis padres, que me han mostrado con sus acciones que lo peor de caerse es no intentar por todos los medios el volverse a levantar, y a Víctor, que ha soportado tantos momentos de desesperación por mi parte, a lo que ha respondido siempre con su incondicional apoyo y un fuerte abrazo. A ellos les dedico este trabajo.

ÍNDICE

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE	7
ÍNDICE DE FIGURAS	13
ÍNDICE DE TABLAS	19
LISTADO DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	21
1. INTRODUCCIÓN.....	27
1.1. Las proteínas de cobre azul.....	29
1.1.1. Las proteínas de cobre	29
1.1.2. Las proteínas de cobre azul.....	35
1.1.2.1. El centro de cobre tipo-1.....	36
1.1.2.2. El dominio de unión a cobre azul: características y evolución.....	39
1.1.2.3. Cupredoxinas.....	42
1.1.2.3.1. Plastocianina	42
1.2. Aplicaciones biotecnológicas de las proteínas de cobre azul: biosensores electroquímicos	45
1.3. Termoestabilidad proteica.....	47
1.3.1. Termoestabilidad termodinámica y termoestabilidad cinética	47
1.3.2. Organismos mesofílicos y termofílicos.....	49
1.3.3. Mecanismos de termoestabilización proteica.....	50
1.3.4. Estabilidad térmica en cupredoxinas.....	61
1.3.4.1. Estabilidad térmica en plastocianinas	63
1.3.4.1.1. Comparación entre las plastocianinas de <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 y <i>Phormidium</i> <i>Laminosum</i>	64

2.	OBJETIVOS	71
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	75
3.1.	Programas informáticos.....	77
3.2.	Diseño de los mutantes	77
3.2.1.	CUPSAT (<i>“Cologne University Protein Stability Analysis Tool”</i>).....	78
3.2.2.	Dinámicas moleculares.....	78
3.2.2.1.	Análisis de componentes principales	83
3.2.2.2.	Análisis de contenidos coseno.....	85
3.3.	Análisis de la termoestabilidad de Syn – Pc mediante mutagénesis dirigida.....	86
3.3.1.	Organismos y condiciones de cultivo	86
3.3.2.	Obtención de ADN de plastocianinas mutantes	86
3.3.3.	Expresión y purificación de plastocianinas silvestres y mutantes.....	90
3.3.3.1.	Producción de las plastocianinas recombinantes.....	90
3.3.3.2.	Purificación de las plastocianinas recombinantes	91
3.3.3.3.	Obtención de las formas apo de la plasctocianina	93
3.3.4.	Caracterización proteica	93
3.3.4.1.	Espectroscopía de dicroísmo circular	93
3.3.4.2.	Medidas potenciométricas	95
3.3.4.3.	Espectrofotometría cinética inducida por láser.....	96
3.3.5.	Medidas de estabilidad térmica.....	98
3.3.5.1.	Estudios de fluorescencia.....	98
3.3.5.1.1.	Fluorimetría Diferencial de barrido (DSF; <i>Differential Scanning Fluorymetry</i>).....	98
3.3.5.1.2.	Espectroscopía de fluorescencia	100

3.3.5.2.	Dicroísmo circular	102
3.3.5.3.	Análisis de las rampas de temperatura y obtención de la temperatura de desnaturalización	102
3.4.	Caracterización estructural de las plastocianinas mutantes mediante difracción de rayos X.....	104
3.4.1.	Cristalización	109
3.4.1.1.	Syn-A44D/D49P/A62L.....	109
3.4.1.2.	Syn-V48I.....	110
3.4.1.3.	Pho-P49G/G50P	111
3.4.2.	Colección de datos de difracción y refinamiento	111
4.	RESULTADOS.....	113
4.1.	Diseño de los mutantes de la plastocianina de <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803.....	115
4.1.1.	Mutaciones introducidas en la zona de interacción del lazo L5 con el barril: cluster hidrofóbico	115
4.1.1.1.	Sustitución V48I.....	117
4.1.1.2.	Sustituciones L56I, T52Y y T52I	118
4.1.1.3.	Mutantes en las hebras β 5 y β 6: G60A, K59S y V42I.....	120
4.1.1.4.	Sustitución A3F.....	121
4.1.1.5.	Mutantes múltiples.....	122
4.1.2.	Análisis de las mutaciones mediante el programa CUPSAT	124
4.2.	Simulaciones de dinámica molecular de corta duración.....	125
4.3.	Análisis de la termoestabilidad de Syn-Pc mediante mutagénesis dirigida.....	128
4.3.1.	Expresión y purificación de plastocianinas silvestres y mutantes.....	128

4.3.2.	Análisis funcional.....	132
4.3.2.1.	Determinación de la estructura secundaria mediante dicroísmo circular.....	132
4.3.2.2.	Medidas potenciométricas.....	133
4.3.2.3.	Espectrofotometría cinética inducida por láser.....	135
4.3.2.4.	Determinación de la estructura del centro de cobre mediante dicroísmo circular.....	137
4.4.	Medidas de estabilidad térmica.....	141
4.4.1.	Fluorimetría Diferencial de barrido (DSF; differential scanning fluorymetry).....	141
4.4.2.	Espectroscopía de fluorescencia.....	144
4.4.3.	Dicroísmo circular.....	146
4.4.4.	Diferencias entre los resultados de espectroscopía de fluorescencia y CD.....	150
4.4.5.	Análisis de la aportación de la matriz proteica y del centro metálico a la estabilidad proteica.....	153
4.4.6.	Comparación de los resultados de los experimentos de desplegamiento con otros parámetros y resultados	156
4.4.6.1.	Relación entre el potencial redox y la temperatura de desplegamiento.....	156
4.5.	Simulaciones de dinámica molecular de larga duración.....	159
4.5.1.1.	Estabilidad estructural global.....	160
4.5.1.2.	Flexibilidad estructural.....	164
4.5.1.2.1.	Flexibilidad estructural a 298 K.....	165
4.5.1.2.2.	Flexibilidad estructural a 498 K.....	171
4.5.1.3.	Estructura secundaria y rutas de desplegamiento.....	174

4.5.1.3.1. Estructura secundaria y rutas de desplegamiento a 298K	174
4.5.1.3.2. Estructura secundaria y rutas de desplegamiento a 498 K	180
4.5.1.4. Análisis de componentes principales	184
4.6. Caracterización estructural de las plastocianinas mutantes mediante cristalografía de rayos X.	189
4.6.1. Obtención de los cristales	189
4.6.1.1. Syn-V48I	189
4.6.1.2. Pho-P49G/G50P	190
4.6.2. Colección de datos de difracción y procesamiento.....	191
4.6.2.1. Syn-V48I	191
5. DISCUSIÓN.....	200
5.1. Efecto de las mutaciones sobre la dinámica de la Pc a temperatura ambiente	205
5.2. Efecto de la temperatura sobre los mutantes de Syn-Pc. El modelo en tres estados.....	207
5.3. Aportación del centro metálico a la estabilidad	211
5.4. Alteración del centro metálico y relación entre estabilidad del centro de cobre y potencial redox.....	212
6. CONCLUSIONES	216
7. BIBLIOGRAFÍA.....	222
8. MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	254
8.1. Material Suplementario 1: Difusión de resultados y publicaciones	256
8.1.1. Publicaciones en revistas.....	256
8.1.2. Comunicaciones a congresos	256

8.2.	Material Suplementario 3: Seguimiento del despliegamiento proteico de la apo-Pc mediante DSF y espectroscopía de fluorescencia.....	258
8.3.	Material Suplementario 4: Cristalización y obtención de la estructura cristalográfica de Syn-A44D/D49P/A62L	259
8.3.1.	Obtención de los cristales.....	259
8.3.2.	Colección de datos de difracción y procesamiento.	260
8.4.	Material Suplementario 5: condiciones de cristalización de Pho-P49G/G59P y gotas resultantes	262

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Centros de cobre tipo-1 y tipo-2	32
Figura 2. Centros de cobre CuA, CuB y CuZ.....	34
Figura 3. Estructura de Syn-Pc y de su centro de cobre.....	38
Figura 4. Conservación de la estructura de los dominios BCB entre Syn-Pc y la bilirrubina oxidasa	40
Figura 5. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de algunos representantes de la familia de las proteínas de cobre azul.	41
Figura 6. Elementos de estructura secundaria y su correspondencia con la secuencia de aminoácidos.	43
Figura 7. Ejemplos de biosensor.	46
Figura 8. Tendencias en el número de residuos hidrofóbicos y polares, así como en el de puentes salinos con respecto al incremento en la Tm de diferentes cupredoxinas.	62
Figura 9. Alineamiento de las secuencias de Pho-Pc y Syn-Pc.....	65
Figura 10. Alineamiento de las estructuras de Syn-Pc y de Pho- Pc.	67
Figura 11. Diferencias en las interacciones intramoleculares de la cara este de Syn-Pc y Pho-Pc.....	68
Figura 12. Representación del centro de cobre de la forma oxidada de Syn-Pc.....	80
Figura 13. Detalle del residuo Trp31 en la estructura tridimensional de Syn-Pc.	100
Figura 14. Estructura tridimensional de Syn-Pc y detalle de la interfase entre los lazos L5 y L7.....	115

Figura 15. Estructura tridimensional de Pho-Pc y detalle de la interfase entre los lazos L5 y L7.	116
Figura 16. Mutación V48I en Syn-Pc.....	117
Figura 17. Mutación L56I.	118
Figura 18. Mutaciones T52I y T52Y.	119
Figura 19. Mutaciones V42I, K59S y G60A.....	121
Figura 20. Mutación A3F.....	122
Figura 21. Triple mutante A44D/D49P/A62L.....	123
Figura 22. Doble mutante V48I/G60A.....	123
Figura 23. Desviaciones (RMSD) y fluctuaciones cuadráticas medias (RMSF) a lo largo de las trayectorias calculadas a 298K y durante 1 ns.	127
Figura 24. Espectros de absorción en el Uv/vis de Syn-Pc, Syn-V48I, Syn-G60A, Syn-V48I/G60A y Syn-A44D/D49P/A62L.	130
Figura 25. Gel de electroforesis en acrilamida y condiciones desnaturalizantes de Syn-V48I, Syn-A44D/D49P/A62L y Pho-P49G/G50P.	131
Figura 26. Espectros de CD en el UV-lejano (A) y contenido en estructura secundaria (B) de Syn-Pc y de los mutantes ensayados en este trabajo.	133
Figura 27. Valoraciones redox de Syn-Pc y de aquéllos de sus mutantes en los que se observó un cambio considerable en la Tm de la forma oxidada según la técnica de DSF.	134
Figura 28. Dependencia de la constante observada (kobs) respecto a la concentración de Pc para la reducción del PSI.....	136

Figura 29. Espectro de CD en la región del visible de Syn-Pc.....	138
Figura 30. Espectros de CD en el visible de los mutantes estabilizantes de Syn-Pc.....	139
Figura 31. Espectros de CD en el visible de los mutantes desestabilizantes de Syn-Pc.	140
Figura 32. Diferencias en la T _m de las formas oxidadas entre los mutantes de Syn-Pc ensayados en este trabajo y la forma silvestre.....	142
Figura 33. Dependencia de los valores de T _m respecto al pH de las formas oxidadas.	143
Figura 34. Ejemplos del espectro de emisión de fluorescencia y de la curva de desnaturalización de Syn-Pc mediante espectroscopía de fluorescencia.	145
Figura 35. Curvas de desplegamiento normalizadas y ajustadas obtenidas por espectroscopía de fluorescencia y CD de las formas oxidadas y reducidas de Syn-Pc y de aquéllos mutantes simples que resultaron estabilizantes.	147
Figura 36. Curvas de desplegamiento normalizadas y ajustadas obtenidas por espectroscopía de fluorescencia y CD de las formas oxidadas y reducidas de los mutantes múltiples de Syn-Pc.	148
Figura 37. Curvas de desplegamiento normalizadas y ajustadas obtenidas por CD de las formas oxidadas y reducidas de Pho-Pc y de Pho-P49G/G50P.....	150
Figura 38. Curvas de desplegamiento normalizadas y ajustadas obtenidas por espectroscopía de fluorescencia y CD de las formas oxidadas de Syn-Pc, Syn-V48I y Syn-A44D/D49P/A62L.....	152

Figura 39. Aportaciones a la estabilidad de la matriz y el centro de cobre para cada uno de los mutantes de Syn-Pc respecto al silvestre.	155
Figura 40. Tendencias en la T _m respecto a los valores de potenciales rédox.	157
Figura 41. Tendencias de la diferencia de T _m (ΔT_m) entre las diferentes formas respecto a E0.	159
Figura 42. Desviaciones medias (RMSDs) a lo largo de las trayectorias de larga duración calculadas a (A) 298 y (B) 498K.	161
Figura 43. Radio de giro (R _g) a lo largo de las trayectorias de larga duración calculadas a (A) 298 y (B) 498K.	163
Figura 44. Fluctuaciones cuadráticas medias (RMSF) a lo largo de las trayectorias de larga duración calculadas a 298 K para las formas holo de Syn-Pc y sus mutantes.	166
Figura 45. Fluctuaciones cuadráticas medias (RMSF) a lo largo de las trayectorias de larga duración calculadas a 298 K para las formas apo de Syn-Pc y sus mutantes.	168
Figura 46. Fluctuaciones cuadráticas medias a 298 K.	169
Figura 47. Fluctuaciones cuadráticas medias (RMSF) a lo largo de las trayectorias de larga duración calculadas a 498 K de las formas holo y apo de Syn-Pc y sus mutantes.	172
Figura 48. Fluctuaciones cuadráticas medias a 498 K.	173
Figura 49. Evolución de la estructura secundaria de las formas holo a 298 K.	175
Figura 50. Cambios estructurales experimentados por las formas holo de Syn-Pc y sus mutantes V48I y A44D/D49P/A62L a lo largo de la trayectoria a 298K.	176

Figura 51. Evolución de la estructura secundaria de las formas apo a 298 K	177
Figura 52. Cambios estructurales experimentados por las formas apo de Syn-Pc y sus mutantes V48I y A44D/D49P/A62L a lo largo de la trayectoria a 298K.....	178
Figura 53. Evolución de la estructura secundaria de las formas (A) holo y (B) apo a 498 K.....	181
Figura 54. Cambios estructurales experimentados por las formas holo de Syn-Pc y sus mutantes V48I y A44D/D49P/A62L a lo largo de la trayectoria a 498K.....	182
Figura 55. Cambios estructurales experimentados por las formas apo de Syn-Pc y sus mutantes V48I y A44D/D49P/A62L a lo largo de la trayectoria a 498K.....	183
Figura 56. Representación de los valores propios frente a sus respectivos vectores propios.....	185
Figura 57. Representaciones gráficas de los movimientos concertados a lo largo de los cinco primeros vectores propios para Syn-Pc, Syn-V48I y Syn-A44D/D49P/A62L a 298K.	188
Figura 58. Cristal obtenido para el mutante Syn-V48I de la plastocianina.....	190
Figura 59. Cristal obtenido para el mutante Pho-P49G/G50P de la plastocianina.	191
Figura 60. Detalles de los lazos L1 y L5 de Syn-V48I.....	194
Figura 61. Detalle de la Ile48 y el centro de cobre de Syn-V48I	195
Figura 62. Alineamiento de las estructuras (A) y de los centros metálicos (B) de Syn-V48I y Syn_A44D/D49P/A62L.....	196

Figura 63. Detalle de la interfase entre los lazos L5 y L7 de Syn-Pc (A) y Syn-V48I (B).	198
Figura TMS 1. Espectros de desnaturalización de la forma reducida de Syn-Pc mediante DSF.	258
Figura TMS 2. Captura de pantalla de los espectros de desnaturalización de la apo-Pc de Syn-Pc mediante DSF.	258
Figura TMS 3. Ejemplos del espectro de emisión de fluorescencia y de la curva de desnaturalización de la apo-Pc de Syn-Pc mediante espectroscopía de fluorescencia.	259
Figura TMS 4. Cristales obtenidos para el triple mutante Syn-A44D/D49P/A62L de la plastocianina.	260
Figura TMS 5. Alineamiento de las estructuras cristalográficas del mutante Syn-A44D/D49P/A62L ya publicada (1PCS.pdb,(Romero et al., 1998)) y la obtenida en este trabajo.	260

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de Tm de diferentes cupredoxinas.....	61
Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para introducir las diferentes mutaciones dirigidas en el gen petE.	88
Tabla 3. Valores de $\Delta\Delta G_c$ calculadas mediante CUPSAT para los mutantes diseñados.....	124
Tabla 4. Rendimientos de producción de las distintas plastocianinas usadas para este trabajo.	128
Tabla 5. Porcentaje de recuperación de proteína en cada uno de los procesos de purificación hasta la obtención de la proteína pura.	129
Tabla 6. Constantes bimoleculares de la reacción de reducción del PSI por las distintas Pcs en condiciones estándar (k2).	136
Tabla 7. Valores de Tm de las formas oxidada y reducida de Syn-Pc y sus mutantes, así como de Pho-Pc y su mutante Pho-P49G/G50P.	149
Tabla 8. Valores de Tm de las apo-Pc de Syn-Pc y sus mutantes, así como de Pho-Pc y su mutante Pho-P49G/G50P.	154
Tabla 9. Información estadística derivada de los ajustes lineales de los mostrados en la figura 41.	158
Tabla 10. Valores promedios de los RMSDs para Syn-Pc y sus mutantes.....	162
Tabla 11. RMSD entre la estructura inicial y la final de cada una de las trayectorias.....	179
Tabla 12. Contenido coseno de los cinco primeros componentes principales (CP) de Syn-Pc y sus mutantes Syn-V48I y Syn-A44D/D49P/A62L a temperatura ambiente.	187

Tabla 13. Estadísticas correspondientes al proceso de la colección de datos y procesamiento	192
Tabla 14. Estadísticas correspondientes al proceso de refinamiento.....	193
Tabla 15. Comparación de las longitudes de los enlaces entre el cobre y sus ligandos entre Syn-V48I y Syn-A44D/D49P/A62L.	196
Tabla 16. Valores de Tm y longitud del enlace Cu-S _γ Cys en distintas plastocianinas.	197
Tabla TMS 1	261
Tabla TMS 2. Composiciones de las soluciones precipitantes usadas en el test 1 de cristalización de Pho-P49G/G50P.....	263
Tabla TMS 3. Composiciones de las soluciones precipitantes usadas en el test 2 de cristalización de Pho-P49G/G50P.....	264
Tabla TMS 4 Composiciones de las soluciones precipitantes usadas en el test 4 de cristalización de Pho-P49G/G50P.....	268
Tabla TMS 5. Composiciones de las soluciones precipitantes usadas en el test 5 de cristalización de Pho-P49G/G50P.....	269
Tabla TMS 6. Composiciones de las soluciones precipitantes usadas en el test 6 de cristalización de Pho-P49G/G50P	270

LISTADO DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

LISTADO DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

$A_{ }$	Constante de acoplamiento hiperfino
Am	Amicianina
Apo	Apoproteína
Apo-Pc	Apoproteína de la plastocianina
Az	Azurina
BCB	Plegamiento tipo cupredoxina o de unión a cobre azul
BCP	Proteína de cobre azul
CD	Circular Dichroism
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Desoxirribonucleasa
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
Em	Potencial redox
ϵ	Coefficiente de absorción en el visible
ϵ_s	Constante dieléctrica del agua
ϵ_p	Constante dieléctrica del interior de una proteína
$\Delta\Delta G_c$	Diferencia en energía libre de desplegamiento entre la proteína silvestre y la mutante calculada por CUPSAT
g	Aceleración gravitatoria terrestre
Holo-Pc	Holoproteína de la plastocianina
LB	Medio Luria-Bertani
MCBP	Proteínas de multicobre azul

Listado de abreviaturas y símbolos

MCO	Oxidasa multicobre
NMR	Nuclear magnetic resonance
p/p	Relación peso-peso
p/v	Relación peso-volumen
pBS	Plásmido pBluescript II SK+
PDB	<i>Protein data bank</i>
Pc	Plastocianina
PCA	Análisis de componentes principales
PCR	Polymerase chain reaction
Pho- Pc	Plastocianina silvestre de <i>Phormidium laminosum</i>
Pho-P49G/G50P	Plastocianina de <i>Phormidium laminosum</i> con la doble mutación
pBS-WT	Plásmido pBluescript II SK (+) con el gen petE clonado bajo el promotor lacZ
PSI	Fotosistema I
Rg	Radio de giro
RMSD	Root mean square deviation
RMSF	Root mean square fluctuation
Rpm	Revoluciones por minuto
Rc	Rusticianina
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SDS	Sodium dodecyl sulphate
Syn- Pc	Plastocianina silvestre de <i>Synechocystis sp.</i> 6803

Listado de abreviaturas y símbolos

Syn-A44D/D49P/A62L	Plastocianina de <i>Synechocystis</i> sp. 6803 con la triple mutación Syn-A44D/D49P/A62L
Syn-G60A	Plastocianina de <i>Synechocystis</i> sp. 6803 con la mutación G60A
Syn-V48I	Plastocianina de <i>Synechocystis</i> sp. 6803 con la mutación V48I
Syn-V48I/G60A	Plastocianina de <i>Synechocystis</i> sp. 6803 con la doble mutación
T_m	Temperatura de desplegamiento o fusión de la proteína
TOC	Temperatura óptima de crecimiento
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UV	Luz ultravioleta
v/v	Relación volumen-volumen
Vis	Luz visible
XANES	X-ray absorption near edge structure
XAS	X-ray absorption spectroscopy

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Las proteínas de cobre azul

1.1.1. Las proteínas de cobre

Las proteínas de cobre son aquellas que contienen iones de cobre en un estado permanentemente coordinado [Lindley^a, 2001; Valentine y Gralla, 2002; Messerschmidt, 2010]. Constituyen una amplia familia de proteínas distribuidas entre organismos pertenecientes a los tres dominios biológicos: archaea, bacteria, y eukarya [Andreini *et al.*, 2007], y entre múltiples localizaciones celulares [Linder, 1991]. Esta ubicuidad indica una aparición muy temprana en la evolución, a lo largo de la cual se han ido diversificando en sus funciones. Participan en procesos tan dispares como la transferencia de electrones, el transporte de oxígeno, el tráfico y almacenamiento de cobre en la célula, la detoxificación, la coagulación sanguínea, etc. [Lindley^a, 2001]. Entre aquéllas proteínas en las que el cobre es necesario para su función existe en la naturaleza múltiples centros de cobre, cada uno con sus propias geometrías (figuras 1 y 2) y características espectroscópicas [Messerschmidt, 2010], según las cuales se clasifican en los siguientes tipos:

1. Tipo-1 [Solomon *et al.*, 2004] (figura 1):
 - Un átomo de cobre coordinado al menos por los nitrógenos imidazoles de dos histidinas y el azufre tiolato de una cisteína en una geometría trigonal plana. Dependiendo del número y tipo de ligandos axiales, el centro de cobre tipo-1 se subdivide en [Rubino y Franz, 2012]:
 - Clase I: el ligando axial consiste en el azufre tioéter de una metionina. Geometría de tetrahedro distorcionado.
 - Clase II: el ligando axial es un residuo diferente a la metionina. Geometría de tetrahedro distorcionado.

- Clase III: dos ligandos axiales, uno de los cuales es un residuo de metionina y el otro el oxígeno carbonilo de una glicina. Geometría bipiramidal trigonal distorcionada.
- Máximo de absorción en el visible en torno a los 600 nm, con un coeficiente de absorción $\epsilon > 2000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Este fenómeno, responsable del característico color azul de este centro de cobre en su estado oxidado, se debe a una transferencia de carga de baja energía desde el tiolato del residuo de cisteína al átomo de Cu(II) [Machonkin *et al.*, 1998].
- Espectro de resonancia paramagnética de espín electrónico (EPR) con una constante de acoplamiento hiperfino $A_{\parallel} < 100 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ [Penfield *et al.*, 1981].
- Altas velocidades de transferencia electrónica así como un alto potencial de reducción al compararlos con la pareja Cu(II/I) en solución acuosa (+150mV) [Adman, 1991; Sykes, 1991]. En cupredoxinas el potencial redox está en el rango entre +180 y +680 mV [Dennison, 2005], aunque el mayor valor de potencial redox se ha descrito para la MCO ceruloplasmina (+1000 mV) [Gray *et al.*, 2000].

Los centros de cobre tipo-1 forman parte de las cupredoxinas, las cuales participan en rutas de desnitrificación o en la fotosíntesis transfiriendo un único electrón entre proteínas [Dennison, 2005]. También se encuentran en las oxidasas multicobre o en la nitrito reductasa, donde se produce la transferencia de un electrón entre centros de cobre dentro de la misma proteína [Lindley^b, 2001]. En el apartado 1.1.2.1 de este trabajo se amplía la información acerca de este centro de cobre y de las proteínas que las presentan.

2. Tipo-2 [MacPherson y Murphy, 2007] (figura 1):

- Un átomo de cobre, coordinado predominantemente por residuos de histidina en una geometría plana cuadrada, aunque también son comunes los ligandos que contienen oxígeno.
- Débil absorción en el visible.
- Espectro de EPR con $A_{\parallel} > 120 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$.

Las proteínas con centro de cobre tipo-2 [MacPherson y Murphy, 2007] pueden funcionar como oxidasas, monooxigenasas, o como dioxigenasas. Además, pueden catalizar la dismutación del superóxido y reducir nitrito a óxido nítrico. Este centro de cobre se encuentra, por ejemplo, en la galactosa oxidasa y en la Cu-Zn superóxido dismutasa.

3. Tipo-3 [Decker *et al.*, 2007] (figura 1):

- Dos iones de cobre, situados cerca el uno del otro. Cada uno se coordina por tres residuos de histidina en una geometría trigonal plana. Cuando une una molécula de dióxígeno, la geometría cambia a bipiramidal trigonal.
- La forma oxidada exhibe dos máximos de absorción en el UV cercano alrededor de 345 y 580 nm, así como un fuerte acoplamiento antiferromagnético entre los dos iones de Cu^{2+} que suprime la señal EPR.

El centro de cobre tipo-3 se ha encontrado en la hemocianina, una proteína que transporta oxígeno en invertebrados. También forma parte de diversas monooxigenasas como las tirosinasas, las catecol-oxidasas y las fenol-oxidasas [Decker *et al.*, 2007].

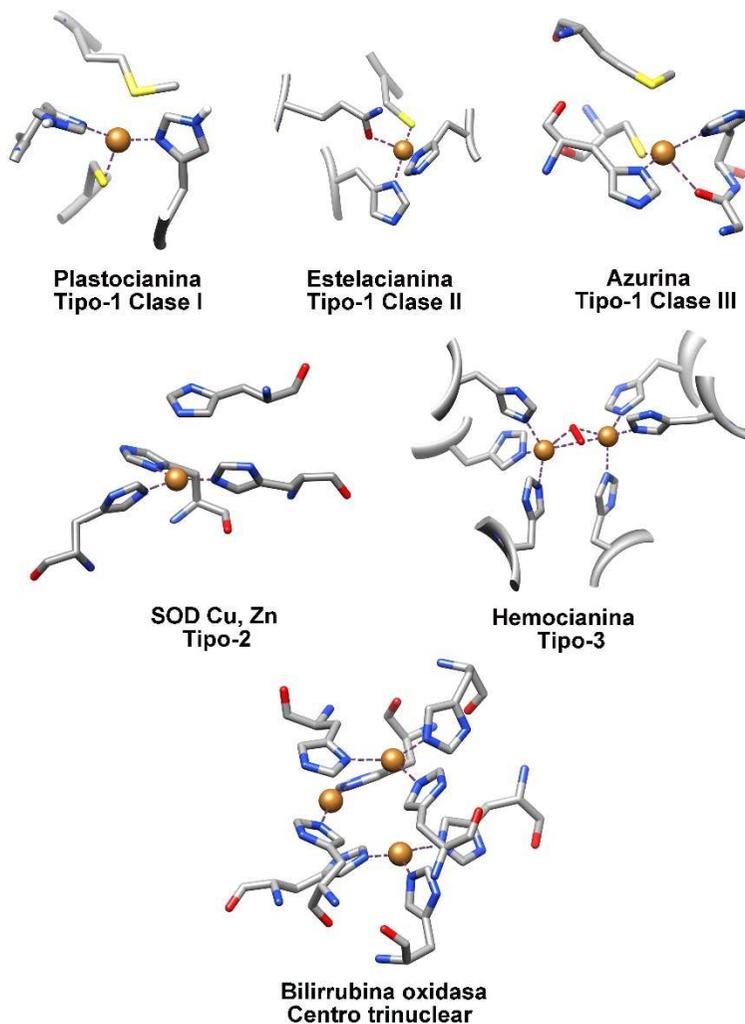


Figura 1. Centros de cobre tipo-1, tipo-2, tipo-3 y trinuclear

Representaciones gráficas de los centros de cobre tipo-1 clases I (plastocianina de *Synechocystis* sp. PCC 6803; 1JXD.pdb; Bertini^a *et al.*, 2001), II (estelacianina de *Cucumis Sativus*; 1JER.pdb; Hart *et al.*, 1996) y III (azurina de *Pseudomonas Aeruginosa*; 1AZU.pdb; Adman y Jensen, 1981); tipo-2 (Cu, Zn superóxido dismutasa de *Bos Taurus*; 2ZOW.pdb; Ito *et al.*, pendiente de publicación); tipo-3 (hemocianina de *Limulus Polyphemus*; 2OXY.pdb; Battistutta *et al.*, 2007); y centro trinuclear (bilirrubina oxidasa de *Myrothecium Verrucaria*; 2XLL.pdb; Cracknell *et al.*, 2011). El patrón de colores para los átomos es: azul se para el nitrógeno, rojo para el oxígeno, amarillo para el azufre, y marrón para el cobre.

4. Centros de cobre trinucleares, resultado de la combinación de un tipo-2 y un tipo-3. Los tres átomos de cobre se encuentran ligados por 8 residuos de histidina (figura 1).

En este tipo de agrupación exclusiva de oxidasas multicobre [Augustine *et al.*, 2010], los cuatro electrones necesarios para la reducción del oxígeno molecular a agua son transferidos de uno en uno desde un sustrato orgánico o metálico al centro de cobre tipo-3 del centro trinuclear vía un centro de cobre tipo-1.

5. Centros de cobre Cu_A [Farrar *et al.*, 1998; Andrew *et al.*, 1994] (figura 2):

- Dos átomos de cobre enlazados mediante dos residuos de cisteína, ambos en una geometría tetrahédrica. Uno de los átomos de cobre se coordina también por una histidina y una metionina, mientras que el otro lo hace por una histidina y el oxígeno carbonilo de un residuo de glutamato.
- Bandas a 480, 540, y 780 nm en el espectro de absorción de la N₂O reductasa. En la citocromo oxidasa gran parte del espectro se encuentra ocultado por la presencia del grupo hemo, detectándose únicamente una amplia banda de absorción entorno a los 800 nm [von Wachenfeldt *et al.*, 1994].
- Presenta un espectro de EPR con siete picos, así como un característico color morado.

6. Centros de cobre Cu_B [Calhoun *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2004] (figura 2):

- Un átomo de cobre, coordinado por tres residuos de histidina en una geometría trigonal piramidal.
- Carece de señal EPR debido a acoplamiento antiférrico con el grupo hemo situado en las proximidades.

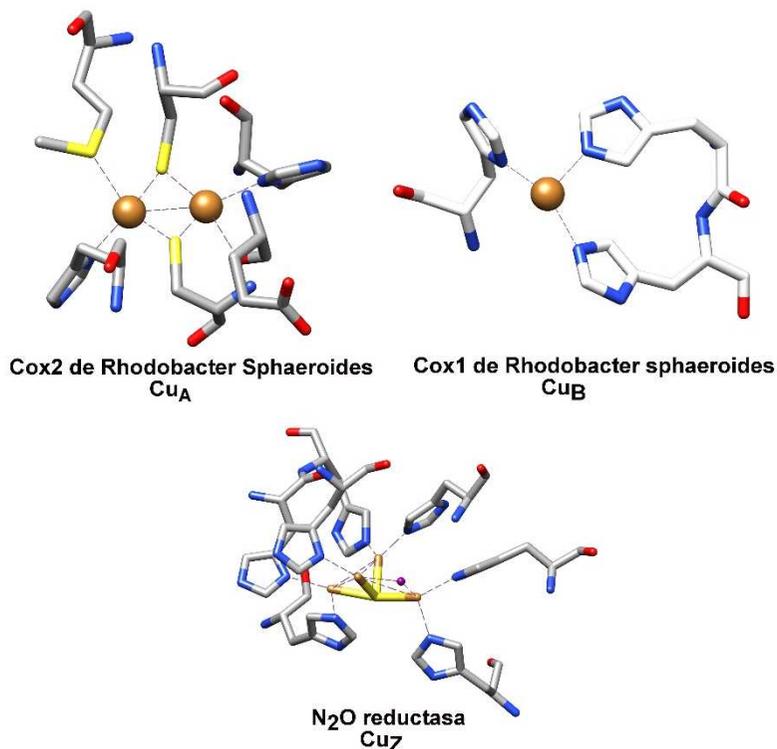


Figura 2. Centros de cobre Cu_A, Cu_B y Cu_Z.

Representaciones gráficas de los diversos tipos de centros de cobre Cu_A (Cox2 de *Rhodobacter Sphaeroides*; 1M56.pdb; Svensson-EK *et al.*, 2002), Cu_B (Cox1 de *Rhodobacter sphaeroides*; 1M56.pdb; Svensson-EK *et al.*, 2002); y Cu_Z (N₂O reductasa; 2IWK.pdb; Paraskevopoulos *et al.*, 2006). El patrón de colores para los átomos es: azul se para el nitrógeno, rojo para el oxígeno, amarillo para el azufre, morado para yodo, y marrón para el cobre.

7. Centros de cobre Cu_Z [Dell'Acqua *et al.*, 2011; Farrar *et al.*, 1998] (figura 2):

- Cuatro átomos de cobre coordinados por siete histidinas y enlazados mediante un ión de azufre inorgánico.
- Amplia banda de absorción con un máximo a 640 nm, cuando el centro de cobre se encuentra reducido.
- Espectro de EPR con cuatro picos.

Los centros de cobre Cu_A y Cu_B forman parte de los dominios Cox2 y Cox1, respectivamente, de la citocromo c oxidasa (COX). Los centros de cobre Cu_B forman parte de la superfamilia de las oxidasas respiratorias de hemo-cobre. La N_2O reductasa cuenta en su estructura con los centros de cobre Cu_A y Cu_Z .

1.1.2. Las proteínas de cobre azul

Las proteínas de cobre azul (BCPs, del inglés "*Blue Copper Proteins*") o de cobre tipo-1 [Nersissian y Shipp, 2002; Nakamura y Go, 2005; Kosman, 2010] constituyen un amplio grupo dentro de las proteínas de cobre. Esta familia proteica se caracteriza por presentar el centro de cobre tipo-1, además, del plegamiento conocido como tipo cupredoxina o de unión a cobre azul (BCB, del inglés "*Blue Copper-Binding*") [Nersissian y Shipp, 2002], similar al de los dominios de las inmunoglobulinas.

Dentro de esta clase se encuentran las cupredoxinas, [Adman, 1991; Dennison, 2005], consistentes en un único dominio con plegamiento BCB. A ella pertenecen la plastocianina (Pc), la azurina (Az), la pseudoazurina, la rusticianina (Rc), la amicianina (Am) o la halocianina. También son miembros de la familia de las BCPs las proteínas azules de multicobre o MCBPs (del inglés "*Multicopper blue proteins*"), las cuales descienden de las BCPs de dominio único por duplicación génica de estos dominios BCB [Ryden, 1988; Ryden y Hunt, 1993; Murphy *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 2003; Stevens, 2008; Ji y Zhang, 2008]. Las MCBPs incluyen a la nitrito reductasa y a oxidasas multicobre (MCOs) como la lacasa, la ascorbato oxidasa, la ceruloplasmina o la bilirrubina oxidasa.

1.1.2.1. El centro de cobre tipo-1

Como ya se mencionó en el apartado 1.1.1, el centro de cobre tipo-1 o de cobre azul se caracteriza por presentar una serie de propiedades espectroscópicas únicas derivadas de la coordinación particular que el cobre presenta en la proteína [Solomon *et al.*, 2004]. De hecho, en disolución acuosa y en presencia de los ligandos adecuados, el cobre forma complejos en diferentes estados de reducción que difieren tanto en geometría como en número de ligandos. Sin embargo, en sistemas biológicos, el cobre se ha encontrado sólo como cobre reducido Cu(I) y como oxidado Cu(II).

En las proteínas de cobre azul, el plegamiento de la cadena polipeptídica crea una esfera de coordinación inusual que, según la teoría “unión inducida por armazón/ soporte” [Malmström y Vänngård, 1960; Lumry y Eyring, 1954; Malmström, 1994], estabiliza un complejo de cobre forzado. Cuando no existe impedimento estérico, las coordinaciones preferentes para Cu(I) y Cu(II) son la tetraédrica regular y la plana cuadrada, respectivamente. Sin embargo, en los centros de cobre tipo-1, tanto los ligandos como sus conformaciones adoptan generalmente, aunque no siempre, una disposición en tetraedro distorsionado, intermedia entre las coordinaciones predilectas para Cu(I) y Cu(II) [Gray *et al.*, 2000]. Esta conformación permite que la energía de reorganización se reduzca y, por lo tanto, se facilite el intercambio entre ambos estados de oxidación, imprescindible para la catálisis dependiente de cobre [Guss y Freeman, 1983; Garrett *et al.*, 1984; Guss *et al.*, 1986; Shepard *et al.*, 1990; Ryde *et al.*, 1996].

La estabilidad de los complejos metálicos depende de la naturaleza y disposición de los ligandos y del estado de oxidación del metal. Según el concepto pesado-ligero, ácido-base de Pearson [Pearson, 1963] el Cu(I) en las proteínas prefiere los átomos de azufre o iones de los aminoácidos cisteína y metionina. El Cu(II), sin embargo,

puede encontrarse coordinado por átomos de oxígeno y nitrógeno o iones de residuos de tirosina, treonina, histidina, anión hidroxilo y agua. Por tanto, para mantener estable el centro de cobre distorcionado de las BCPs el metal se encuentra coordinado tanto por ligandos que favorecen al Cu(I) como por ligandos que favorecen al Cu(II). De hecho, como ya se mencionó en el apartado 1.1.1, dos nitrógenos imidazoles de dos residuos de histidina y el tiolato de un residuo de cisteína se encuentran siempre ligando fuertemente al cobre en una coordinación prácticamente trigonal plana (figura 1). El cuarto ligando varía entre distintas BCPs, pudiendo tratarse o de un residuo de glutamina (Tipo-1 clase II, figura 1), que también une al cobre fuertemente o bien del tioéster de un residuo de metionina que une al cobre de una forma más débil que los otros tres ligandos (Tipo-1 clase I, figura 1) [Hart *et al.*, 1996]. Por otra parte, mientras que la Az presenta un segundo ligando axial consistente en un oxígeno carbonilo del esqueleto de la proteína (Tipo-1 clase III, figura 1) [Baker, 1988; Crane *et al.*, 2001; Nar *et al.*, 1991], otras BCPs o dominios BCBs carecen de ligando axial [Ducros *et al.*, 1998].

De los ligandos del cobre, una de las dos histidinas, la cisteína y, en caso de existir, el ligando axial se sitúan en el lazo que une las dos hebras β del extremo C-terminal [Dennison, 2008] (figura 3). Parte de este lazo está expuesto a la superficie de la proteína y contribuye a la formación de un área normalmente hidrofóbica que rodea a la histidina y que está implicada en la asociación con sus parejas [Durley *et al.*, 1993; Díaz-Moreno *et al.*, 2005]. La longitud, la secuencia y la estructura de este lazo varían entre los diferentes dominios BCBs, sobre todo en cupredoxinas, siendo la longitud la que define su conformación [Li *et al.*, 2007; Sato *et al.*, 2009]. Además, la estructura y dinámica de este lazo es uno de los factores que influyen en el proceso conocido como transición ácida [Li *et al.*, 2007; Paltrinieri *et al.*, 2013], consistente en la protonación de la histidina en la proteína reducida, con rango de pKa

aproximadamente entre 5 y 7. Este fenómeno conduce a la disociación reversible de este ligando del cobre y a la inactivación biológica de la cupredoxina debido a un drástico incremento del potencial de reducción [Battistuzzi *et al.*, 2002]. La transición ácida se observa en muchas de las BCPs, como la Pc, la amicianina, la pseudoazurina, y la estelacianina [Guss *et al.*, 1986; Zhu *et al.*, 1998; Vakoufari *et al.*, 1994; Merchant *et al.*, 1991].

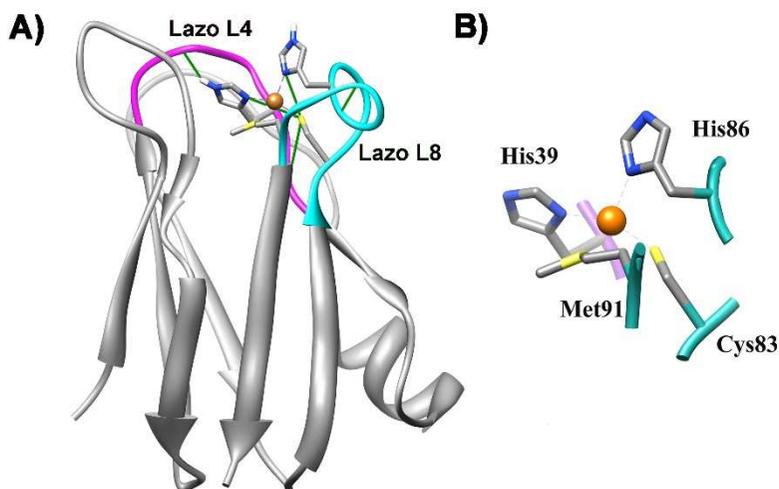


Figura 3. Estructura de Syn-Pc y de su centro de cobre

(A) Estructura de Syn-Pc (código pdb: 1JXD; Bertini^a *et al.* 2001) donde se muestra en morado el lazo L4 y en celeste el L8, así como el centro de cobre. El lazo L8 une las dos hebras β del extremo C-terminal y en él se encuentran tres de los ligandos del cobre: His86, Cys83 y Met39. La His39, cuarto ligando del metal, se sitúa en el lazo L4. En verde se muestran los puentes de hidrógeno en los que participan los ligandos del cobre. **(B)** Mayor detalle del centro de cobre. Los ligandos del metal se representan como palos (“stick”) y el cobre se colorea de marrón. La numeración de los ligandos del cobre se corresponde a la de la misma Syn-Pc.

El centro de cobre se encuentra estabilizado por una extensa red de puentes de hidrógeno (figura 3) esencial para mantener la integridad

del sitio activo [Dong *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2004; Dennison, 2008], además de ejercer una clara influencia sobre los potenciales redox [Botuyan *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2004]. Un puente de hidrógeno característico de las BCPs, es el que se forma entre el átomo de azufre de la cisteína que liga al cobre (L8) y el protón del grupo amida del esqueleto perteneciente a la Asn40, residuo inmediatamente adyacente al ligando histidina, situado en el lazo L4 [Musiani, 2004]. Este enlace resulta fundamental para la estabilidad del centro metálico [Dong *et al.*, 1999].

Mutaciones en los ligandos del cobre modifican las propiedades espectroscópicas de la proteína sin alterar su estructura global [Canter y Gilardi, 1993]. Mientras que el residuo de cisteína es el único ligando esencial en el mantenimiento de las características del cobre azul [Mizoguchi *et al.*, 1992; Lancaster *et al.*, 2009], el ligando histidina más cercano al extremo C-terminal resulta fundamental para las transferencias electrónicas. Los tres residuos restantes, aparte de estar implicados en la unión al cobre, mantienen la integridad del sitio activo, excluyen ligandos exógenos y modulan el potencial redox [Canter y Gilardi, 1993; Hall ^a *et al.*, 1999].

1.1.2.2. El dominio de unión a cobre azul: características y evolución

El dominio BCB o dominio cupredoxina consiste en un barril β formado por entre 6 y 13 hebras β antiparalelas organizadas en dos láminas β y en un motivo en greca [Guss y Freeman, 1983; Ji y Zhang, 2008; Lindley^a, 2001] (figuras 4 y 6). Sin embargo, el contenido en hélices α es bajo o nulo. Los dominios BCB son pequeños, entre 90 y 150 aminoácidos, y su número varía entre las diversas BCPs: las cupredoxinas presentan uno, pero las MCBPs contienen dos (nitrito reductasa), tres (ascorbato oxidasa, lacasa) o seis (ceruloplasmina,

bilirrubina oxidasa) repeticiones de estos dominios BCB ensamblados en una única cadena polipeptídica (figura 4). Aunque la homología entre los diversos dominios BCB existentes en la naturaleza es de sólo el 10% (figura 5), la estructura tridimensional del mismo se mantiene altamente conservada [Nersissian y Shipp, 2002] (figura 4B).

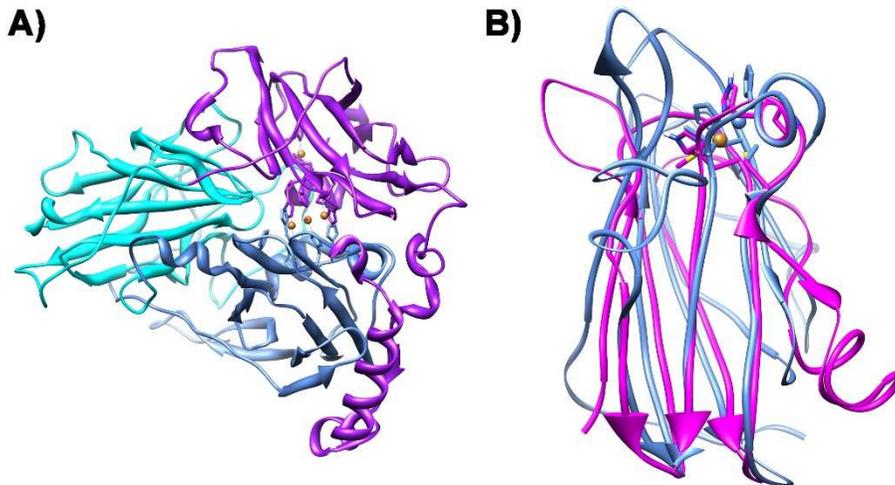


Figura 4. Conservación de la estructura de los dominios BCB entre Syn-Pc y la bilirrubina oxidasa

(A) Estructura tridimensional de la bilirrubina oxidasa de *Myrothecium verrucaria* (código pdb: 2XLL; Cracknell *et al.*, 2011). Se muestra en diferentes colores cada uno de los tres dominios BCB que forman la proteína. Los átomos de cobre están coloreados en marrón. **(B)** Superposición de las estructuras de Syn-Pc, en magenta, (código pdb: 1JXD; Bertini^a *et al.*, 2001), y de uno de los dominios BCBs de la bilirrubina oxidasa, en azul. Los átomos de cobre se colorean en marrón y en azul para Syn-Pc y para la bilirrubina oxidasa, respectivamente.

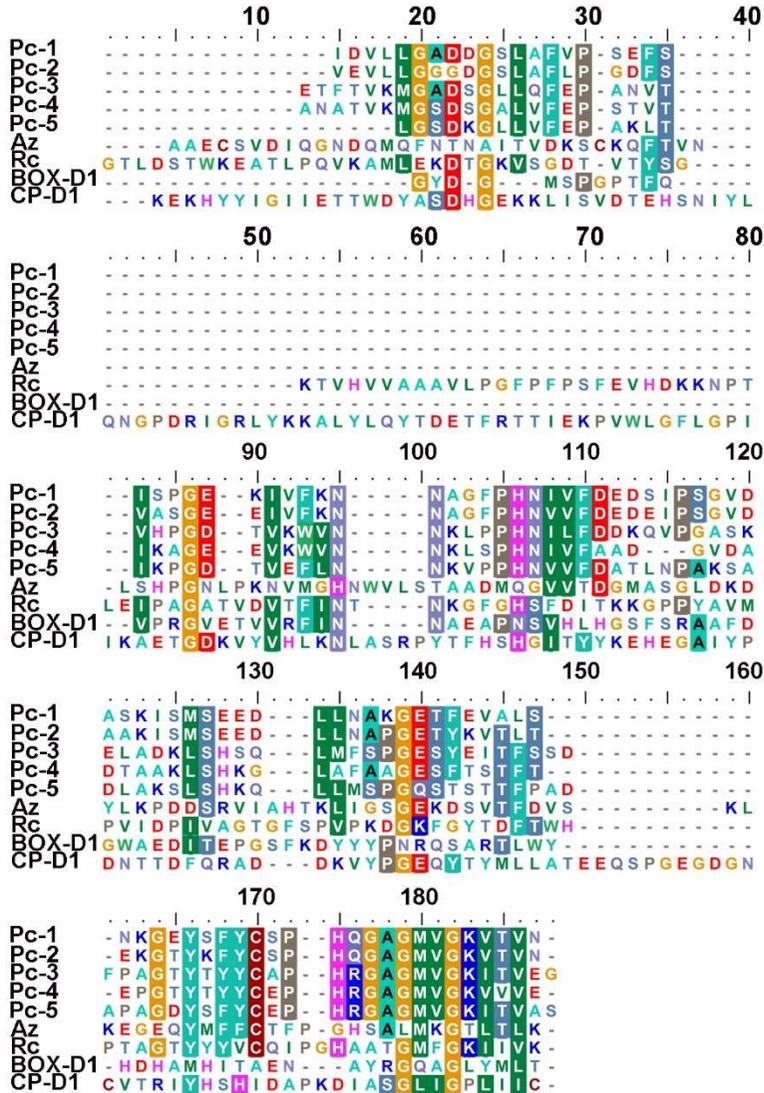


Figura 5. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de algunos representantes de la familia de las proteínas de cobre azul.

Pc-1: plastocianina de álamo (*P. nigra*), Pc-2: plastocianina de espinaca (*S.oleracea*), Pc-3: plastocianina de *Phormidium laminosum* (*P. laminosum*), Pc-4: plastocianina de *Synechocystis* sp.PCC6803, y Pc-5: plastocianina de *Anabaena variabilis* (*A. variabilis*), Az: Azurina de *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), Rc: rusticianina de *Thiobacillus ferrooxidans* (*T. ferrooxidans*), y BOX-D1: dominio 1 de la billirrubina oxidasa de *Myrothecium verrucaria* (*M. verrucaria*), y CP-D1: dominio 1 de la ceruloplasmina humana.

Durante el ensamblaje evolutivo de las proteínas multidominio, el centro de cobre tipo-1 se conservó en algunos de los dominios BCB, se perdió en otros, o, incluso, se sustituyó por centros de cobre tipo-2 o se asoció a otros para formar un centro de cobre trinuclear en las MCOs [Rosenzweig y Sazinsky, 2006; Savelieff et al., 2008]. Mientras que el centro tipo-1 se encuentra embebido en el dominio, los otros tipos de centros de cobre se sitúan en las regiones interdominios.

1.1.2.3. Cupredoxinas

Como ya se ha mencionado, las cupredoxinas son BCPs formadas por un único dominio BCB y un único centro de cobre tipo-1. Son proteínas solubles, que funcionan como transportadores de electrones en gran variedad de sistemas de interconversión de energía en el periplasma de bacterias o en las membranas del cloroplasto. Hasta la fecha, no se han encontrado cupredoxinas en vertebrados, nematodos, insectos u hongos [Nersissian y Shipp, 2002].

A partir de ahora nos concentraremos en la plastocianinas, al ser estas el modelo experimental usado en este trabajo.

1.1.2.3.1. Plastocianina

Las plastocianinas son cupredoxinas de unos 10 kDa de tamaño, presentes en cianobacterias, algas verdes y en el cloroplasto de plantas. Participan como transportadores móviles de electrones entre el citocromo *f* del complejo citocromo b_6/f y el $P700^+$ del fotosistema I (PSI) [Redinbo et al., 1994]. Mientras que en plantas la plastocianina es la única proteína que lleva a cabo esta función, en algas eucariotas y en cianobacterias puede ser sustituida por el citocromo c_6 en condiciones de déficit de cobre [Wood, 1978; Merchant y Bogorad, 1986; Redinbo et al., 1994; Hervás et al., 2003].

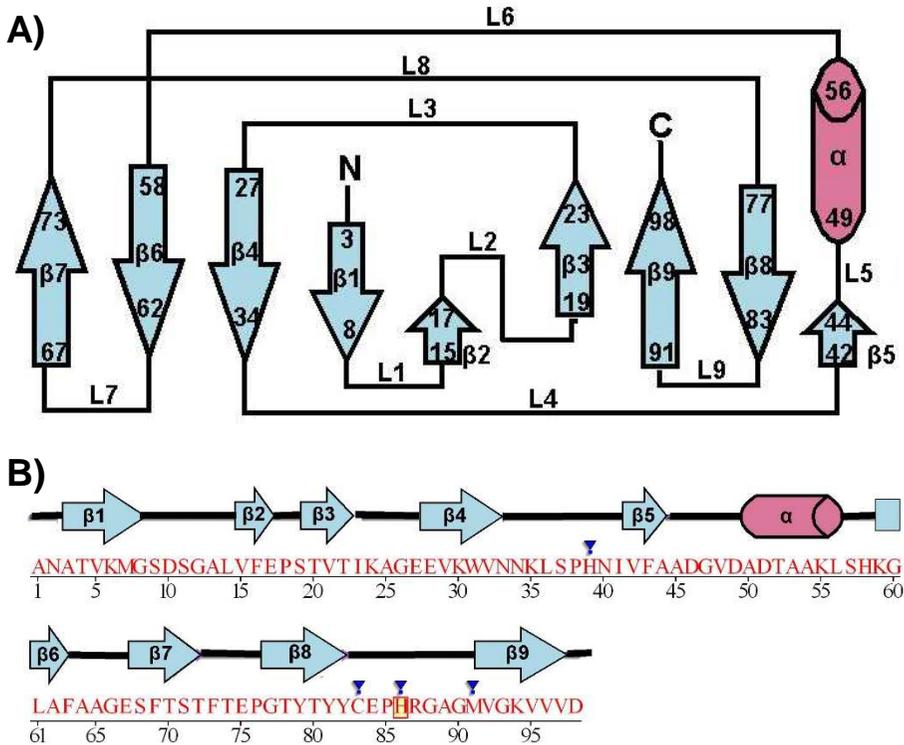


Figura 6. Elementos de estructura secundaria y su correspondencia con la secuencia de aminoácidos.

(A) Diagrama topológico de Syn-Pc. **(B)** Correspondencia entre la secuencia y la estructura secundaria de Syn-Pc. Diagramas realizados con la aplicación DIA (<http://dia-installer.de/index.html.es>) a partir del obtenido con PDBSum (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>; Laskowski, 2007) a partir de la estructura de Syn-Pc con código pdb 1JXD [Bertini^a *et al.*, 2001].

Las plastocianinas de plantas son sintetizadas en el citosplasma como una proteína precursora, de 160-170 aminoácidos, que incluye un polipéptido de tránsito de 60-70 residuos que dirige al precursor hacia el lumen tilacoidal, donde cumple con su función. En cianobacterias dicha secuencia líder se compone de unos 30 aminoácidos [Nersissian y Shipp, 2002].

Según el alineamiento de secuencia de la figura 5 existen residuos muy conservados entre las diferentes Pc, entre ellos los ligandos del cobre (His39, Cys83, His86, Met91 en Syn-Pc). Los residuos ionizables son los que muestran mayor variabilidad, de forma que la carga global de las Pc depende del organismo de origen. Mientras que las Pc de organismos eucariotas son ácidas (pI 4), las de cianobacterias son casi neutras (pI 6) o básicas (pI 9) [Sykes, 1985; Medina *et al.*, 1993; Díaz *et al.*, 1994].

Las estructuras disponibles de estudios cristalográficos o de NMR [Guss y Freeman, 1983; Garrett *et al.*, 1984; Bond *et al.*, 1999] muestran que todas las plastocianinas comparten el mismo plegamiento tipo cupredoxina o BCB, con 8-9 hebras β y una pequeña hélice α unidas mediante lazos (figuras 3, 4 y 6). El átomo de cobre se localiza en un bolsillo formado por residuos hidrofóbicos muy conservados que protegen al átomo de cobre del solvente, siendo la His86 (numeración correspondiente a Syn-Pc) el único ligando que sobresale. Dicha región es conocida como zona hidrófoba, cara norte o sitio 1 (figura 10), y es por donde tiene lugar la transferencia de electrones desde el citocromo *f* a la plastocianina y desde esta al PSI a través de la His86 [Redinbo *et al.*, 1994].

La Pc también interacciona con sus parejas fisiológicas por su denominada cara este. Esta región, conocida también como zona electrostática o sitio 2, se encuentra cargada negativamente en plantas y algas verdes, mientras que en cianobacterias la mayor parte de los residuos de esta zona son reemplazados por otros básicos o neutros, o se neutralizan por la presencia de residuos de carga opuesta. Mientras que el sitio 1 está siempre implicado en la interacción con el citocromo *f*, la implicación del sitio 2 varía entre organismos [Díaz-Moreno *et al.*, 2005].

1.2. Aplicaciones biotecnológicas de las proteínas de cobre azul: biosensores electroquímicos

Las enzimas se han convertido en unos importantes catalizadores para el diseño de electrodos de celdas bioenergéticas [Bullen *et al.*, 2006] y biosensores [Chaubey y Malhotra, 2001; Shleev *et al.*, 2005]. Ello es debido a que son más específicos que los catalizadores abióticos tradicionales, prácticamente no se afectan por la presencia simultánea de fuel y oxidante y, por regla general, no se desactivan por las impurezas. Además, pueden usar diferentes fuentes de energía y condiciones de trabajo (figura 7A).

Los biosensores son dispositivos basados en un componente biológico que reconoce un analito específico resultando en una catálisis o unión. Dicho evento produce una serie de cambios físico-químicos que son detectados por un transductor, que, en respuesta, produce una señal electrónica directamente proporcional a la concentración del analito [Ronkainen *et al.*, 2010] (figura 7A).

Los biosensores electroquímicos son aquéllos en los que se transforma energía química directamente a eléctrica mediante reacciones electroquímicas mediadas por enzimas o microorganismos [Bullen *et al.*, 2006; Minteer *et al.*, 2007; Osman *et al.*, 2011]. La conversión se produce mediante el acoplamiento de una reacción de oxidación que aporta electrones a un ánodo con una reacción de reducción que utiliza dichos electrones en el cátodo. Estas dos reacciones están electroquímicamente separadas dentro del sistema para forzar el flujo de electrones a través de un circuito externo, mientras que el movimiento de iones dentro del sistema mantiene el balance de carga y completa el circuito eléctrico (figura 7B).

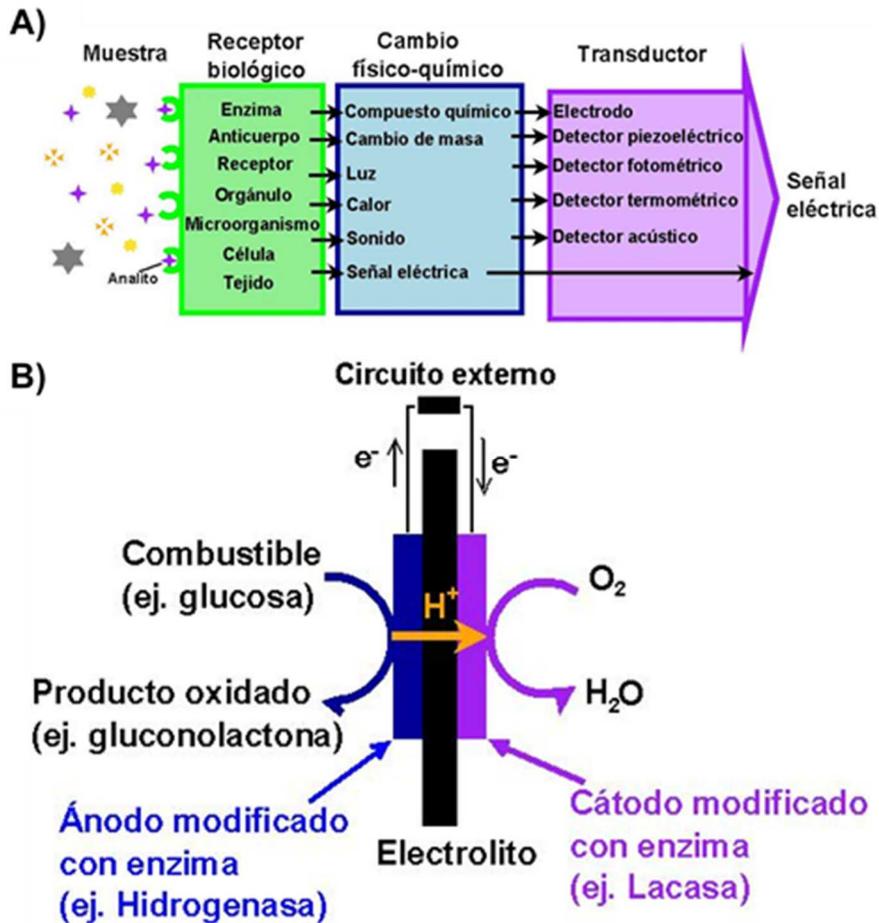


Figura 7. Ejemplos de biosensor.

(A) Esquema general de un biosensor donde se indican los posibles tipos de muestra, receptor biológico, reacción físico-química originada y transductor a corriente eléctrica. Figura adaptada de Chaubey y Malhotra, 2001. **(B)** Esquema general de un biosensor en el que se acopla la reacción de oxidación catalizada por la hidrogenasa en el ánodo con la llevada a cabo por la lacasa en el cátodo. Figura adaptada de Minteer *et al.*, 2007.

La aplicación de los sensores electroquímicos basados en enzimas se encuentra muy afectada por la limitada vida media de las proteínas implicadas [Rubenwolf *et al.*, 2011]. Existen diversas técnicas para incrementar la estabilidad de las enzimas, incluyendo

modificaciones de la proteína en sí o por diversos sistemas de inmovilización [Moehlenbrock y Minter, 2008].

Debido a que la función del centro de cobre tipo-1 en proteínas es la transferencia de un electrón a otro agente fisiológico u otro centro metálico dentro de la misma proteína, las enzimas de cobre han sido ampliamente estudiadas y usadas como catalizadores formando parte de los biosensores. Para este propósito se han estudiado BCPs de un único dominio, como la Az, o de varios, como las lacasas, ascorbato oxidasa, bilirrubina oxidasa o ceruloplasmina [Shukla, 2004].

1.3. Termoestabilidad proteica

1.3.1. Termoestabilidad termodinámica y cinética

La temperatura es uno de los factores desestabilizantes estudiados con mayor profundidad. La estabilidad térmica de una proteína o enzima, involucra tanto a la estabilidad termodinámica como a la cinética [Polizzi *et al.*, 2007].

La estabilidad termodinámica se define como la diferencia en energía libre de Gibbs entre los estados plegado (F) y desplegado (U) de una proteína (ΔG_{FU}). ΔG_{FU} puede determinarse si se considera un modelo de desplegamiento en dos estados: $F \leftrightarrow U$. La constante de equilibrio de este proceso (K_U) se define como $K_U = [U]/[F]$, y se relaciona con ΔG_{FU} a través de la ecuación de Lewis: $\Delta G_{FU} = -RT \ln K_U$, donde R es la constante de los gases y T la temperatura absoluta. Este modelo implica, por una parte, que el desplegamiento sea reversible, y, por otra, que no existan estados intermedios entre las formas nativa y desplegada [Sternier y Liebl, 2001].

Los parámetros termodinámicos asociados a un proceso de desplegamiento térmico se pueden obtener usando diversas técnicas

como la calorimetría diferencial de barrido (DSC) o técnicas espectroscópicas como el dicroísmo circular (CD) o la espectroscopía de fluorescencia. Mientras que por DSC se obtiene el cambio de entalpía de desplegamiento (ΔH_{cal}), el CD o la espectroscopía de fluorescencia permiten la obtención de la entalpía de van't Hoff (ΔH^{vH}):

$$d(\ln K)/d(1/T) = -\Delta H^{\text{vH}}/R$$

Ambos parámetros son complementarios, de forma que $\Delta H_{\text{cal}}/\Delta H^{\text{vH}} \approx 1$ apoya el modelo en dos estados [Privalov, 1979].

Para la determinación de ΔG_{FU} para un proceso de desplegamiento térmico en dos estados, se aplica la ecuación de Gibbs-Helmholtz:

$$\Delta G_{\text{FU}} = \Delta H_{\text{m}}(1 - T/T_{\text{m}}) - \Delta C_{\text{p}}[(T_{\text{m}} - T) + T \ln(T/T_{\text{m}})]$$

Siendo ΔH_{m} el valor de ΔH a la temperatura de desplegamiento (T_{m}) y ΔC_{p} la capacidad calorífica. T_{m} es un parámetro ampliamente usado para comparar las termoestabilidades de diferentes proteínas. Se define como la temperatura a la que el 50% de la población proteica se encuentra en su estado desplegado. Por tanto, a esta temperatura $K_{\text{U}}=1$ y $\Delta G_{\text{FU}} = 0$.

Sin embargo, la mayor parte de las proteínas mesofílicas y termofílicas se despliegan de un modo irreversible, debido a que la forma desplegada de la proteína puede sufrir procesos de proteólisis o agregación [Sanchez-Ruiz, 2010]. Según el modelo de Lumry–Eyring, la proteína acabará cayendo en un estado final y no funcional: $F \leftrightarrow U \leftrightarrow I$, donde I representa dicho estado final e irreversible.

La estabilidad cinética se basa en la existencia de una barrera energética entre los estados nativo y desplegado, necesaria para que la función proteica se mantenga en una escala de tiempo fisiológicamente

relevante. La termoestabilidad cinética se expresa frecuentemente con el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) a una temperatura determinada.

Se considera normalmente que los parámetros termodinámicos no se pueden obtener para las proteínas que muestran un desplegamiento irreversible, siendo sólo posible la consideración de estabilidad cinética. Sin embargo, si se asume que el paso irreversible es mucho más lento que el proceso reversible inicial y que tiene lugar principalmente a una temperatura muy superior a la T_m , se pueden obtener los parámetros termodinámicos del paso reversible [Sanchez-Ruiz, 1992; Milardi *et al.*, 1994].

1.3.2. Organismos mesofílicos y termofílicos

La importancia de entender las bases moleculares responsables de la estabilidad térmica en proteínas termofílicas en comparación con sus homólogas mesofílicas se ha convertido en una de las tareas más importantes para la comunidad científica, ya que permite conocer cuáles son los mecanismos usados por la naturaleza para estabilizar proteínas en general. Además, la adquisición de tales conocimientos resulta esencial para el desarrollo de aplicaciones médicas o biotecnológicas que precisen del diseño de enzimas capaces de trabajar a temperaturas elevadas [Haki y Rakshit, 2003].

Según la temperatura óptima de crecimiento (TOC), los organismos tolerantes al calor se separan frecuentemente en dos clases: termófilos (moderados), con una TOC entre 45 y 80 °C, e hipertermófilos (o termófilos extremos) con una TOC superior a 80 °C. Los organismos mesofílicos se definen como aquellos que muestran una TOC entre 15 y 45 °C, y los psicrófilos presentan una TOC inferior a 15 °C [Vieille y Zeikus, 2001; Li *et al.*, 2005]. Los organismos hipertermófilos pertenecen principalmente al reino biológico Archea, aunque existen dos géneros de

Eubacterias hipertermófilas: *Thermotoga* [Zhaxybayeva *et al.*, 2009] y *Aquifex* [Deckert *et al.*, 1998]. Los organismos termófilos se reparten entre los reinos Eubacteria, Archea, y algunos hongos [Luke *et al.*, 2007].

Las proteínas termofílicas y sus homólogas mesofílicas comparten una homología de secuencia entre el 40 y 85%. Igualmente, sus estructuras tridimensionales son superponibles y comparten el plegamiento básico y característico de la familia proteica a la que pertenecen. Además, el punto de máxima estabilidad para proteínas homólogas provenientes de organismos psicrófilos, mesofílicos y termófilos se alcanza alrededor de los 20 °C [Feller, 2010]. Sin embargo, las proteínas de los organismos termófilos e hipertermófilos presentan una mayor resistencia a la proteólisis y a la desnaturalización química, además de una estabilidad intrínseca a temperaturas elevadas que les permite mantener su estructura y función bajo estas condiciones. De hecho, las enzimas termoresistentes son normalmente activas entre 60 y 80 °C, dejando de funcionar de forma apropiada a temperaturas inferiores a 40 °C.

1.3.3. Mecanismos de termoestabilización proteica

En 1975 se publicó el primer análisis de las posibles causas de la mayor estabilidad de las proteínas provenientes de organismos termófilos [Perutz y Raidt, 1975]. Desde entonces, muchos han sido los estudios teóricos y experimentales que han tenido como finalidad aclarar las bases que determinan la termoestabilidad. Sin embargo, esta cuestión sigue siendo una materia comprendida parcialmente. Los distintos estudios pueden clasificarse en dos grupos: aquellos que examinan una única proteína termofílica, comparando su estructura con la de uno o más homólogos mesofílicos, y aquellos análisis computacionales que utilizan datos de un grupo de proteínas con la finalidad de obtener conclusiones

generales [Greaves y Warwicker, 2007]. De todos ellos se concluye que no existen aminoácidos nuevos, ni modificaciones covalentes o motivos estructurales únicos en las proteínas de organismos termófilos y extremófilos que expliquen su alta estabilidad respecto a sus homólogas mesofílicas. De hecho, la mayor estabilidad de las proteínas termofílicas se debe a la existencia de sutiles redistribuciones de las mismas interacciones intramoleculares requeridas para la estabilización proteica a temperaturas moderadas.

Las diferentes familias de proteínas adoptan distintos mecanismos para adaptarse a las altas temperaturas. Estudios computacionales englobando grandes grupos de proteínas pertenecientes a diversas familias proteicas indican que la única regla es el incremento en el número de pares iónicos al aumentar la temperatura de crecimiento del organismo [Pack y Yoo, 2004; Szilagyi y Zavodszky, 2000]. Esta afirmación contrasta con un gran número de estudios comparativos entre una proteína termofílica concreta y su homóloga mesofílica. De ellos se deriva que la termoestabilidad es una propiedad adquirida por algunas proteínas mediante la combinación de varias y muy pequeñas modificaciones estructurales resultado de la sustitución de algunos aminoácidos por otros y por la modulación de las interacciones comunes a todas las proteínas [Matsumura *et al.*, 1989]. Las aparentes contradicciones de tales conclusiones refleja el hecho de que los diferentes mecanismos de estabilización adoptados por cada familia se compensan entre sí dando lugar a una diferencia estadísticamente no significativa cuando se considera un grupo de proteínas de diversas familias [Pack y Yoo, 2004].

Los mecanismos implicados en la estabilización proteica engloban, entre otros a:

1. Interacciones hidrofóbicas: El efecto hidrofóbico se considera como la principal contribución al plegamiento y a la estabilidad proteica

[Yang *et al.*, 2013]. La hidrofobicidad de una proteína se expresa como la razón entre la superficie no polar enterrada y el total de superficie no polar de la molécula [Goodenough y Jenkins, 1991].

Las proteínas homólogas de organismos termófilos y mesófilas comparten una estabilidad basal originada por el núcleo proteico hidrofóbico, normalmente mucho más conservado que las zonas expuestas al solvente. Por tanto, las interacciones estabilizantes en proteínas termofílicas se localizan principalmente en las zonas en contacto con el solvente, menos conservadas [Vieille y Zeikus, 2001]. Sin embargo, existe una correlación directa entre la hidrofobicidad total de una proteína y su termoestabilidad. De hecho, cada grupo metilo adicional enterrado en el interior de la molécula supone un incremento medio estimado en estabilidad de $5,44 \pm 2,09$ kJ mol⁻¹ [Pace, 1992]. Es por ello que el contenido en aminoácidos hidrofóbicos es ligeramente mayor en proteínas termofílicas [Chakravarty y Varadarajan, 2000].

2. Interacciones electrostáticas: Las fuerzas electrostáticas son principalmente de tres tipos: carga-carga, carga-dipolo y dipolo-dipolo. Las típicas interacciones carga-carga entre residuos de cargas opuestas son conocidas como puentes salinos [Li *et al.*, 2005].

La contribución de los puentes salinos a la energía libre de la estabilidad proteica está sujeta a controversia [Ge *et al.*, 2008; Kumar y Nussinov, 1999; Marqusee y Sauer, 1994]. Por una parte, existen estudios que apoyan la teoría de que los puentes salinos expuestos al solvente parecen tener poca participación en la estabilización proteica [Sun *et al.*, 1991], mientras que aquellos que se encuentran parcial o totalmente inaccesibles muestran una mayor capacidad de estabilización [Kumar y Nussinov, 1999; Marqusee y Sauer, 1994]. Por otro lado, en la bibliografía se pueden encontrar excepciones a estas afirmaciones [Makhatadze *et al.*, 2003; Waldburger *et al.*, 1995]. De hecho, en la superficie de las proteínas termofílicas e hipertermofílicas existe una

mayor proporción de residuos cargados en comparación con sus homólogas mesofílicas.

La existencia de redes [Zhou, 2002; Horovitz *et al.*, 1990], también es un importante factor a la hora de definir el papel que los puentes salinos tienen en la estabilidad proteica. A temperatura ambiente, para un único par iónico, el coste de la desolvatación es ligeramente mayor o igual que la energía libre de la interacción electrostática [Zhou, 2002]. Por tanto, el par iónico solitario desestabiliza la estructura plegada, o no tiene efecto alguno. Sin embargo, cuando se añade un segundo par iónico, la energía de las interacciones electrostáticas supera el coste de desolvatación, y la red de puentes salinos estabiliza la estructura. Dichas redes de puentes salinos se han observado con mayor frecuencia en las proteínas termofílicas e hipertermofílicas [Priyakumar *et al.*, 2010] porque resultan energéticamente más favorables que un número equivalente de pares iónicos aislados [Yip *et al.*, 1995].

Por tanto, la mayor proporción de residuos cargados en la superficie de las proteínas termofílicas e hipertermofílicas suele implicar una mayor formación de redes, en comparación con sus homólogas mesofílicas [Jelesarov y Karshikoff, 2009; Alsop *et al.*, 2003; Karshikoff y Ladenstein, 2001; Szilagyi y Zavodszky, 2000]. Se ha especulado que ello se debe a la caída de la constante dieléctrica del agua (ϵ_s) a altas temperaturas. Dado que la constante dieléctrica de la proteína (ϵ_p) permanece constante [Karshikoff y Ladenstein, 2001], ello se traduce en un menor coste de desolvatación y un incremento de la fuerza de las interacciones entre cargas a temperaturas elevadas en comparación con a temperatura ambiente [Salari y Chong, 2012; Priyakumar *et al.*, 2010; Ge *et al.*, 2008; Elcock, 1998]. Por otro lado, existen también estudios que determinan que el incremento en interacciones electrostáticas en la superficie de las proteínas termofílicas crea una barrera entrópica para el

desplegamiento, debido a una reducción de la capacidad calorífica de desplegamiento (ΔC_p) [Chan *et al.*, 2011; Missimer *et al.*, 2007; Luke *et al.*, 2007; Zhou, 2002]. En el trabajo realizado por Zhou (2002) ambas afirmaciones son unificadas.

Como ya se mencionó, las fuerzas electrostáticas incluyen también a las interacciones dipolo-dipolo y carga-dipolo. Las hélices presentan un momento dipolar que viene dado por la suma de los momentos dipolares microscópicos, μ_i , de cada uno de los enlaces peptídicos que contiene [Hol *et al.*, 1978]. Por tanto, la magnitud del dipolo de la hélice en vacío es directamente proporcional al número de enlaces peptídicos que la forman. Las proteínas termofílicas presentan hélices más largas que contribuyen a la cohesión de la matriz proteica [Vieille y Zeikus, 2001].

De la misma forma, la introducción de residuos con carga negativa cerca del extremo N-terminal de la hélice y de cargas positivas cerca del C-terminal estabilizan las hélices mediante interacciones dipolo- carga [Vieille y Zeikus, 2001].

Las hebras β también presentan un momento dipolar, con un extremo C-terminal parcialmente negativo y un N-terminal parcialmente positivo. Un incremento del momento dipolar en estas estructuras secundarias se puede conseguir posicionando un residuo cargado positivamente en el extremo N-terminal y negativamente en el C-terminal, con lo que se aumentaría las interacciones dipolares entre hojas β o entre estas y hélices α [Farzadfard *et al.*, 2008].

3. Puentes de hidrógeno: Los puentes de hidrógeno clásicos se forman entre un átomo de hidrógeno unido a un átomo electronegativo (donador de puentes de hidrógeno) y otro átomo electronegativo (aceptor de puentes de hidrógeno). Se establecen tanto entre cadenas laterales de la proteína como entre estas y las moléculas de agua del solvente, así

como entre los grupos amino y carbonilo del esqueleto polipeptídico. Están normalmente definidos por una distancia inferior a 0,3 nm entre el donador y el aceptor, y por un ángulo donador-hidrógeno-aceptor menor a 90 °C [Vieille y Zeikus, 2001].

El valor de la contribución media de un puente de hidrógeno entre cadenas laterales proteicas se encuentra en torno a $2,09 \pm 2,9$ kJ mol⁻¹ [Takano *et al.*, 2003], mientras que los puentes de hidrógeno en el esqueleto de una hélice y de una hebra β contribuyen respectivamente con 5,4 y 5,8 kJ mol⁻¹ [Fu *et al.*, 2006; Gao y Kelly, 2008; Bowie, 2011].

La fuerza de un puente de hidrógeno depende del microambiente en el que se encuentra [Gao *et al.*, 2009; Gromiha *et al.*, 2013], de forma que su energía libre puede verse incrementada hasta en 5,0 kJ mol⁻¹ al pasar de estar expuesto al solvente a enterrado en un ambiente hidrofóbico [Gao *et al.*, 2009].

Junto con el efecto hidrofóbico, los puentes de hidrógeno son las principales fuerzas estabilizantes [Pace, 2009], de forma que la termoestabilidad de las proteínas se correlaciona con el número de puentes de hidrógeno [Vogt *et al.*, 1997]. De hecho, proteínas termofílicas presentan un mayor número de puentes de hidrógeno que las mesofílicas [Gromiha *et al.*, 2013]. Sin embargo, existen estudios computacionales comparados que discrepan, indicando que entre proteínas mesofílicas y termofílicas no hay diferencia en el número de puentes de hidrógenos, sino que es el número de donadores y aceptores insatisfechos lo que disminuye ligeramente en proteínas de organismos termófilos [Szilagyi y Zavodszky, 2000].

4. Puentes disulfuro: La introducción de un puente disulfuro en una proteína incrementa la energía libre del estado desplegado, conduciendo a un aumento en la energía libre de la proteína haciéndola conformacionalmente más estable [Trivedi *et al.*, 2009]. Se ha propuesto

que el efecto estabilizador de los puentes disulfuro se debe principalmente a un efecto entrópico, de forma que la eliminación de un puente disulfuro por reducción o por mutación resulta en un incremento de la entropía del estado desplegado según la relación:

$$\Delta S = -2,1 - (3/2)R\ln(n)$$

donde n es el número de residuos entre las dos Cys que forman el enlace [Pace *et al.*, 1988; Matsumura *et al.*, 1989; Trivedi *et al.*, 2009].

El papel que los puentes disulfuros juegan en la estabilización de las proteínas termofílicas se sustenta en la existencia de una mayor proporción de estos enlaces covalentes en proteínas de organismos termófilos [Beeby *et al.*, 2005].

5. Unión de un metal: Los centros metálicos aportan nuevos enlaces, con energía variable, a la topología de la molécula y, por tanto, estabilizan las proteínas. La eliminación del metal de la estructura proteica conlleva una disminución en la temperatura de desplegamiento [Noyer y Putnam, 1981; Keating *et al.*, 1988; Feio *et al.*, 2004; Feio *et al.*, 2006; Avvaru *et al.*, 2009; Teilum *et al.*, 2009]. De hecho, proteínas pertenecientes a la familia de proteínas intrínsecamente desordenadas se pliegan sólo cuando se les une su cofactor [Permyakov, 2008]. Algunas enzimas mesofílicas carecen de átomos metálicos presentes en sus homólogas termofílicas. Estos metales no son necesarios para ejercer su función y su eliminación supone una menor temperatura de desplegamiento [Fujii *et al.*, 1997].

6. Mayor empaquetamiento: El empaquetamiento se considera un importante indicador de la estabilidad de una proteína. Dicho empaquetamiento se refleja en la existencia de espacios no ocupados por ningún átomo de la proteína ni por su radio atómico [Rother *et al.*, 2009; Coleman, 2010]. Estos espacios vacíos pueden encontrarse cerrados en el interior de la matriz proteica, constituyendo cavidades, o

abiertas al exterior, formando los denominados bolsillos [Liang y Dill, 2001].

Un mejor empaquetamiento proteico conlleva un incremento tanto las interacciones hidrofóbicas como las atracciones de van der Waals en el núcleo de la proteína. De la misma forma, un mayor empaquetamiento se traduce también en una menor razón entre el área accesible al solvente (SAS) de la proteína y el área accesible al solvente de una esfera con el mismo volumen que la proteína [Querol *et al.*, 1996; Vogt y Argos, 1997; Sterner y Liebl, 2001; Pace, 2009].

En las proteína termofílicas se ha observado que la mayor compactación en comparación con sus homólogas mesofílicas se consigue mediante el acortamiento de uno o más lazos; incrementando el número de átomos enterrados en el interior de la molécula y, por lo tanto, inaccesibles para el solvente; optimización del empaquetamiento de las cadenas laterales en el interior; y eliminación de cavidades innecesarias [Sen y Nilsson, 2012].

7. Mayor rigidez: La estabilidad de proteínas termofílicas están, por lo general, ligada a una mayor rigidez estructural a temperatura ambiente [Bonisch *et al.*, 1996; Gershenson *et al.*, 2000; Manco *et al.*, 2000; Radestock y Gohlke, 2008]. Dado que la función de una proteína requiere cierta flexibilidad, dicha rigidez a temperatura ambiente explica porqué las enzimas termofílicas se inactivan a bajas temperaturas. Sin embargo, cuando la temperatura ambiente se acerca a la temperatura a la que el enzima muestra su mayor actividad, la proteína es suficientemente flexible como para llevar a cabo su función [Beaucamp *et al.*, 1997]. Por tanto, este incremento en la rigidez es esencial para mantener su estructura catalíticamente activa a alta temperatura. El incremento en la rigidez se consigue mediante la estabilización de las hélices α , optimización de las interacciones electrostáticas, reducción de la tensión conformacional, etc.

8. Reducción de la entropía de desplegamiento: El desplegamiento de las proteínas a alta temperatura es causada por un fuerte incremento de la entropía, lo que disminuye el cambio de energía libre de la reacción de despliegue. Las proteínas termofílicas resultan más estables que sus homólogas mesofílicas mediante una disminución de su entropía de desplegamiento [Matthews *et al.*, 1987; Sawle y Ghosh, 2011].

Diversos estudios concuerdan en el hecho de que el estado desnaturalizado es más compacto en proteínas termofílicas que en mesofílicas, y que retiene cierta estructura residual [Sawle y Ghosh, 2011].

Otra explicación se centra en la diferente composición de aminoácidos entre ambas proteínas homólogas, lo que conduce a una reducción de la entropía del estado desplegado [Matthews, 1987]. En el estado desplegado, la glicina es el residuo que tiene una mayor entropía conformacional al carecer de cadena lateral. En el proceso de plegamiento, se necesita mucha más energía para restringir el movimiento de la glicina que de cualquier otro residuo. Los residuos de prolina están limitados a unas pocas configuraciones y tienen la menor entropía conformacional [Watanabe *et al.*, 1997; Ge y Pan, 2009]. La presencia de residuos de prolina restringen las configuraciones permitidas para el residuo anterior en la secuencia. La forma nativa de una proteína se estabiliza en 2- 4 kJ mol⁻¹ cuando se introduce un residuo de prolina en una localización que no altere la estructura proteica [Nicholson *et al.*, 1992].

La compactación de la estructura nativa mediante el acortamiento de lazos, el anclaje de los extremos de la proteína, y el anclaje de los extremos N- y C-terminales conducen también a una reducción en la entropía de desplegamiento [Berezovsky *et al.*, 2005]. Por su parte, el incremento en interacciones electrostáticas en la superficie de las proteínas termofílicas induce una reducción de la capacidad

calorífica de desplegamiento, lo que se traduce, también, en una disminución de la entropía de desplegamiento [Chan *et al.*, 2011; Missimer *et al.*, 2007; Luke *et al.*, 2007; Zhou, 2002].

10. Composición en aminoácidos: Las características de una proteína están relacionadas con su composición en aminoácidos. Por tanto, todas las estrategias adoptadas por las proteínas termofílicas explicadas anteriormente se reflejan en una composición de aminoácidos distinta a la que muestran las proteínas mesofílicas [Zhou *et al.*, 2008]. De hecho, una diferencia de sólo el 5% en el contenido de aminoácido puede resultar en una variación en la T_m de 10 °C [Sen y Nilsson, 2012].

El contenido total en aminoácidos hidrofóbicos es mayor en proteínas termofílicas que en mesofílicas [Chakravarty y Varadarajan, 2000]. Asimismo, el mayor contenido de residuos de Ala en proteínas termofílicas refleja el hecho de que este residuo es considerado el mejor formador de hélices α . Esto, unido al hecho de que los residuos de Gly dejan volúmenes vacíos o cavidades en el interior de la estructura proteica y que es el residuo con mayor entropía conformacional [Creighton, 1997], existe una tendencia a la sustitución de residuos de Gly por Ala en las proteínas termofílicas [Vieille y Zeikus, 2001], encontrándose los de alanina principalmente enterrados en la estructura proteica [Pack y Yoo, 2004]. Los residuos de prolina, como ya se mencionó, pueden adoptar unas pocas conformaciones y tiene una menor entropía conformacional, lo cual restringe el movimiento sólo del residuo precedente [Watanabe *et al.*, 1997]. Un mayor contenido en prolina induce un incremento en la estabilidad y rigidez proteica. La cadena lateral de la isoleucina puede adoptar tres rotámeros frente a los dos de la leucina, por lo que los residuos de isoleucina son preferidos por las proteínas termofílicas para formar parte de sus regiones hidrofóbicas, ya que puede dar lugar a un mayor empaquetamiento [Chakravarty y Varadarajan, 2000; Kumar *et al.*, 2000].

Los aminoácidos asparragina, glutamina, metionina, y cistáina son termolábiles y tienden a la deaminación (Asn y Gln) o a la oxidación (Met y Cys) [Kumar *et al.*, 2000], por lo que no suelen abundar en las proteínas termofílicas, y los que hay suelen estar enterrados [Russell *et al.*, 1997]. Existe una alta tendencia a la sustitución de los residuos de metionina por alanina o leucina, y los de cisteína por alanina, valina e isoleucina en las proteínas termofílicas [Gromiha *et al.*, 1999]. Sin embargo, se ha detectado una mayor proporción de residuos de cisteína cuando forman parte de agrupaciones en estas proteínas [Rosato *et al.*, 2002].

Los residuos polares no cargados, sobre todo serina, treonina y glutamina se encuentran en menor medida en las proteínas termofílicas [Chakravarty y Varadarajan, 2000; Kumar *et al.*, 2000; Pack y Yoo, 2004].

Las proteínas termofílicas presentan más residuos cargados en sus superficies, a expensas de la desaparición de residuos polares no cargados [Cambillau y Claverie, 2000; Greaves y Warwicker, 2007]. Sólo la histidina se encuentra en mayor proporción en proteínas mesofílicas que en termofílicas. Entre los aminoácidos cargados positivamente, las proteínas termofílicas tienen una mayor predilección por la arginina sobre la lisina, debido a que la arginina presenta una mayor área para interacciones de carga que la lisina, lo que le otorga un mayor efecto estabilizador en la estructura proteica [Mrabet *et al.*, 1992].

Las proteínas termofílicas muestran un mayor número de interacciones de pares de residuos aromáticos que sus homólogas mesofílicas. Las agrupaciones de residuos aromáticos son regiones relativamente rígidas y se localizan normalmente cercanos al sitio activo [Kannan y Vishveshwara, 2000].

1.3.4. Estabilidad térmica en cupredoxinas

Se ha observado que las plastocianinas de plantas y de cianobacterias mesofílicas, como Syn-Pc, exhiben una mayor estabilidad térmica en su forma reducida. Sin embargo, en las Pc de cianobacterias termofílicas, como la de *Phormidium laminosum* (Pho-Pc), en la Am de *Paracoccus denitrificans* y la Az de *Pseudomonas aeruginosa* es la especie oxidada la de mayor estabilidad.

Tabla 1. Valores de T_m de diferentes cupredoxinas.

Los diferentes valores de T_m mostrados han sido obtenidos de la bibliografía: Plastocianinas de Pho-Pc [Feio *et al.*, 2004; Feio *et al.*, 2006], Syn-Pc [Feio *et al.*, 2004], *Spinacia oleracea* (espinaca) [Sandberg *et al.*, 2003] y *Populus nigra* (álamo) [Guzzi *et al.*, 2004], Am de *Paracoccus denitrificans* [Ma *et al.*, 2005] y Az de *Pseudomonas aeruginosa* [Sandberg *et al.*, 2002].

Proteína	Organismo	T_m (°C)	
		Cu(I)	Cu(II)
Pc	Syn-Pc	71,9	66,1
	Pho-Pc	76,4	83,1
	<i>S. oleracea</i>	71,0	67,8
	<i>P. alba</i>	66,7	62,7
Am	<i>P. denitrificans</i>	62,0	75,5
Az	<i>P. aeruginosa</i>	85,4	86,3

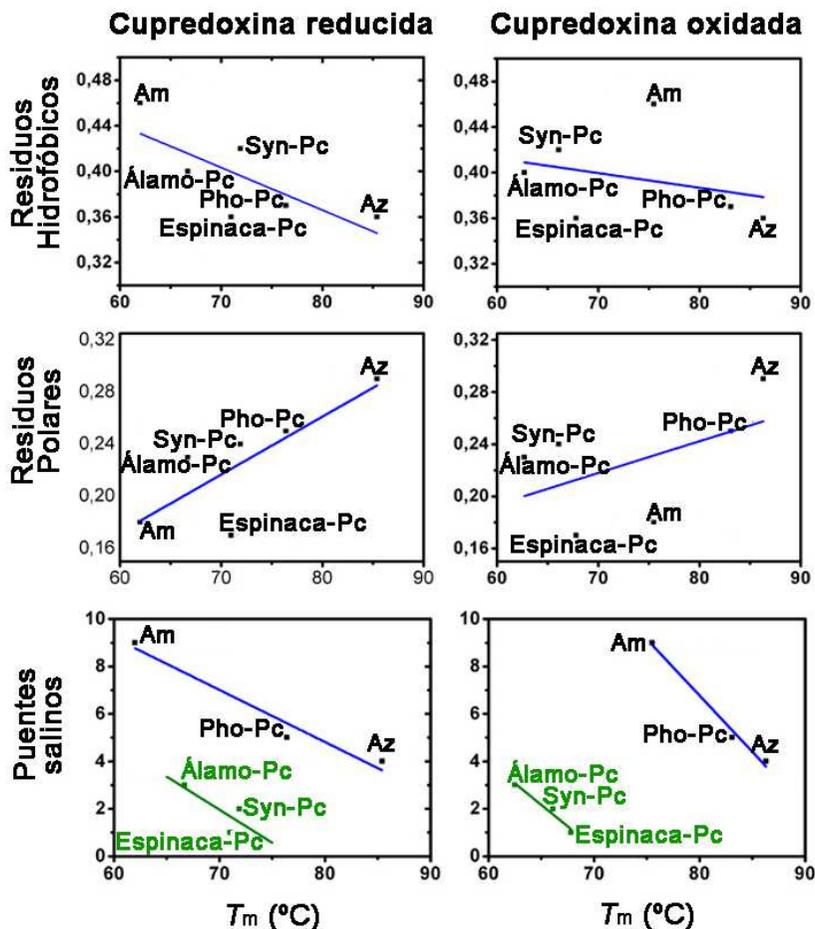


Figura 8. Tendencias en el número de residuos hidrofóbicos y polares, así como en el de puentes salinos con respecto al incremento en la T_m de diferentes cupredoxinas.

Los diferentes valores de T_m mostrados se corresponden con los de la tabla 1. La determinación del contenido en residuos hidrofóbicos, polares y puentes salinos se ha realizado mediante el programa UCSF Chimera [Pettersen *et al.*, 2004] sobre las estructuras disponibles en la “*Protein Data Bank*” bajo los códigos pdb 1BAW para Pho-Pc [Bond *et al.*, 1999], 1JXD para Syn-Pc [Bertini *et al.*, 2001], 1AG6 para *Spinacia oleracea* (espinaca) [Xue *et al.*, 1998], 2PCY para *Populus nigra* (álamo) [Garrett *et al.*, 1984], 2OV0 para Am de *Paracoccus denitrificans* [Carrell *et al.*, 2007] y 1AZU para Az de *Pseudomonas aeruginosa* [Adman y Jensen, 1981].

En la Tabla 1 se muestran los valores de T_m de distintas plastocianinas, la Am y la Az según sus estados redox [Taneva et al., 1999; Sandberg et al., 2003; Guzzi et al., 2004; Feio et al., 2004; Ma et al., 2005; Feio et al., 2006]. Cuando se consideran estas cupredoxinas se observa que la composición en residuos hidrofóbicos y polares contradice a la regla general de las proteínas termofílicas (figura 8).

Independientemente de que se consideren las formas oxidadas o reducidas, la composición en residuos hidrofóbicos disminuye con la T_m , contrariamente a lo que sucede con los residuos polares. Cuando se tienen en cuenta los puentes salinos se observan dos grupos: Pho-Pc, Am y Az, en las que la forma oxidada es la más estable, y las Pcs de *Synechocystis*, espinaca y álamo, en la que es la forma reducida la de mayor T_m . El primer grupo presenta mayor número de puentes salinos que el segundo, pero dentro de cada grupo existe la tendencia a una disminución en dicho parámetro al aumentar la T_m .

Az presenta además un puente disulfuro en su extremo N-terminal que tiene tanta importancia en su termoestabilidad como el átomo de cobre. A pH 7,0, la eliminación de cualquiera de estos dos elementos supone un descenso en la T_m de alrededor de 20 °C [Milardi et al., 2003].

1.3.4.1. Estabilidad térmica en plastocianinas

El proceso de desplegamiento térmico de las plastocianinas en su forma oxidada es irreversible tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas [Milardi et al., 1998; Feio et al., 2004; Feio et al., 2006], mientras que la forma reducida es irreversible sólo en presencia de oxígeno. Esto se debe a que bajo condiciones aeróbicas el propio cobre cataliza la reacción de oxidación del azufre de la cisteína que actúa de ligando [Sandberg et al., 2002; Sandbeg et al., 2003]. Este fenómeno es

aplicable a todas las cupredoxinas. Por tanto, el proceso de desplegamiento térmico en condiciones aeróbicas se puede ajustar al esquema general de Lumry-Eyring, explicado ya previamente en el apartado 2.1: $F \leftrightarrow U \leftrightarrow I$, donde F es la proteína plegada, U es la proteína desplegada de forma reversible, y siendo I la proteína desplegada de forma irreversible.

1.3.4.1.1. Comparación entre las plastocianinas de *Synechocystis* sp. PCC6803 y *Phormidium Lamosum*

Pho-Pc muestra valores de T_m de 83,1 °C y de 76,4 °C para las formas oxidada y reducida, respectivamente, a pH 5,5 y en aerobiosis [Feio *et al.*, 2004]. De hecho, esta proteína es más estable en su forma oxidada independientemente del pH ensayado. Sin embargo, las plastocianinas de plantas superiores y de cianobacterias mesófilas presentan valores de T_m para las formas reducidas superiores a los de las oxidadas (Tabla 1). Tal es el caso de Syn-Pc, con valores de T_m de 66,1 °C para la especie oxidada y de 71,9 °C para la reducida a pH 5,5 y en presencia de oxígeno [Feio *et al.*, 2006]. Esta tendencia es también independiente del pH.

Tal como sucede con otras metaloproteínas, el cobre tiene gran importancia en la estabilización de la conformación nativa de estas Pcs. La eliminación del metal conduce a una drástica caída de entre 20 y 25 °C en los valores de T_m para ambas proteínas. Pero, aún así, la T_m de la apo-Pc de *P. lamosum* sigue siendo 8,5 °C más estable que la de *Synechocystis* [Feio *et al.*, 2006]. Este hecho indica el papel que otras interacciones tienen en la estabilización de la matriz proteica, de la misma forma que sucede en otras proteínas termofílicas [Vieille y Zeikus, 2001; Li *et al.*, 2005].

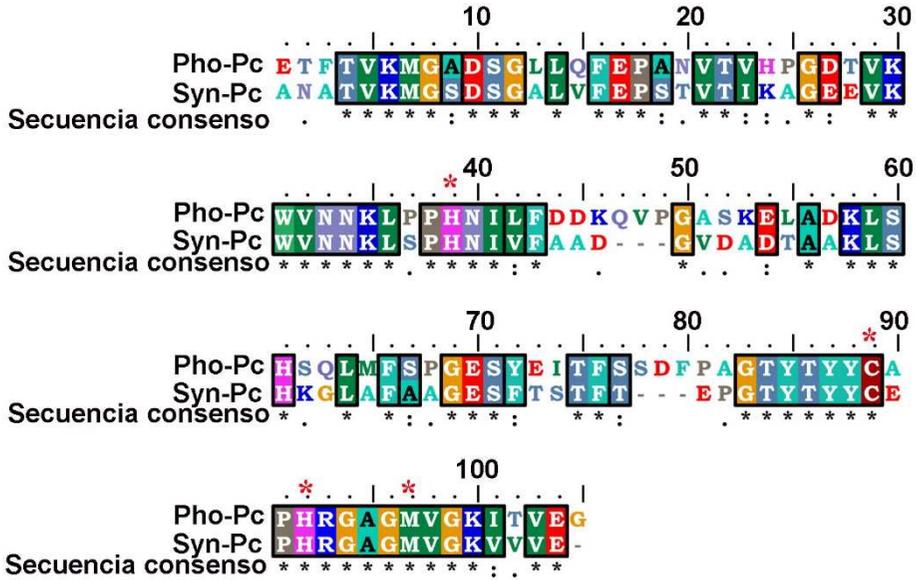


Figura 9. Alineamiento de las secuencias de Pho-Pc y Syn-Pc.

Los asteriscos rojos marcan los ligandos del cobre. Los residuos idénticos o similares se hallan encuadrados.

La estabilización de Pho-Pc parece ser principalmente hidrofóbica, mientras que en Syn-Pc las fuerzas electrostáticas parecen tener un mayor papel, tal como se puede deducir por su diferente comportamiento frente a la presencia de sal [Feio *et al.*, 2006].

Al comparar la estructura de ambas Pc llama la atención que no se cumplan algunas de las reglas comunes en la estabilización de proteínas termofílicas. Existe la tendencia general al acortamiento de los lazos en proteínas termofílicas; sin embargo, Pho-Pc tiene lazos más largos que Syn-Pc. De hecho, dos de ellos (L5 y L7) presentan inserciones de secuencia (Figuras 9 y 10). En cuanto a la composición en aminoácidos, sólo se observa una diferencia apreciable en los aminoácidos aromáticos, correspondiente a la existencia de dos residuos de fenilalanina (Phe3 y Phe80) en Pho-Pc involucrados en dos agrupaciones hidrofóbicas distintas. La Phe3 interacciona con Val21 y la

Val23 mediante interacciones de Van der Waals. En Syn-Pc, en lugar de la Phe3, hay un residuo de alanina, disminuyéndose así la interacción entre las hebras $\beta 1$ y $\beta 2$. Además, no existe una diferencia significativa en el número de enlaces de hidrógeno o puentes salinos cuando se considera la totalidad de ambas Pc. Sin embargo, esta razón cambia cuando se considera únicamente la región de la proteína que engloba las hebras $\beta 5$ y $\beta 6$, el lazo L5 y la hélice α (Figura 11). Esta región constituye la conocida cara este en Pcs, implicada en la interacción de esta proteína con sus parejas fisiológicas. Las dos proteínas presentan una homología de secuencia del 63%, llegando a ser del 92% en el entorno del metal. Por el contrario, se reduce hasta un 43% cuando sólo se tiene en cuenta la cara este [Muñoz-López^b *et al.*, 2010].

La mayor estabilidad de Pho-Pc con respecto a Syn-Pc, y su diferente dependencia con el estado redox, se debe a diferencias en la cara este y en el lazo L7, que forma parte del barril de la Pc. De hecho, cuando sólo se considera la cara este se detecta un incremento en las interacciones hidrófobas y puentes de hidrógeno y salinos, otorgando a esta región una importancia determinante en la estabilidad de las Pc. Cabe resaltar que uno de los residuos de histidina que liga al cobre se encuentra precisamente al inicio de la hebra $\beta 5$, mientras que el lazo L7 da paso a la hebra β en cuyo extremo se sitúa otro ligando del cobre: la cisteína [Muñoz-López^b *et al.*, 2010]. La composición en estructura secundaria también se ve afectada en diferente medida en ambas Pcs. Las hebras $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ y $\beta 6$ de Pho-Pc muestran una mayor estabilidad que las respectivas de Syn-Pc [Feio *et al.*, 2006].

El diseño de mutantes siempre ha sido una herramienta muy útil para analizar la medida en la que un residuo en concreto podría contribuir a una propiedad determinada. Para el caso concreto de Pho-Pc, se diseñaron diversos mutantes: Pho-F3A, situado en la hebra $\beta 1$; Pho-F80A, situado en el lazo L7, y Pho-P49G/G50P, localizado en el lazo L5

[Muñoz-López^a *et al.*, 2010]. Dichos cambios desestabilizaron ambos estados redox, aunque de forma más evidente en la especie oxidada. Además, el doble mutante Pho-P49G/G50P mostró una dependencia de la T_m respecto al estado redox del cobre igual al exhibido por Syn-Pc, con una T_m a pH 6 de 72,5 °C para la forma reducida y de 69 °C para la oxidada. La disminución en composición en hebras β y la pérdida de la interacción que se establece en Pho-Pc entre la Pro49 y la Tyr85, situada esta última en el lazo L7 se consideraron los motivos de la disminución en la termoestabilidad.

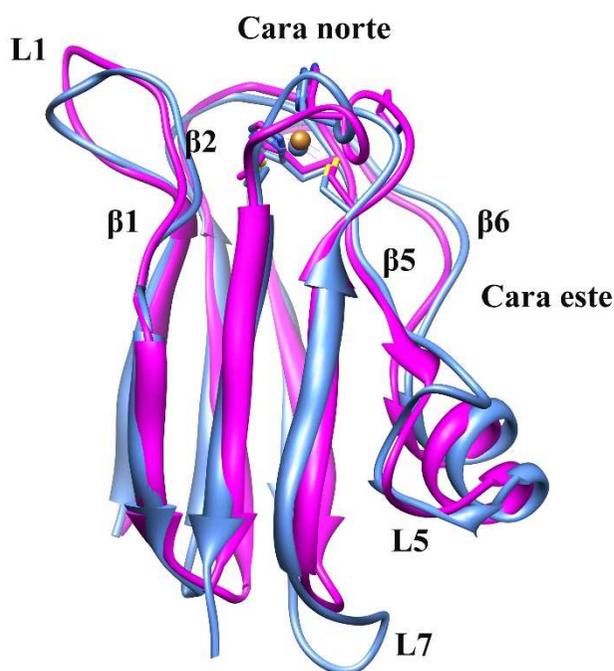


Figura 10. Alineamiento de las estructuras de Syn-Pc y de Pho-Pc.

La estructura de Syn-Pc (código pdb: 1JXD; Bertini^a *et al.*, 2001) se representa en magenta, y la de Pho-Pc (código pdb: 1BAW; Bond *et al.*, 1999), en azul. Se han señalado las caras norte y este, así como las hebras $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ y $\beta 6$ y los lazos L1, L2, L5 y L7.

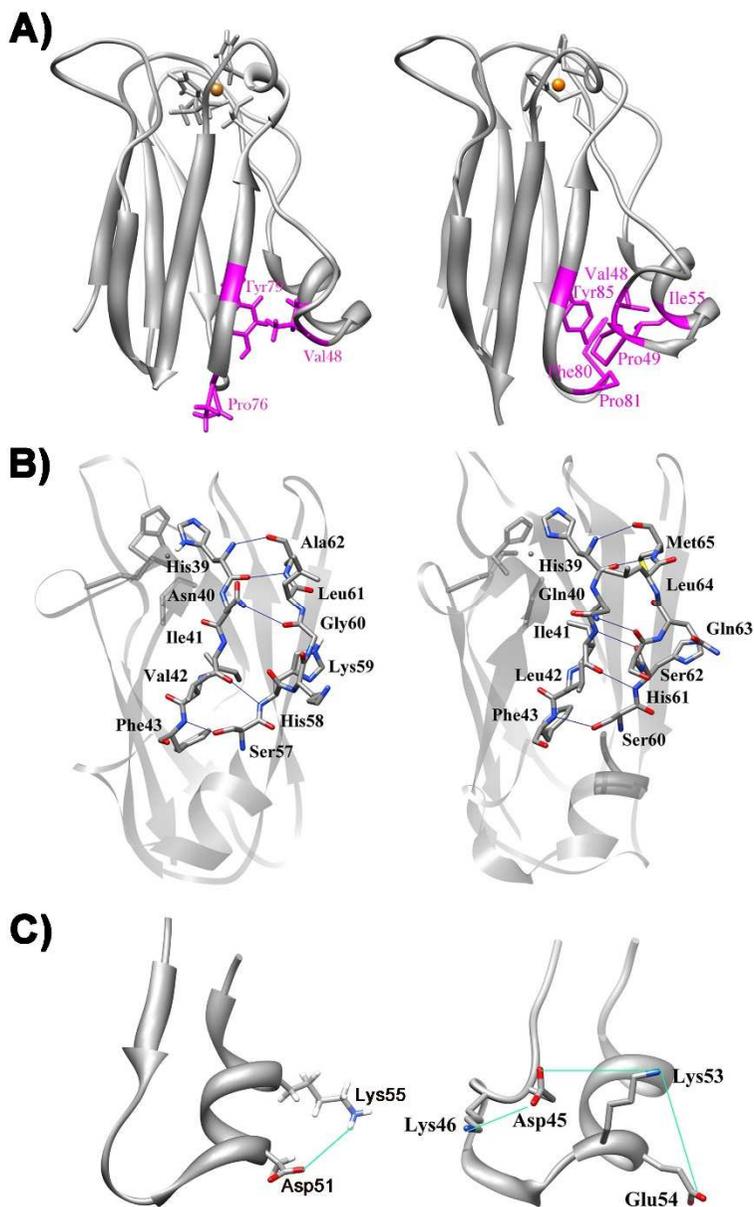


Figura 11. Diferencias en las interacciones intramoleculares de la cara este de Syn-Pc y Pho-Pc.

A la izquierda de la figura se representa Syn-Pc y, a la derecha, Pho-Pc. **(A)** Agrupación hidrofóbica formada entre el lazo L5 y el barril β . **(B)** Puentes de hidrógeno entre las hebras $\beta 5$ y $\beta 6$. **(C)** Puentes salinos establecidos en el lazo L5. Figura adaptada de Muñoz-López⁹ *et al.*, 2010.

Esta doble mutación, aún encontrándose a 20 Å del centro de cobre, induce una alteración en el mismo centro metálico visible por estudios de espectroscopía de absorción de rayos X (XAS) [Muñoz-López^b *et al.*, 2010; Chaboy *et al.*, 2011]. Los espectros de las formas reducidas de Syn-Pc, Pho-Pc y Pho-P49G/G50P no muestran diferencia alguna. Notablemente, las tres Pcs muestran T_m similares para esta forma redox (alrededor de 73 °C). Sin embargo cuando se consideran las formas oxidadas, el espectro de Pho-Pc muestra claras diferencias con los de Syn-Pc y Pho-P49G/G50P, los cuales resultan superponibles. En el espectro de Pho-Pc, el umbral de la región XANES (“*X-ray absorption near edge structure*”) se desplaza 0,6 eV hacia energías inferiores con respecto al umbral de las otras dos Pcs [Muñoz-López^b *et al.*, 2010], lo cual es indicativo de una diferencia en la distribución electrónica del centro de cobre [Chaboy *et al.*, 2009]. Estudios computacionales *ab initio* de la región XANES de las formas oxidadas indicaron que es la distancia entre el átomo de cobre y el azufre tiolato de la cisteína que lo liga el determinante de las diferencias entre Syn-Pc y Pho-Pc en el espectro de XAS [Chaboy *et al.*, 2009]. Esto unido al hecho de que las formas oxidadas de Syn-Pc y Pho-P49G/G50P presentan T_m notablemente inferiores (65,0 y 69,0 °C, respectivamente) que Pho-Pc (81,8 °C), llevó a la hipótesis de que una menor T_m de la forma oxidada está ligada a una mayor longitud de dicho enlace. De hecho, Syn-Pc muestra un valor de 0,225 nm para la longitud de este enlace [Romero *et al.*, 1998], mientras que en Pho-Pc este valor es de 0,210 nm [Bond *et al.*, 1999].

2. OBJETIVOS

En los últimos años se ha investigado en nuestro grupo las características estructurales que rigen la mayor estabilidad de la plastocianina de la cianobacteria termófila *Phormidium laminosum* respecto a su homóloga mesófila en la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC6803, así como la distinta dependencia que los puntos de fusión de las dos proteínas muestran respecto al estado redox del metal. Los análisis computacionales realizados sugieren que la región comprendida entre los residuos 39 y 65 determina las diferencias en la termoestabilidad entre ambas proteínas. Asimismo, sustituciones de aminoácidos en dicha región disminuyen la estabilidad de la proteína termorresistente y alteran la relación entre el estado redox del metal y el punto de fusión de la proteína. Sin embargo, se desconoce por qué los residuos situados en una región flexible (residuos 44 - 56) y distante del centro metálico modulan la estabilidad térmica.

Para contrastar la hipótesis de que dicha región es la que determina las diferencias entre las dos proteínas y comprender el vínculo entre su comportamiento y el del centro metálico, se ha procedido a la estabilización de la plastocianina de *Synechocystis* sp. PCC6803 mediante mutagénesis dirigida. Los objetivos del presente trabajo, en concreto, son los siguientes:

1. Determinar las diferencias en las rutas de desnaturalización térmica entre las plastocianinas cianobacterianas mesófila (*Synechocystis* sp PCC6803) y termófila (*Phormidium laminosum*).
2. Comprender cómo la región comprendida entre los residuos 39 y 65 modula las diferencias de estabilidad entre los estados oxidado y reducido de la plastocianina mesófila.
3. Mejorar la estabilidad de la cuproproteína mesófila mediante mutagénesis dirigida aplicando criterios normalmente asumidos para la estabilización de proteínas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Programas informáticos

Para la realización de las diversas figuras que forman parte del presente trabajo se han usado principalmente los siguientes programas informáticos. El uso de una aplicación diferente a las mencionadas será indicada en el apartado o figura correspondiente.

- UCSF Chimera [Pettersen *et al.*, 2004] para las representaciones moleculares.
- Clustal W. [Aiyar, 2000] para los alineamientos de secuencias de aminoácidos.
- BioEdit versión 7.0.9.1 [Hall^b, 1999] para las representaciones de secuencias de aminoácidos.
- Origin (OriginLab, Northampton, MA) para las representaciones gráficas.

3.2. Diseño de los mutantes

Para el diseño de los mutantes de Syn-Pc se consideraron los datos experimentales y teóricos disponibles relativos a la diferencia en termoestabilidad entre esta Pc y su homóloga de *P. laminosum*, así como la relación de esta con el potencial redox del átomo de cobre [Feio *et al.*, 2004; Feio *et al.*, 2006; Muñoz-López^a *et al.*, 2010; Muñoz-López^b *et al.*, 2010]. El diseño se hizo fundamentalmente en base a la comparación de secuencias y estructuras, y, como complemento, el análisis energético de mutaciones con la aplicación CUPSAT (de “Cologne University Protein Stability Analysis Tool”; Parthiban *et al.*, 2006).

3.2.1. CUPSAT (“*Cologne University Protein Stability Analysis Tool*”)

CUPSAT (“*Cologne University Protein Stability Analysis Tool*”) es una aplicación web que permite analizar y predecir el posible efecto que una mutación puntual induce sobre la estabilidad proteica [Parthiban *et al.*, 2006]. A partir de la estructura silvestre en formato PDB y la indicación del residuo a mutar, el programa calcula la diferencia en energía libre de desplegamiento entre la proteína mutante y la silvestre ($\Delta\Delta G_c$) para cada uno de los cambios a los 19 aminoácidos restantes. Un valor positivo de $\Delta\Delta G_c$ indica que la mutación resulta estabilizante, mientras que un valor negativo indica desestabilización. El modelo predictivo incluye potenciales atómicos y de torsión para evaluar el ambiente estructural de los aminoácidos.

El modelo estructural empleado fue el archivo 1JXD.pdb correspondiente a Syn-Pc reducida.

3.2.2. Dinámicas moleculares

Para las simulaciones de dinámica molecular llevadas a cabo sobre la proteína silvestre Syn-Pc se tomaron las coordenadas atómicas del archivo 1JXD.pdb [Bertini^a *et al.*, 2001].

Para las dinámicas cortas de 1 ns a temperatura ambiente (298K), las modificaciones deseadas en la secuencia proteica se introdujeron sobre las coordenadas correspondientes a la estructura de NMR de Syn-Pc (código pdb: 1JXD; Bertini^a *et al.*, 2001, 2001) mediante el empleo del programa UCSF Chimera [Pettersen *et al.*, 2004]. Debido a la corta duración de las trayectorias y a que no se conocía el rotámero que adoptaría el residuo mutado, para cada mutación, excepto para aquéllas que el cambio era a alanina, se seleccionaron dos posibles

rotámeros. Uno de ellos consistía en que supusiera el mínimo grado de colisiones con residuos colindantes (criterio c), y otro que implicara la mayor probabilidad acorde con la librería de rotámeros Dunbrack (criterio p) [Dunbrack, 2002].

Para las simulaciones de dinámica molecular de 10 ns de duración a temperatura ambiente (298K) y a alta temperatura (498K) de Syn-V48I se tomaron las coordenadas atómicas provenientes de un paso avanzado del refinamiento de la estructura cristalográfica en el que todas las cadenas laterales estaban perfectamente esclarecidas. Los mutantes simple Syn-G60A y doble Syn-V48I/G60A se modelaron cambiando la glicina en posición 60 por un residuo de alanina en la estructura de la forma silvestre y en la del mutante Syn-V48I, respectivamente. Para ello se recurrió al programa UCSF Chimera. En el caso del triple mutante Syn-A44D/D49P/A62L se recurrió a las coordenadas atómicas contenidas en el archivo 1PCS.pdb [Romero *et al.*, 1998]. Para las formas apo, se eliminó manualmente el átomo de cobre de los archivos pdb.

Las simulaciones de dinámica molecular se realizaron con la versión 9.0 del programa AMBER [Case *et al.*, 2006] con el campo de fuerza AMBER 03 [Duan *et al.*, 2003] para los residuos estándar de la proteína, mientras que para los ligandos del cobre oxidado de las holo-Pc, se usaron los parámetros determinados por Muñoz-López^b *et al.* (2010), recalculados según el protocolo de Comba (2002) (figura 12).

Las proteínas se solvataron con moléculas de agua TIP3P [Jorgensen y Madura, 1983] en una caja cúbica que guarda una distancia mínima de 1 nm con respecto a la proteína, usando el módulo tleap de AMBER. Para neutralizar las cargas del sistema, se añadieron dos iones de sodio para las simulaciones de las holo-Pc y tres para las de las apo-Pc.

2 ps a 298 K, controlándose la temperatura mediante el algoritmo de Berendsen [Berendsen *et al.*, 1984]. Posteriormente, se realizó la minimización de la energía de todo el sistema en 5.000 ciclos, con 300 del método de máxima pendiente. La temperatura del sistema se incrementó gradualmente de 200 a 298 K o a 498 K, según el caso, manteniendo en todo momento constante la presión del sistema.

Las simulaciones se llevaron a cabo en el colectivo microcanónico (NVE) durante 1 o 10 ns usando 1,5 fs como tiempo de integración. La temperatura se mantuvo constante a 298K y, en el caso de la las dinámicas de larga duración, también a 498 K. En los casos de Syn-A44D/D49P/A62L y Syn-V48I/G60A a temperatura ambiente fue necesario alargar la duración de la dinámica hasta los 20ns. Los fotogramas se grabaron con una frecuencia de 2,5 ps. Para restringir los modos de vibración de los enlaces de los átomos de hidrógeno empleamos el algoritmo SHAKE [Ryckaert *et al.*, 1977]. Minimización, equilibrado y dinámicas fueron realizadas con el módulo PMEMD de AMBER.

Los archivos de coordenadas se procesaron mediante el módulo PTRAJ de AMBER. Los archivos de RMSD, RMSF y radio de giro generados se exportaron al programa OriginLab Versión 8.0 [May y Stevenson, 2009] para su análisis.

La desviación de la media cuadrática o RMSD (del inglés “*Root Mean Square Deviation*”) permite conocer la similitud entre dos estructuras proteicas. Se define RMSD como:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |x_i - y_i|^2}$$

Siendo N el número de átomos, y x_i e y_i las coordenadas de cada uno de los átomos correspondientes a cada estructura a comparar. El

RMSD presenta un valor igual a 0 para estructuras idénticas y va incrementando a medida que las dos estructuras o conformaciones se van diferenciando.

Cuando lo que se desea es conocer la estabilidad de una determinada proteína a lo largo de una trayectoria de dinámica molecular, se procede a la determinación de los RMSDs de cada una de las conformaciones proteicas obtenidas durante la simulación respecto a la estructura inicial. Para macromoléculas del tamaño de la Pc, se considera que la conformación proteica en cuestión mantiene un estado plegado cuando el RMSD tiene un valor inferior a 0,22 nm, mientras que valores superiores a 0,5 nm son indicativos de un estado desplegado [Deng *et al.*, 2013].

Las fluctuaciones cuadráticas medias o RMSF (del inglés (“*Root Mean Square Fluctuation*”)) reflejan la motilidad interna de la proteína, permitiendo la identificación de regiones con alta o baja movilidad. Se define como la desviación entre la posición de los átomos a tiempo t y la posición promedio durante la simulación:

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t=1}^T |r_t - \bar{r}|^2}$$

Siendo T el número de conformaciones monitorizadas, r_t el vector coordenada para el átomo i - a tiempo t y \bar{r} el vector promediado en el tiempo para ese mismo átomo.

El radio de giro (R_g) permite conocer el grado de compactación de una estructura proteica [Lobanov *et al.*, 2008]. Se define como la distancia media al cuadrado de cada átomo de la proteína hacia su centro de gravedad.

$$Rg = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i |r_i - R|^2}$$

Siendo N el número de átomos, M la masa de los átomos en la proteína, m_i y r_i son la masa y las coordenadas para el átomo -i, y R las coordenadas del centro de masa.

3.2.2.1. Análisis de componentes principales

Para separar los movimientos interrelacionados de las fluctuaciones locales armónicas en la molécula proteica, se llevó a cabo el análisis de componentes principales (PCA), también conocido como dinámica esencial o análisis de covarianza.

Mediante PCA, los datos de coordenadas para cada período de tiempo, obtenidos a partir de las trayectorias de dinámica molecular se ajustan mediante mínimos cuadrados a una estructura de referencia para eliminar los movimientos traslacionales y rotacionales. Para ello se construye la matrix de covarianza de las fluctuaciones atómicas (C) de los C_{α} , incluyendo el átomo de cobre:

$$C_{ij} = \langle (X_i - X_{i,0})(X_j - X_{j,0}) \rangle$$

Donde X son las coordenadas x-, y- y z- de los átomos fluctuando alrededor de su posición promedio (X_0).

C es una matrix simétrica $3N \times 3N$, donde N es el número de C_{α} incluyendo el átomo de cobre. Esta matrix puede ser diagonalizada a través de una matrix de transformación ortonormal, dando como resultado un conjunto de valores y vectores propios:

$$C = TDT^t$$

Siendo C la matriz de covarianza, D la matriz diagonal formada por los valores propios (λ) de C , T la matrix de base ortonormal cuyos vectores columna son vectores propios de C , y T^t es la matrix traspuesta de T .

El proceso de diagonalización resulta, por tanto, en un conjunto de $3N$ valores propios o amplitudes con su respectivo grupo de $3N$ vectores propios. Los valores propios representan las RMSF del sistema a lo largo del correspondiente vector propio, y, por tanto, contienen la contribución de cada componente principal a la fluctuación total. Al ordenar los vectores propios de mayor a menor valor propio, el primero en la lista describe el movimiento correlacionado de mayor escala, mientras que el último se corresponde con vibraciones de pequeña amplitud [Hayward y L. de Groot, 2008].

La proyección de todas las configuraciones originales de la trayectoria de dinámica molecular sobre un vector propio genera una nueva trayectoria que revela los desplazamientos correlacionados por la componente principal, es decir, los modos en que una parte de la proteína tiende a actuar de una forma concertada con otra parte.

$$p_i = \mu_i(X_i - X_{i,0})$$

Siendo p_i las coordenadas principales y μ_i el vector propio que ocupa la columna número i de T .

Para el análisis de componentes principales se emplearon los módulos PCAzip y PCZdump, englobados en el programa PCAsuite (<http://mmb.pcb.ub.es/software/pcasuite>). Mediante el módulo PCAzip se computan la matrix de covarianza, los vectores y valores propios, así como las proyecciones para las trayectorias [Meyer *et al.*, 2006], resultando en un archivo comprimido. Como estructura promedio se eligió la calculada por el módulo PTRAJ de AMBER a partir de las coordenadas de todos los átomos a lo largo de la trayectoria, excluyéndose las

moléculas de agua e iones de sodio. El resto de parámetros usados fueron los otorgados por defecto por el programa.

Los vectores y valores propios, proyecciones y animaciones a lo largo de cada vector propio son extraídos del archivo comprimido originado por el módulo PCAzip mediante la aplicación PCZdump.

3.2.2.2. Análisis de contenidos coseno

Los respectivos componentes o contenidos coseno (c_i) de cada vector propio (i) se obtienen con la finalidad de determinar la medida en la que los principales modos esenciales del análisis de covarianza siguen un comportamiento estocástico, o si el muestreo es o no representativo de un estado.

$$c_i = \frac{2}{T} \left(\int_0^T \cos(i \pi p_i(t) dt) \right)^2 \left(\int_0^T p_i^2(t) dt \right)^{-1}$$

Donde $p_i(t)$ es la amplitud del movimiento a lo largo del vector propio i a tiempo t . El contenido coseno puede tomar valores entre 0 (no coseno) y 1 (coseno perfecto). Un alto contenido coseno indica que la trayectoria no ha alcanzado la convergencia, por lo que es recomendable alargar su duración [Hess, 2000; Hess, 2002]. Sin embargo, una falta de convergencia no implica necesariamente que las direcciones de los modos o componentes principales no estén claramente definidos [Hayward y de Groot, 2008].

3.3. Análisis de la termoestabilidad de Syn – Pc mediante mutagénesis dirigida

3.3.1. Organismos y condiciones de cultivo

Tanto para los trabajos de manipulación de ADN como para la producción de proteínas recombinantes de *Synechocystis* se empleó la cepa transformable DH5 α de *Escherichia coli* (*E. coli*; Hanahan, 1983; Bethesda Research Laboratories), mientras que para la expresión de Pho-Pc se eligió *E. coli* K12. Las células competentes fueron preparadas por el Servicio Técnico de Cultivos del Centro de Investigaciones Científicas “Isla de la cartuja” siguiendo el procedimiento descrito por Hanahan, (1983).

El medio de crecimiento habitual para los cultivos líquidos o sólidos de *E. coli* fue el de Luria-Bertani (LB; Sambrook *et al.*, 1989), suplementado con ampicilina (100 mg L⁻¹) para la selección de plásmidos con resistencia a este antibiótico, y sulfato de cobre (100 μ M) como fuente de cobre para la plastocianina. Para preparar medio sólido se añadió agar hasta una concentración final de 15 g L⁻¹. La esterilización de los medios e instrumental se llevó a cabo por autoclavado, a 1 atmósfera de sobrepresión y 120 °C durante 20 minutos.

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 matraces Erlenmeyer de 250 mL o 5 L, según uso.

3.3.2. Obtención de ADN de plastocianinas mutantes

Las mutaciones puntuales introducidas en el gen *petE* silvestre, que codifica para Syn-Pc, se llevaron a cabo mediante reacciones de

PCR (*Polimerase Chain Reaction*) mutagénicas utilizando el juego de reactivos “Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit” (Stratagen Inc, La Jolla, CA). Como ADN molde o parental de doble cadena se usó el gen *petE* clonado bajo el promotor *lacZ* en el plásmido pBluescript II SK (+), construcción denominada como pBS-WT a partir de ahora. Para amplificar pBS-WT a la vez que se introduce la mutación deseada en el gen fueron necesarios pares de oligonucleótidos o cebadores de ADN complementarios a la doble cadena de ADN a excepción de aquéllas bases a mutar (Tabla 2). Para el diseño de los cebadores nos ceñimos en lo posible a las indicaciones del manual de instrucciones del kit (<http://sevierlab.vet.cornell.edu/resources/Stratagene-QuikchangeManual.pdf>):

1. La longitud de los cebadores depende del número de bases a mutar, pero debe encontrarse entre los 25 y 45 nucleótidos.
2. Deben ser complementarios e inversos.
3. Ambos cebadores deben contener las mutaciones deseadas, estando estas lo más centradas posible en la secuencia.
4. La temperatura de fusión (T_m) del par de oligonucleótidos debe ser igual o superior a 78 °C. Para su cálculo se emplea la relación:

$$T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - \%M$$

Siendo N el número de bases del oligonucleótido y %M el porcentaje de bases desapareadas.

5. Evitar en lo posible la formación de estructuras secundarias.
6. El contenido en G + C debe mantenerse entre el 40 y el 60%. Los extremos deben contener una o más G o C.
7. Deben estar fosforilados en su extremo 5´.

Para obtener el mutante doble Syn-V48I/G60A se empleó el plásmido que contenía el gen mutante Syn-V48I, y los cebadores arriba mencionados para la mutación Syn-G60A. Todos los oligonucleótidos se adquirieron a Sigma-Aldrich.

Para las reacciones de PCR se utilizó la polimerasa termorresistente de *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*), portadora de actividad correctora 3'→5'. El programa de amplificación consistió en un paso inicial de 2 minutos a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94 °C, 1 minuto de hibridación o de unión de los cebadores, y 1 minuto a 72 °C para la amplificación de dichos cebadores en un termociclador MJ-Mini (Biorad). La temperatura de hibridación difiere según la mutación, ya que depende de la T_m de los cebadores usados. Por lo general, se eligieron temperaturas de entre 55 y 65 °C.

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para introducir las diferentes mutaciones dirigidas en el gen *petE*.

Se muestran los oligonucleótidos en sentido 5'→3', así como sus temperaturas de fusión. En magenta se marcan las bases inductoras de las correspondientes mutaciones.

A3F	CGCTGCCAATTTTACAGTGAAAATGGG	71,70 °C
G60A	CTCTCCCACAAAGCCTTGGCCTTTGC	75,35 °C
K59S	GCTGCTAAGCTCTCCCACTCAGGCTTGG	78,30 °C
L56I	CACCGCTGCTAAGATCTCCCACAAAGG	75,55 °C
T52I	GTGGATGCTGACATCGCTGCTAAGCTC	75,55 °C
T52Y	GTGTGGATGCTGACTACGCTGCTAAGCTCTC	76,79 °C
V42I	CTCTCCCCTCATAACATTATTTTGGCCCGATGGTG	77,78 °C
V48I	GCCGATGGTATTGATGCTGACACC	79,92 °C

Entre el producto de las reacciones de amplificación se encuentra, por una parte, ADN sin metilar de doble cadena idéntica al molde salvo por las modificaciones introducidas y, por otra, ADN híbrido, con una cadena parental no metilada y otra metilada con la mutación. El tratamiento con la endonucleasa *DpnI* elimina el ADN metilado y hemimetilado mediante cortes en las secuencias GATC metiladas. El producto final, libre de cadenas parentales, se usó para transformar células de *E.coli* DH5 α mediante choque térmico con el fin de amplificar aquéllos plásmidos que no habían sido cortados por *DpnI* y que contenían el gen con la mutación deseada. El plásmido pBluescript II SK (+), y por tanto el pBS-WT y sus mutantes, presenta el gen de resistencia a ampicilina. Las colonias individuales que crecieron tras unas 16 horas de incubación a 37 °C en placas de Petri con medio sólido LB suplementado con ampicilina (100 mg L⁻¹) se picaron y crecieron en agitación *over night* a 37 °C en tubos con 5 mL de LB líquido suplementado con ampicilina (100 mg L⁻¹). La purificación del ADN plasmídico se realizó con la ayuda de kits comerciales basados en lisis alcalina (*Fastplasmid Mini Kit*, de Eppendorf).

En todos los casos, para comprobar que las sustituciones eran correctas y que las secuencias carecían de errores, los resultados de las PCRs mutagénicas se secuenciaron en el Servicio de Secuenciación del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO).

El plásmido con el gen que codifica el triple mutante Syn-A44D/D49P/A62L [Romero *et al.*, 1998] fue cedido por la doctora Berta de la Cerda Haynes, entonces miembro del equipo de investigación. Las tres sustituciones, localizadas en los extremos de las hebras quinta y sexta, restablecen residuos conservados en la mayor parte de las Pc salvo en Syn-Pc. Este mutante, a diferencia del silvestre, es capaz de mantenerse estable durante días en su forma oxidada, lo cual permitió obtener una solución homogénea para su cristalización (pdb: 1PCS).

Las construcciones del gen silvestre de la Pho-Pc, como el de su doble mutante Pho-P49G/G50P en el plásmido de expresión pBluescript II SK (+) fue cedido por Francisco Muñoz López, también miembro del equipo.

3.3.3. Expresión y purificación de plastocianinas silvestres y mutantes

3.3.3.1. Producción de las plastocianinas recombinantes

La producción y purificación de la plastocianina Syn-Pc y de sus mutantes, así como Pho-Pc y su doble mutante Pho-P49G/G50P se realizó según lo previamente descrito en la bibliografía [Hervás *et al.*, 1993; Romero *et al.*, 1998; Muñoz-López^a *et al.*, 2010; Muñoz-López^b *et al.*, 2010].

Las construcciones del plásmido pBS-WT o alguno de sus mutantes se emplearon para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α . Las construcciones de ese mismo plásmido con el gen silvestre de Pho-Pc o de Pho-P49G/G50P se usaron para la electroporación de *E.coli* K12.

A partir de este punto la producción de las distintas plastocianinas es similar, aunque sus procesos de purificación presentan pequeñas variaciones.

En todos los casos, las células transformadas o electroporadas se inocularon en proporción 1:1.000 en 50 mL de medio LB suplementado con ampicilina. Tras 12 horas de incubación a 150 r.p.m. y 37 °C, se escaló el cultivo, también en proporción 1:1.000, a matraces de 5 L de capacidad con 3 L de medio LB suplementado con CuSO₄ y ampicilina. Los cultivos se incubaron durante 24 horas a 150 r.p.m y 37 °C, tras lo cual se colectó la masa celular mediante centrifugación a 12.000 x g a 4

°C durante 6 minutos en una centrífuga preparativa refrigerada Avanti J-25 (Beckman Coulter).

3.3.3.2. Purificación de las plastocianinas recombinantes

Las células recogidas mediante la centrifugación se resuspendieron a 4 °C en tampón Tris-HCl 5mM, pH 8,0 suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich) y ADNasa (Roche). La fracción periplásmica se obtuvo mediante dos ciclos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación a 37 °C. Los restos celulares se separaron de la fracción periplásmica mediante 20 minutos de centrifugación a 37.000 x g. El extracto resultante se sometió a diálisis frente a tampón Tris-HCl 5 mM, pH 8,0, en continua agitación durante 24 horas y, luego, se centrifugó a 37.000 x g durante 20 minutos para eliminar los posibles precipitados generados. El sobrenadante se aplicó a una columna de intercambio aniónico de dietilaminoetil (DEAE) celulosa pre- equilibrada con tampón Tris-HCl 5 mM, pH 8,0. Una vez la muestra se encontraba dentro de la columna, ésta se lavó con varios volúmenes de Tris-HCl 10 mM pH 8,0, tras lo cual las proteínas se eluyeron aplicando un gradiente de NaCl de 10 a 180 mM a un flujo de 27 mL h⁻¹. El eluato se recolectó en fracciones usando un colector FRAC-100 (Pharmacia).

La razón de pureza (R), definida como la razón entre las absorbancias a 280 y 597 nm en la proteína oxidada, se determinó mediante espectrofotometría, usando un coeficiente de absorción de 4,5 mM⁻¹ cm⁻¹ a 597 nm para la forma oxidada de la proteína [Hervás *et al.*, 1993; Feio *et al.*, 2006]. Las fracciones con R inferior a 5 se mezclaron y se concentraron usando filtración por presión con el sistema Aminco (Millipore, membrana YM3).

Las plastocianinas Pho-Pc y Pho-P49G/G50P se sometieron directamente a un último paso de purificación consistente en una columna

de filtración en gel HiLoad 16/60 Sephadex-75 (Pharmacia), equilibrada con tampón fosfato 10 mM pH 7,0, y 0,1 M NaCl.

Para las plastocianinas de *Synechocystis* el siguiente paso de purificación consistió en un cromatoenfoco usando la columna "Polybuffer Exchanger 94" (Sigma-Aldrich) previamente equilibrada con tampón Tris-acetato 5 mM pH 7,0. Para ello, se cambió previamente el tampón de la muestra concentrada por el mismo de equilibrado de la columna. La elución de la columna se realizó con 550 ml de Polybuffer 74 (Sigma-Aldrich) diluido 10 veces, con el pH inicial ajustado a 4,0. Las fracciones con una R inferior a 3 fueron nuevamente reunidas y concentradas hasta 1,5 mM mediante filtración acelerada por centrifugación con el sistema centrífugo (Millipore, membrana YM3). La muestra resultante fue posteriormente inyectada en una columna de filtración en gel Sephadex G-50 pre-equilibrada con tampón fosfato 10 mM pH 7,0. El volumen de la muestra no superó en ningún momento el 5% del de la columna. Tanto el flujo de entrada de la muestra como el de elución de la misma fueron de 0,15 ml min⁻¹.

Finalmente las fracciones puras de las plastocianinas silvestre y mutante de *P. laminosum* (R=3) y de *Synechocystis* (R=2,2) se volvieron a concentrar hasta 1 mM mediante el sistema centrífugo (Millipore) y se guardaron a -80 °C hasta su uso.

Para las muestras proteicas seleccionadas para la obtención de cristales, se corroboró su pureza mediante un gel de acrilamida en condiciones desnaturizantes. Para ello, 5 y 10 µg de muestra se corrieron en geles discontinuos de SDS-poliacrilamida en un aparato Mini-protean II (Biorad) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie.

3.3.3.3. Obtención de las formas apo de la plastocianina

Para la eliminación del átomo de cobre del centro activo de las plastocianinas silvestres y de sus mutantes se siguió el método descrito en la bibliografía [Ubbink *et al.*, 1996; Danielsen *et al.*, 1999] con algunas modificaciones. Se mezclaron 50 μl de plastocianina 1,5 mM con 50 μl de tampón Tris/SO₄ 1 M, pH 7,4 y 250 μl de KCN 150 mM en tampón Tris/SO₄ 100 mM, pH 7,9. Se añadió agua MilliQ hasta enrasar los 2,5 mL. Tras un período de incubación mínimo de 45 minutos se comprobó la presencia de cobre tomando alícuotas de 50 μl , diluyéndola a 500 μl y midiendo su absorción a 597 nm en presencia de ferricianuro potásico. Una vez eliminado el cobre de la proteína, se aplicó la mezcla a una columna PD10 pre-equilibrada con tampón fosfato 50 mM pH 7. La elución de la muestra se llevó a cabo con 3,5 mL de tampón fosfato 10 mM pH 7. Posteriormente la muestra se concentró usando filtros centrífugos (Millipore, membrana YM3). El tampón fosfato usado para el pre-equilibrado de la columna PD10, elución de la muestra y lavado del sistema centrífugo fue sometido previamente a un tratamiento con matriz Chelex (Sigma-Aldrich) para eliminar las posibles trazas de metales. La concentración de apo-Pc se determinó usando un coeficiente de extinción teórico de 10 mM⁻¹ cm⁻¹ a 278 nm [Feio *et al.*, 2006]. Las muestras fueron usadas inmediatamente para el seguimiento de la desnaturalización térmica por espectroscopía de dicroísmo circular (CD).

3.3.4. Caracterización proteica

3.3.4.1. Espectroscopía de dicroísmo circular

Dicroísmo circular se define como la diferencia de absorbancia entre luz polarizada circularmente a derecha y a izquierda. Un rayo de luz polarizado en un plano se encuentra formado por un componente de luz polarizada circularmente a derecha y a izquierda, ambos con la misma

amplitud y en fase. Cuando esta luz atraviesa una muestra con uno o más cromóforos quirales estos dos componentes son absorbidos en diferente medida dándose un desfase y un cambio de magnitud en ambos componentes polarizados circularmente [Kelly *et al.*, 2005; Greenfield, 2006].

En las proteínas el entorno quiral del enlace peptídico permite el análisis de la conformación de proteínas en solución mediante la espectroscopía de dicroísmo circular en el UV lejano (180 a 250 nm). Esta herramienta ha resultado ser útil ya no sólo para la determinación del contenido en estructura secundaria de una proteína, sino también para el análisis de los cambios estructurales que suceden por el efecto de mutaciones, variaciones de temperatura, pH, fuerza iónica, etc.

Por otra parte, la espectroscopía de CD en el visible (300 - 900 nm) resulta útil para estudiar la interacción metal-proteína, debido a que el ion metálico ligado a la matriz proteica se encuentra en un ambiente quiral. Esta técnica permite detectar las diferencias en las transferencias de carga del ligando al metal, así como las transiciones d-d del propio metal [Solomon *et al.*, 1976; Solomon *et al.*, 1980; Quintanar y Rivillas-Acevedo, 2013].

Tanto los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano (190 - 240 nm) como los obtenidos en el visible (300 - 900 nm) se obtuvieron con un espectropolarímetro Jasco J-815 equipado con un sistema peltier para controlar la temperatura. Se usaron cubetas de cuarzo de 0,1 cm de paso de luz y las medidas fueron realizadas bajo un flujo constante de nitrógeno.

Las medidas en el UV lejano se realizaron a 25 °C de temperatura. Las muestras contenían 3 µM de proteína oxidada en 10 mM de tampón fosfato pH 7,0. El espectro final fue el resultado de promediar 20 espectros sencillos obtenidos a una velocidad de barrido

de 100 nm min⁻¹. El contenido en estructura secundaria de la proteína fue estimada promediando los resultados obtenidos por los programas SELCON3, CDSSTR y CONTIN, del paquete informático CDpro [Sreerama y Woody, 2000], con el patrón de referencia SP43 [Yang, 1986; Johnson, 1999; Sreerama, 2001].

Para las medidas en el visible, las muestras contenían 250 μM de proteína oxidada en 10 mM de tampón fosfato pH 7,0. El espectro final fue el resultado de promediar 30 espectros sencillos obtenidos a una velocidad de barrido de 200 nm min⁻¹.

3.3.4.2. Medidas potenciométricas

La determinación del potencial redox del ion metálico de la Pc y sus mutantes se realizó mediante una valoración redox asociada paralelamente a medidas espectroscópicas. El proceso se condujo en condiciones de anaerobiosis en base al método descrito por Dutton *et al.* (1970), y modificado por Ortega *et al.* (1988).

El potencial redox se midió con un electrodo combinado Pt-Ag/AgCl MI-800 (Microelectrodes Inc.) de 4 mm de diámetro, calibrado previamente con una solución saturada de quinhidrona en tampón fosfato 100 mM, pH 7,0 ($E_{m,7} = +280$ mV a 20 °C). Los cambios de potencial se registraron en un potenciómetro digital Metrohm 654, mientras que los de absorbancia se midieron en el espectrofotómetro de matriz de diodos Hewlett Packard 8452A.

La mezcla de reacción inicial contenía 10 μM de plastocianina en tampón fosfato 50 mM, pH 7,0, ascorbato sódico 1 mM y 40 μM de cada uno de los mediadores diaminoduroil ($E_{m,7} = +240$ mV), 1,4-*p*-benzoquinona ($E_{m,7} = +293$ mV) y menadiona ($E_{m,7} = +422$ mV) (Loach 1973), en un volumen final de 3 mL. La agitación de la muestra se mantuvo constante durante todo el proceso. Los cambios de absorbancia

a 597 y 600 nm se registraron mientras se añadía de forma gradual ferricianuro potásico 50 mM. La variación de la diferencia entre estas dos medidas de absorbancia ($A_{600} - A_{597}$) se empleó para determinar la fracción de proteína oxidada a lo largo de la valoración, la cual se representó frente al potencial. El ajuste de la curva obtenida a la ecuación de Nernst proporciona los valores de potencial redox de cada una de las proteínas ensayadas:

$$E_m = E_0 - \frac{RT}{n \cdot \mathcal{F}} \ln \frac{[Pc \text{ oxidada}]}{[Pc \text{ reducida}]}$$

Siendo E_m el potencial detectado, E_0 el potencial en condiciones estándar, R la constante de los gases, T la temperatura absoluta (Kelvin), n el número de electrones que participan en la reacción y \mathcal{F} la constante de Faraday ($96.485 \text{ C mol}^{-1}$).

3.3.4.3. Espectrofotometría cinética inducida por láser

La funcionalidad de las proteínas modificadas más relevantes se analizó mediante el seguimiento de los cambios de absorbancia dependiente del estado de óxido-reducción del fotosistema I (PSI, a partir de ahora) a 820 nm, con un coeficiente de extinción de $6,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [Mathis y Sétif, 1981], por espectrometría cinética inducida por láser, tal como se explica en Hervás (1995), con algunas modificaciones. El PSI se excitó con un pulso de luz a 532 nm de 4 ns de duración generado por un láser INDI-HG Nd:YAG (Spectra-Physics) (Hervás y Navarro, 2011) y atenuado con filtros neutros hasta justo la intensidad lumínica saturante para evitar sobreexcitar el PSI a lo largo del experimento. Entonces el PSI reduce a un aceptor exógeno, el metilviológeno, y recibe un electrón

de la Pc, que vuelve a ser reducida por el ascorbato presente en la mezcla de reacción.

La luz de análisis procede de un láser continuo de diodo (modelo LQN830-150C, de Newport). Tras atravesar la cubeta, su intensidad se midió con un fotodiodo de sílice (Melles Griot 13DSI009), protegido de la luz de activación por un filtro de vidrio con un máximo de transmisión a 820 nm y una banda ancha de 9,4 nm.

La señal procedente del fotodiodo se amplificó en un amplificador de alta impedancia Melles Griot 13AMP005 y se registró en un osciloscopio digital Nicolet 450.

La mezcla de reacción contiene, en un volumen final de 0,25 mL, 20 mM de tampón Tricina-KOH pH 7,5, β -dodecilmaltósido 0,03%, una cantidad de PSI equivalente a 0,35 mg de clorofila mL⁻¹, 0,1 mM metilviológeno, 10 mM MgCl₂ y 1 mM ascorbato sódico. La concentración de plastocianina se hizo variar de 0 a 100 μ M. Los experimentos cinéticos se hicieron en condiciones de pseudo-primer-orden, al estar la plastocianina en exceso respecto al PSI.

Todos los experimentos se realizaron en una cubeta con 0,1 cm de paso de luz y a temperatura ambiente. Para cada traza cinética se promediaron 6 medidas, espaciadas 30 segundos entre destellos. Las trazas cinéticas se ajustaron a sumas de exponenciales para calcular las constantes de reacción, para lo cual se usó el método Marquardt con el programa informático diseñado y cedido por el Dr. P. Sétif (Saclay, Francia). El error estimado en los valores de las constantes cinéticas de pseudo-primer-orden (k_{obs}) determinadas en la mayoría de los experimentos es inferior al 10%, según la relación señal/ruido y la repetitividad de los datos.

El proceso se ha realizado en colaboración con los doctores Manuel Hervás Morón y José Antonio Navarro Carruesco.

3.3.5. Medidas de estabilidad térmica

La monitorización de la desestabilización térmica de las Pc para la obtención de las curvas de desplegamiento y sus valores de T_m se llevó a cabo mediante estudios de fluorescencia (fluorimetría diferencial de barrido y espectroscopía de fluorescencia), y de espectroscopía de CD en el visible.

3.3.5.1. Estudios de fluorescencia

El uso de la fluorescencia para la monitorización del desplegamiento proteico está ampliamente extendido. Esto se debe a que los fluoróforos usados son altamente sensibles a los cambios de su entorno durante la desnaturalización proteica, y a la alta relación señal-ruido de la técnica.

Los fluoróforos útiles en los estudios de fluorescencia con proteínas pueden ser intrínsecos (residuos aromáticos, coenzimas) o extrínsecos (fluoresceína, Sypro Orange, naranja de acridina).

3.3.5.1.1. Fluorimetría Diferencial de barrido (DSF; *Differential Scanning Fluorimetry*)

En la técnica de fluorimetría diferencial de barrido o DSF (del inglés, "*Differential Scanning Fluorimetry*"), el despliegue de la proteína se manifiesta con un incremento de la fluorescencia de un fluoróforo cuyo rendimiento cuántico se potencia en un ambiente hidrofóbico. A medida que una proteína se va desplegando por efecto del incremento de temperatura, el fluoróforo se va uniendo a las regiones hidrofóbicas de la misma, incrementando su fluorescencia [Niesen *et al.*, 2007].

De los fluoróforos que pueden ser empleados en esta técnica, el Sypro Orange es el que presenta mejores propiedades por su alta relación señal-ruido y porque la longitud de onda necesaria para su excitación (exactamente a 492 nm) disminuye la probabilidad de que alguna molécula pequeña de la disolución pueda interferir con las propiedades ópticas del mismo.

Esta técnica permite ensayar múltiples condiciones a la vez en poco tiempo y precisa muy pequeñas cantidades (1-15 μg) y concentraciones de proteína. Es por ello que fue empleada en este trabajo para una determinación preliminar de la T_m de los diversos mutantes diseñados.

En los ensayos se emplearon placas de PCR de 96 pocillos, en cada uno de los cuales se mezclaron 2,5 o 5 μg de plastocianina oxidada o reducida en tampón fosfato 10 mM pH 7,0 con una dilución de Sypro Orange (Invitrogen) 5X, en un volumen total de 25 μl [Niesen *et al.*, 2007]. En los ensayos iniciales, para mantener la proteína en su estado totalmente reducido u oxidado, se añadieron concentraciones equimolares de ascorbato sódico o de ferricianuro potásico, respectivamente. En sucesivos intentos con la proteína reducida se sumó un paso previo de filtración en gel a través de una columna PD-10 Sephadex G-25M para eliminar el agente reductor.

Para la determinación de los valores de T_m de las formas oxidadas respecto a un gradiente de pH, se recurre a tampón citrato en un intervalo de pH entre 4,5 y 7,5, tal como se describe en la bibliografía [Feio *et al.*, 2006].

Las medidas se registraron en un sistema RT-PCR (iQ5 Real time PCR detection System, Bio-Rad) programado para que la temperatura aumentara gradualmente a razón de 1 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ desde los 20 hasta los 95 $^{\circ}\text{C}$. Los cambios en la intensidad de la fluorescencia del

Sypro Orange se midieron excitando las muestras a 492 nm y observando la emisión de fluorescencia a 575 nm. Los valores de T_m se calcularon a partir del primer mínimo negativo en la derivada de las trazas de fluorescencia registradas, usando el programa Bio-Rad IQ5.

3.3.5.1.2. Espectroscopía de fluorescencia

Los aminoácidos aromáticos triptófano, tirosina y fenilalanina, son intrínsecamente fluorescentes. Entre ellos, el triptófano presenta un mayor rendimiento cuántico y coeficiente de extinción, unido a que los residuos de tirosina y fenilalanina le transmiten por resonancia su excitación. Por ello, este aminoácido es el más adecuado para seguir el desplegamiento de una proteína [Royer, 2006].

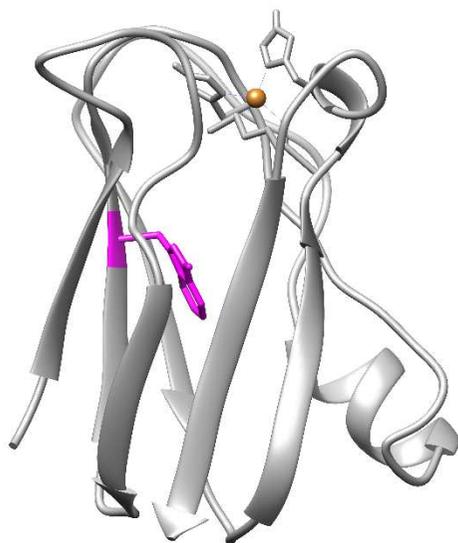


Figura 13. Detalle del residuo Trp31 en la estructura tridimensional de Syn-Pc.

La estructura de Syn-Pc se corresponde con el código pdb: 1JXD [Bertini^a *et al.*, 2001]. El átomo de cobre se muestra en naranja y sus residuos ligandos en gris.

La intensidad de la fluorescencia emitida por el fluoróforo está altamente influenciada por el entorno. El único residuo de triptófano presente en la molécula de Syn-Pc es el residuo 31, localizado en el núcleo de la proteína (figura 13). En el estado nativo, el máximo de emisión se da a 320 nm cuando las muestras son excitadas a 275 nm. El despliegue de la proteína hace que el triptófano se exponga al solvente, por lo que se atenúa su emisión y el máximo se ve desplazado a alrededor de los 350 nm. Gracias a ello se puede seguir el desplegamiento proteico mediante el incremento de fluorescencia a 350 nm.

Para la obtención de la curva de desestabilización de las Pcs por espectroscopía de fluorescencia se siguió el protocolo previamente descrito [Feio *et al*, 2004] con mínimas modificaciones. Las medidas se realizaron en un fluorímetro Cary (Varian) acoplado a un baño Polystat cc2 (Huber) para el control de la temperatura. La temperatura de la muestra se registró utilizando un sistema Digitron 2008 dotado de un termopar flexible que se insertaba en el interior de la cubeta y en contacto con la muestra.

La solución de proteína se encontraba a una concentración de 20 μM en tampón fosfato 10 mM, pH 7. Para mantener la proteína en un único estado redox a lo largo del experimento, se añadieron concentraciones equimolares de ascorbato sódico o de ferricianuro potásico. La temperatura en la cubeta se programó para que aumentara a razón de 1 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ desde los 20 hasta los 95 $^{\circ}\text{C}$. La muestra estuvo sometida a agitación continua durante todo el proceso para la homogeneización de la temperatura. Las muestras se excitaron con luz de longitud de onda de 275 nm y se monitorizó la emisión de fluorescencia a 350 nm. Como control, antes y después de cada rampa de temperatura se realizó un espectro de emisión desde 300 hasta 600 nm, mientras se excitaba la muestra con luz ultravioleta a 275 nm de

longitud de onda. Los datos de fluorescencia y temperatura se registraron cada 30 segundos y se exportaron al programa Origin Versión 8.0 para su análisis.

3.3.5.2. Dicroísmo circular

Tal como se expuso en el apartado 3.3.4.1, la espectroscopía de CD es una herramienta extremadamente útil para la monitorización de los cambios estructurales causados durante la desnaturalización proteica.

Para monitorizar los cambios de estructura secundaria durante el desplegamiento se registraron espectros de CD en el ultravioleta lejano (190-240 nm) a la vez que se incrementaba la temperatura de los 25 a los 95 °C a razón de 1 °C min⁻¹. Se registraron 3 espectros cada 5 °C con una velocidad de barrido de 200 nm min⁻¹, siendo el espectro final a cada punto el promedio de dichas medidas. Las muestras contenían 15 µM de proteína en 10 mM de tampón fosfato pH 7. La curva de desplegamiento fue obtenida siguiendo los valores de dicroísmo circular a 219 nm.

3.3.5.3. Análisis de las rampas de temperatura y obtención de la temperatura de desnaturalización

La rampa de desnaturalización térmica se puede obtener representando frente a la temperatura directamente la propiedad observada experimentalmente (en este trabajo elipticidad o emisión de fluorescencia) o bien la fracción de proteína desplegada (X_U) o plegada (X_F), calculadas a su vez a partir de dicha propiedad.

En una reacción de desplegamiento $F \leftrightarrow U$, siendo F y U las especies plegada y desplegada, respectivamente, se determina la fracción de proteína plegada:

$$X_F = \frac{[U]}{([U] + [F])} = \frac{(y_T - y_U)}{(y_F - y_U)} \quad \text{ecuación 1}$$

Y la desplegada:

$$X_U = \frac{(y_T - y_F)}{(y_U - y_F)} \quad \text{ecuación 2}$$

Donde [F] y [U] son respectivamente las concentraciones de formas plegadas y desplegadas, y_T , y_F y y_U son, respectivamente, la propiedad observada experimentalmente (elipticidad o emisión de fluorescencia) a cualquier temperatura T (Kelvin), y las observadas antes y después de la transición.

Para obtener el valor de la T_m se realiza el ajuste de la curva de desnaturalización a la ecuación resultante de la adaptación realizada por Bolen y Santoro (1988) a los procesos de desnaturalización térmica [Sinha *et al*, 2000], y en la que se asume que el valor de ΔC_p entre las formas plegada y desplegada es cero:

$$y_T = \frac{y_F + y_U e^{-\Delta\Delta m / R(1/T - 1/T_m)}}{1 + e^{-\Delta\Delta m / R(1/T - 1/T_m)}} \quad \text{ecuación 3}$$

Aunque se intentó en un inicio ajustar la dependencia de y_F e y_U con respecto a la temperatura a una función parabólica [Sinha *et al*, 2000], el resultado final no se amoldó a los datos experimentales. Esto se solucionó usando una dependencia lineal de y_F e y_U respecto a la temperatura.

De la misma forma, si se realiza la normalización de la curva respecto a la ecuación 1 y la curva de desplegamiento consiste en la

fracción de proteína desplegada frente a la temperatura, el ajuste de la ecuación se realiza respecto a la misma ecuación 3. En este caso, y_T se corresponde a la fracción de proteína desplegada a cualquier temperatura, y_F e y_U son, respectivamente, la fracción de plastocianina desplegada medida antes y después de la transición.

Independientemente de la escala usada, T_m es la temperatura de desnaturalización, definida como la temperatura a la cual la mitad de la población proteica está nativa y el otro 50% como desplegada; es decir $X_U = 0,5$. R es la constante universal de los gases y ΔH_m es ΔH^{VH} , el cambio en la entalpía de van't Hoff a temperatura igual a T_m .

3.4. Caracterización estructural de las plastocianinas mutantes mediante difracción de rayos X

Los rayos X abarcan longitudes de onda desde los 0,1 y 10 Å, estando por tanto en el mismo orden que la longitud de los enlaces moleculares (entre 0,8 y 1,8 Å). Es por ello que los rayos X se pueden usar para la elucidación de estructuras a nivel molecular.

La determinación estructural de una molécula proteica mediante difracción de rayos X se puede dividir en una serie de etapas. La primera de ellas consiste en la obtención de cristales a partir de una muestra soluble y pura de proteína.

Un cristal consiste en una red tridimensional, denominada red cristalina, en la que átomos y moléculas se organizan de forma repetitiva y periódica, con solvente entre ellas. Esta red cristalina se forma a partir de la repetición y translación ordenada de unidades más pequeñas denominadas celdilla unidad. En un cristal proteico, una celdilla unidad contiene, de promedio, una o más copias de la proteína de interés. Es la

estructura de una celdilla unidad lo que se desea obtener. Una celdilla unidad se define por sus ejes (a , b , c) y sus ángulos (α , β , γ). A su vez, la celdilla unidad se puede reducir hasta unidades asimétricas, que se relacionan entre sí mediante un elemento de simetría.

Todo lo anterior se localiza en el denominado espacio real o espacio directo.

Las condiciones en las que una proteína cristaliza son muy precisas, por lo que los experimentos de cristalización implican el escrutinio de multitud de condiciones.

Los métodos de cristalización por difusión de vapor son las técnicas de cristalización más empleadas, entre las que se encuentran las técnicas de gota colgante (*hanging drop*) y gota sentada (*sitting drop*). En ellas, la solución de proteína se mezcla con un tampón y una solución precipitante, y se coloca en una cámara cerrada donde hay también un reservorio de la solución precipitante. Por equilibrio de vapor, el agua pasará de la gota al reservorio, resultando en un gradual incremento de la concentración de solución precipitante y proteína en la gota. Como resultado, la solubilidad de la proteína puede reducirse y dar lugar a una solución súper saturada. Durante dicho proceso, se puede producir la nucleación y posterior crecimiento de cristales.

Una vez obtenido un cristal adecuado, éste se saca de la solución de cristalización con ayuda de un lazo o loop de nylon y se introduce inmediatamente en nitrógeno líquido si la solución madre dispone de suficiente crioprotector. En caso contrario, el cristal debería pasarse brevemente por un crioprotector y rápidamente introducirse en nitrógeno líquido. Los cristales deben permanecer recubiertos de la solución madre durante el proceso de montaje y colección de datos para evitar su secado y desintegración. El lazo de nylon con el cristal es entonces montado directamente en el difractómetro y sometido a una

corriente de gas criogénico. El crioprotector actúa previniendo que el agua de la solución madre cristalice durante el rápido proceso de congelación, lo cual reduciría la calidad de la difracción del cristal. Dentro del cristal, la formación de hielo está impedida debido a que la propia proteína actúa como crioprotector.

El cristal se sitúa en el difractómetro entre una fuente y un detector de rayos X.

Una red cristalina puede ser dividida en una serie de planos imaginarios conocidos como planos de Miller. Estos pueden ser identificados por tres números enteros conocidos como índices de Miller (h, k, l), los cuales se pueden calcular a partir del número de veces que un grupo de planos de Miller paralelos intercepta cada uno de los ejes de la celdilla unidad. Cuando el cristal es irradiado por un haz de rayos X, los electrones de cada grupo de planos de Miller difractan el haz en todas direcciones, dando lugar al patrón de difracción recogido en el detector. Cada mancha del patrón de difracción es el resultado de la suma de la difracción por un grupo de planos de Miller, por lo que cada mancha puede ser relacionada con un valor hkl . La forma en la que los rayos X son difractados depende de la estructura del cristal, por lo que cada cristal genera un patrón de difracción único. Según la ley de Bragg, las manchas del patrón de difracción se producen cuando se cumple que $2d\sin\theta = n\lambda$, siendo d la distancia entre planos de Miller equidistantes, θ el ángulo al cual incide el haz de rayos X con el plano, λ la longitud de onda de la radiación usada, y n , un número entero referente al orden de difracción, y es frecuentemente la unidad.

Cada mancha lleva también asociado un valor de intensidad relacionado con la amplitud de la onda, lo cual se corresponde con el contenido de dichos planos. Por tanto, la red recíproca representa cada set de planos de Miller equidistantes como un punto recíproco discreto.

La red recíproca consiste básicamente en los puntos de una red regular que cumple con la ley de Bragg.

La ley de Bragg se puede reordenar de forma que $\sin\theta = \left(\frac{n\lambda}{2}\right)\left(\frac{1}{d}\right)$. Esta relación implica que una red cristalina con valores de d largos dará lugar a patrones de difracción comprimidos, mientras que valores pequeños de d se reflejará en patrones de difracción más expandidos.

Los primeros grupos de datos recogidos en el experimento de difracción van destinados a saber la idoneidad del cristal, así como para determinar las dimensiones de la celdilla unidad. A raíz de estos cálculos preliminares, el sistema determina la estrategia a seguir para la colección de datos.

El procesamiento de todos los grupos de datos generados en el experimento de difracción genera el denominado espacio recíproco del cristal bajo estudio. Una vez colectados los datos, estos son integrados y escalados. Toda la información obtenida se recoge en un documento con extensión *.hkl* que contiene los índices de Miller (valores hkl), la intensidad de cada punto de difracción o reflexión (I) y la desviación estándar (σ).

A partir de esta información, se genera un nuevo documento que agrupa las dimensiones de la celdilla unidad y la información sobre el contenido molecular del cristal, lo que, combinado con los datos de difracción, permite la determinación del grupo espacial.

El siguiente paso consiste en la resolución de la estructura, lo que permite la obtención de un modelo molecular. Para poder resolver la estructura interna del cristal es necesario conocer la densidad electrónica. Los espacios real y recíproco se encuentran relacionados mediante las series de Fourier. Por ello, la densidad electrónica en

cualquier punto de la red cristalina se puede determinar mediante la Transformada de Fourier:

$$\rho_{xyz} = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}| \cos 2\pi(hx + ky + lz - \alpha_{hkl})$$

Siendo ρ_{xyz} la densidad electrónica para una localización (x, y, z), V, el volumen de la celdilla unidad, F_{hkl} , los factores estructurales, y α_{hkl} el ángulo de fase para cada reflexión. Cada factor estructural, F_{hkl} , contiene información sobre las posiciones de todos los átomos de todos los objetos relacionados por simetría dentro de la celdilla unidad. Los factores estructurales son una representación matemática de la interacción entre las moléculas en un cristal con los rayos X. Su magnitud es proporcional a la raíz cuadrada de la intensidad observada para una determinada mancha de difracción.

Por tanto, para solventar la estructura cristalina se requiere para cada punto de difracción la amplitud, dirección y ángulo de fase del rayo X incidente. A diferencia de la amplitud (basada en la intensidad de los rayos X) y de la dirección (índices de Miller de cada reflexión), el ángulo de fase no puede extraerse directamente de los experimentos de difracción. Una de las estrategias que se puede seguir para solucionar el problema de la fase recibe el nombre de remplazamiento molecular. Mediante esta técnica se usan como fases iniciales del modelo las de una estructura proteica ya resulta y con un grado de identidad de secuencia de un 30% como mínimo con la estructura a solventar. Las amplitudes de los factores estructurales son calculadas a partir de las intensidades experimentales de la proteína cuya estructura se desea elucidar. Como resultado de la solución de la estructura y resolución del problema de las fases, se obtiene un mapa de densidad en el que los átomos están ordenados para formar un modelo reconocible de la molécula a resolver. El siguiente paso es el refinamiento de la estructura, consistente en un

proceso reiterativo en el cual el modelo molecular es ajustado y comparado con los datos provenientes de los experimentos de difracción. Este proceso conduce gradualmente al acercamiento de los factores estructurales calculados (los del modelo estructural) a los observados (los de los datos experimentales), hasta que se alcanza la estructura final.

Los procesos de cristalización, difracción de rayos X, resolución y refinamiento de las estructuras fueron realizados en el *Diamond Light Source* (Didcot, UK). Todo el proceso se ha realizado en colaboración con los doctores Armin Wagner y Michael Engel.

3.4.1. Cristalización

Los procesos de cristalización de Syn-A44D/D49P/A62L, Syn-V48I y Pho-P48G/G50P se llevaron a cabo en su mayor parte en las instalaciones del *Diamond Light Source* de Didcot, (Oxfordshire, UK) bajo la supervisión del Dr. Armin Wagner.

Parte de los test para Pho-P49/G50P fueron realizados en el propio instituto IBVF de Sevilla.

3.4.1.1. Syn–A44D/D49P/A62L

La estructura cristalográfica a una resolución de 0,215 nm del triple mutantes Syn–A44D/D49P/A62L [Romero *et al.*, 1998] se encuentra disponible en la *Protein Data Bank* bajo el código 1PCS.pdb. Para la obtención de nuevos cristales de este mismo mutante se siguieron las condiciones descritas en la bibliografía, con la salvedad del pH de la solución precipitante. Un pH de 6,5 en vez de 6 nos aseguraría estar lo suficientemente alejados del punto de transición ácida (pKa 4,9 - 5,7 en plastocianinas) [Dennison y Lawler, 2001] y que el centro de cobre tuviera la configuración correcta.

La cristalización fue llevada a cabo por los métodos de difusión por gota colgante (*“hanging drop”*) y gota sentada (*“sitting drop”*), mezclando 2, 3 o 4 μl de una solución de plastocianina oxidada a una concentración de 10 mg ml^{-1} en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7 con el mismo volumen de la solución precipitante. Tanto la solución precipitante como la del reservorio consistieron en una solución de sulfato amónico 3,2 M en tampón fosfato sódico potásico 0,1 M, pH 6,5. Las placas se incubaron tanto a 4 como a 19 °C.

3.4.1.2. Syn-V48I

Para el mutante Syn-V48I se probaron inicialmente las condiciones de cristalización usadas para el triple mutante Syn-A44D/D4P/A62L que derivaron en mejores resultados: 4 μl de una solución de proteína oxidada 10 mg ml^{-1} en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7 mezclada con el mismo volumen de una solución de sulfato amónico 3,2 M en tampón fosfato sódico potásico 0,1 M, pH 6,5. La cristalización fue llevada a cabo mediante el método de *gota colgante* y 19 °C como temperatura de incubación.

Posteriormente se realizaron diferentes pruebas:

- Variando las concentraciones de sulfato amónico (3,2, 2,7 y 2,2 M) en las soluciones precipitantes y reservorio, manteniendo el resto de condiciones constantes e iguales a las iniciales.
- Variando las concentraciones de proteína (10, 9, 8 y 7 mg ml^{-1}), manteniendo el resto de condiciones constantes e iguales a las iniciales, a excepción de la concentración de sulfato amónico en las soluciones precipitantes y reservorio, que se fijó en 2,7 M.
- Variando las concentraciones de sulfato amónico (2,7, 2,6, 2,5, 2,4, 2,3, y 2,2 M) en las soluciones precipitantes y reservorio,

manteniendo el resto de condiciones constantes e iguales a las iniciales, a excepción de la concentración de proteína, que se fijó en 7 mg ml⁻¹.

Como última aproximación se procedió a la utilización de microcristales de Syn-A44D/D49P/A62L como semillas para facilitar la nucleación de Syn-V48I [Bergfors, 2003]. Las gotas de Syn-V48I se prepararon con concentraciones de proteína oxidada entre 2 y 7 mg mL⁻¹ en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7 y sulfato amónico 2,7 M en tampón fosfato sódico potásico 0,1M. Para obtener las semillas, se rompieron cristales de Syn-A44D/D49P/A62L y se suspendieron los microcristales resultantes en 100 µl de la misma solución precipitante usada para las gotas de Syn-V48I. Las semillas de plastocianina se añadieron a la gota con ayuda de una fibra natural (Hampton Research) previamente bañada en la solución de microcristales. Las placas se incubaron a 19 °C.

3.4.1.3. Pho-P49G/G50P

Para determinar las condiciones de cristalización para el doble mutante P49G/G50P de la plastocianina de *P. laminosum* se partieron de condiciones establecidas en la bibliografía para la forma silvestre [Bond *et al.*, 1999] y para otros mutantes de dicha proteína [Crowley *et al.*, 2008]. Se descartaron aquellas condiciones cuyo resultado fue un cristal sin color, y por tanto, reducido. Todas las condiciones ensayadas se listan en el Material suplementario.

3.4.2. Colección de datos de difracción y refinamiento

Los procesos de obtención de datos cristalográficos, procesamiento y refinamiento fueron realizados en su mayor parte por los Doctores Armin Wagner y Michael Engel.

Los datos de difracción fueron registrados en la línea de haz (*beamline*) I04 del sincrotrón, perteneciente a la sección de cristalografía macromolecular, del *Diamond Light Source* de Didcot, (Oxfordshire, UK). Mientras que para el cristal del triple mutante Syn-A44D/D49P/A62L se usó sulfato amónico 1 M como crioprotector, en el caso del cristal del mutante simple Syn-V48I no fue necesario crioprotector. El experimento fue llevado a cabo estando en todo momento los cristales sometidos a una corriente de nitrógeno gas a $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La integración de las intensidades de los patrones de difracción y la obtención de los índices de Miller se realizaron mediante el paquete informático XDS [Kabsch, 2010]. Para resolver el problema de las fases se recurrió al método de remplazamiento molecular, para lo cual las fases iniciales fueron extraídas de la estructura previamente publicada del triple mutante Syn-A44D/D49P/A62L (código pdb: 1PCS; Romero *et al.*, 1998) usando el programa Phaser [McCoy *et al.*, 2007].

Para evitar obtener un modelo final sesgado, todos los residuos de la estructura fueron sustituidos por alanina como paso previo al refinamiento. Para el mutante Syn-V48I fue necesario, además, eliminar las secuencias entre los residuos 7 y 11 y los residuos 44 y 50.

Fueron necesarios sucesivos pasos de refinamiento y modelado manual de la molécula, realizados con los programas PHENIX [Adams *et al.*, 2002; Adams *et al.*, 2011] y COOT [Emsley *et al.*, 2010]. Todas las cadenas laterales se añadieron y ajustaron siguiendo como guías los mapas 2Fo-Fc y Fo-Fc. Las moléculas de agua se añadieron manualmente en las regiones donde el mapa Fo-Fc presentaba máximos de 3.0σ .

4. RESULTADOS

4.1. Diseño de los mutantes de la plastocianina de *Synechocystis* sp. PCC6803

4.1.1. Mutaciones introducidas en la zona de interacción del lazo L5 con el barril: cluster hidrofóbico

Los lazos L1 y L5 son las zonas de mayor fluctuación en todas las Pc [Bertini^a *et al.*, 2001; Arcangeli *et al.*, 2001; Feio *et al.*, 2006; Muñoz-López^b *et al.*, 2010], inclusive Syn-Pc y Pho-Pc. Por tanto, incrementar las interacciones hidrofóbicas entre los lazos vecinos L5 y L7 puede dar lugar a la estabilización de Syn-Pc.

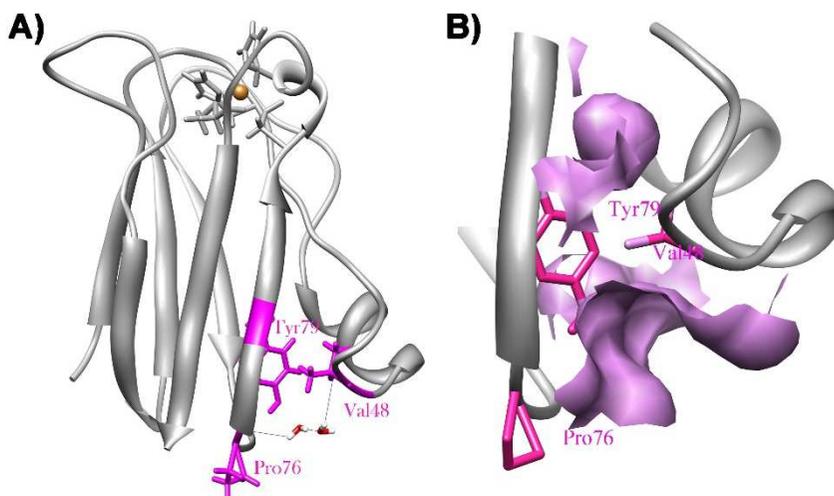


Figura 14. Estructura tridimensional de Syn-Pc y detalle de la interfase entre los lazos L5 y L7.

(A) Estructura tridimensional de Syn-Pc (código pdb: 1JXD; Bertini^a *et al.*, 2001) mostrando en magenta los residuos implicados en la formación de la agrupación hidrofóbica entre el lazo L5 y el barril, y, en naranja, el átomo de cobre. Las moléculas de agua fueron introducidas con el módulo “Solvate” de Chimera. **(B)** Detalles de la interfase entre los lazos L5 y L7 de Syn-Pc mostrando la cavidad hidrofóbica, calculada usando la aplicación “CASTp” [Binkowski *et al.*, 2003].

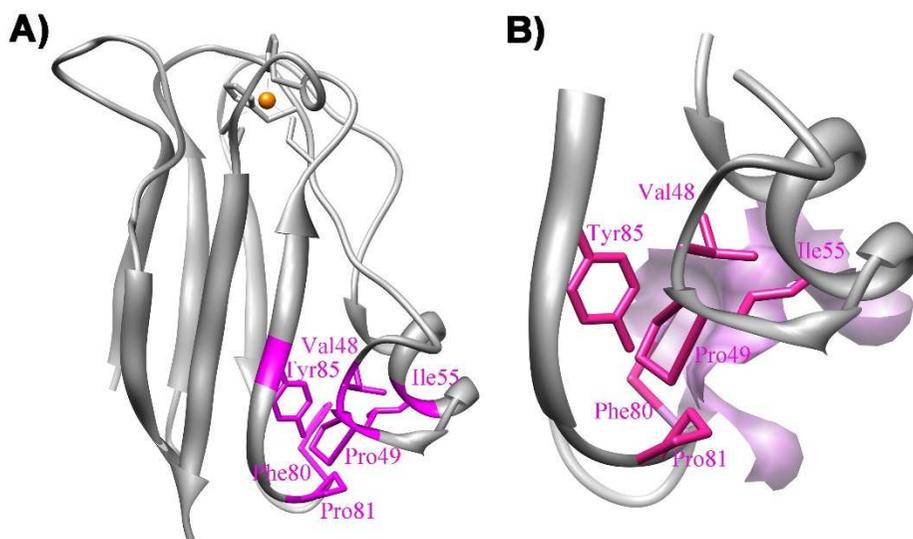


Figura 15. Estructura tridimensional de Pho-Pc y detalle de la interfase entre los lazos L5 y L7.

(A) Estructura tridimensional de Pho-Pc (código pdb: 1BAW; Bond *et al.*, 1999) donde se muestran en color magenta los residuos implicados en la formación de la agrupación hidrofóbica entre el lazo L5 y el barril. El átomo de cobre se muestra en naranja. **(B)** Detalles de la interfase entre los lazos L5 y L7 de Pho-Pc mostrando la cavidad hidrofóbica calculada usando la aplicación “CASTp” [Binkowski *et al.*, 2003].

En el entorno del lazo L5 de Syn-Pc existe una cavidad en la que se intercalan dos moléculas de agua (figura 14) que participan, junto con residuos de los lazos L5 y L7 en la formación de una red de puentes de hidrógeno. En su homóloga termorresistente, Pho-Pc, el lazo L5 presenta una inserción de tres residuos que permite la formación de una agrupación hidrofóbica constituida por los residuos de Phe80, Val48, Ile55, Pro81, Pro49 y Tyr85 (figura 15). En Syn-Pc dicha agrupación se reduce a la Tyr79, la Val48 y la Pro76 [Muñoz-López^b *et al.*, 2010]. La importancia de esta región en la estabilidad térmica de Pho-Pc se demuestra en mutantes en los que la Phe80 se cambia a alanina y la

Pro49 se intercambia con la Gly50, siguiente residuo en la secuencia [Muñoz-López^a *et al.*, 2010].

4.1.1.1. Sustitución V48I.

La valina 48 se localiza en el lazo L5, participando en su interacción con el barril (figura 16). Se espera que la adición de un grupo metilo mediante la sustitución de este residuo por una isoleucina reduzca el hueco entre el lazo L5 y el barril, incrementando las interacciones hidrofóbicas de la agrupación, disminuyendo la solvatación, así como reforzando las interacciones de Van der Waals entre los residuos de este área.

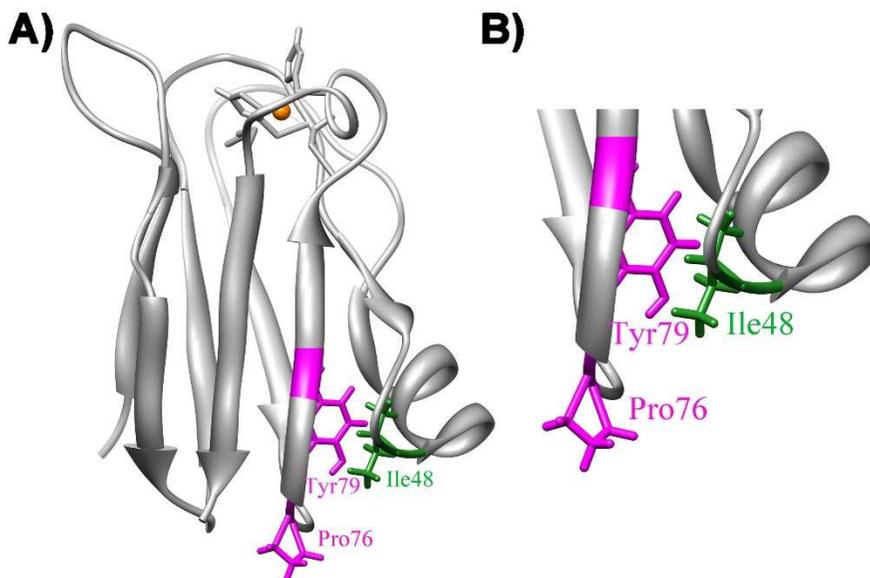


Figura 16. Mutación V48I en Syn-Pc.

(A) Estructura tridimensional de Syn-Pc (código pdb: 1JXD; Bertini^a *et al.*, 2001) donde se ha mutado el residuo Val48 a Ile. (B) Representación a mayor escala la interfase entre los lazos L5 y L7 de la Pc mutada. El residuo Ile48 se encuentra coloreado en verde. Se muestran en magenta los residuos que, junto al 48, forman la agrupación hidrofóbica en Syn-Pc.

4.1.1.2. Sustituciones L56I, T52Y y T52I

La Leu56 (figura 17) se localiza en el inicio de la hélice α de Syn-Pc. Su reemplazo por un residuo de isoleucina, más voluminoso, pretende incrementar las interacciones hidrofóbicas de esta región. Este residuo también se encuentra en Pho-Pc (Ile55).

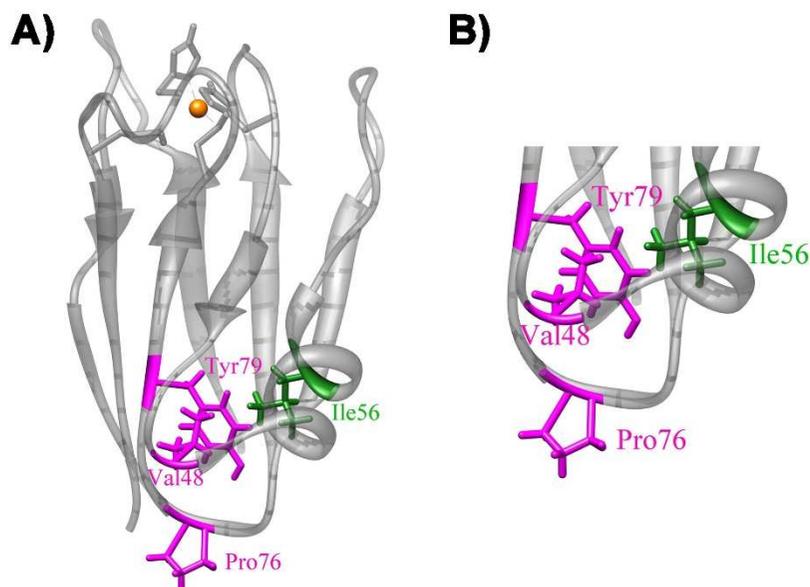


Figura 17. Mutación L56I.

(A) Estructura tridimensional de Syn-Pc (código pdb: 1JXD; Bertini^a *et al.*, 2001) donde se ha mutado el residuo Leu56 a Ile. **(B)** Representación a mayor escala la interfase entre los lazos L5 y L7 de la Pc mutada. El residuo reemplazado se colorea en verde. Se muestra en magenta los residuos que, junto al 48, forman la agrupación hidrofóbica en Syn-Pc.

La treonina 52 se localiza en la zona intermedia de la hélice α de Syn-Pc (figura 18A). Pho-Pc presenta en esa misma posición un residuo más voluminoso (Ile55), implicado en la formación de la agrupación hidrofóbica (figura 15). Por tanto, el cambio T52I se consideró razonable para estabilizar esta región.

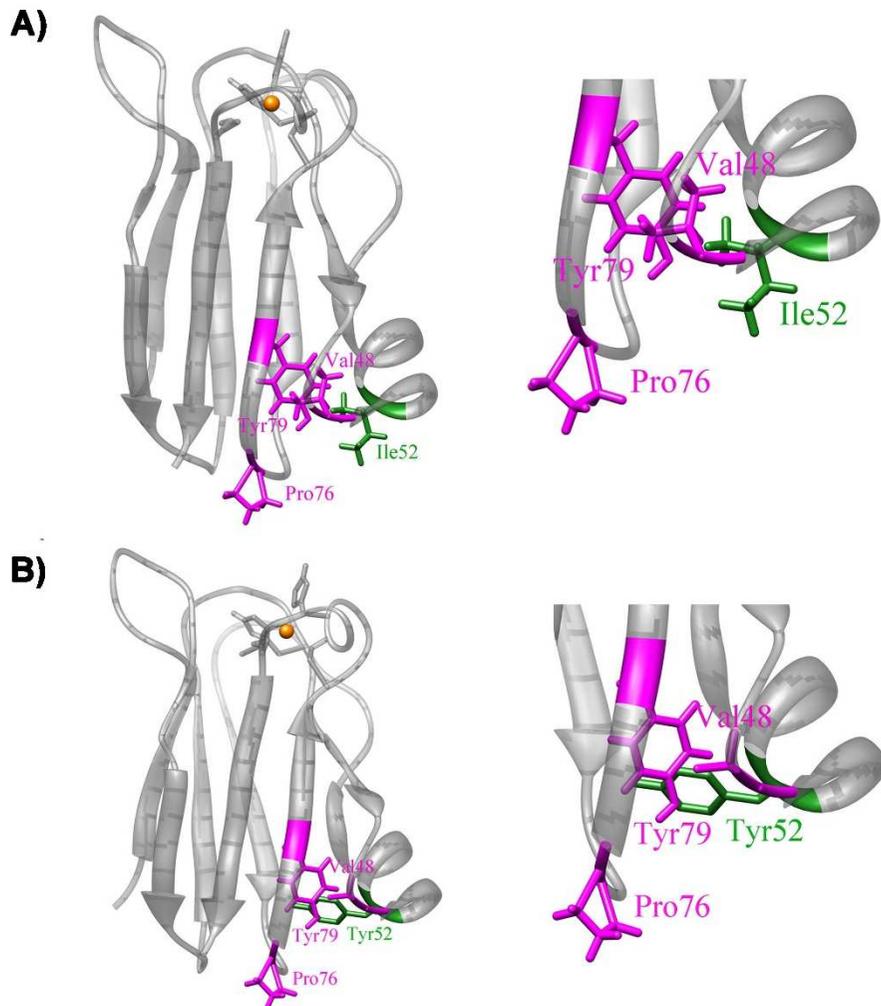


Figura 18. Mutaciones T52I y T52Y.

Estructura tridimensional de Syn-Pc (código pdb: 1JXD; Bertini^a *et al.*, 2001) donde se han mutado el residuo Thr52 a Ile (**A**) o a Tyr (**B**). A la derecha de la figura se muestran a mayor escala la interfase entre los lazos L5 y L7 de cada uno de los mutantes. Los residuos reemplazados se colorean en verde. Se muestran en magenta los residuos que, junto al 48, forman la agrupación hidrofóbica en Syn-Pc.

Las proteínas termoresistentes suelen usar los residuos aromáticos como parte de sus agrupaciones porque su empaquetamiento

da lugar a regiones relativamente rígidas [Kannan, 2000]. De hecho, Pho-Pc muestra un residuo aromático (Phe80) en el lazo L7 que se encuentra ausente en Syn-Pc. El cambio T52Y (figura 18B) en el lazo L5 pretende aliviar en parte esta falta creando una interacción de este residuo con Tyr79.

4.1.1.3. Mutantes en las hebras $\beta 5$ y $\beta 6$: G60A, K59S y V42I

Syn-Pc y Pho-Pc difieren en los patrones de puentes de hidrógeno entre las hebras $\beta 5$ y $\beta 6$ a temperatura ambiente [Muñoz-López^b *et al.*, 2010]. Esta desigualdad se debe posiblemente a la presencia de una glicina en posición 60 en Syn-Pc en lugar de un residuo de glutamina en la posición correspondiente de Pho-Pc (figura 11B). Como ya se mencionó en la introducción, los residuos de glicina presentan una elevada entropía conformacional y dan también lugar a volúmenes vacíos o cavidades en el interior de la estructura proteica [Creighton, 1997], por lo que en proteínas termofílicas suelen ser sustituidos normalmente por alanina (figura 19).

Otra diferencia en la secuencia entre ambas proteínas radica en la lisina 59, que en Pho-Pc, es una serina (figura 11). Por tanto, se introduce el cambio K59S en Syn-Pc (figura 13).

La Val42 en Syn-Pc se corresponde con un residuo de leucina en la proteína termofílica (figura 11). Aunque este residuo no parece ser el responsable de la diferente proporción de puentes de hidrógeno entre ambas proteínas, el programa CUPSAT [Parthiban *et al.*, 2006] indica que la mutación V42I sería la más estabilizante dentro de la cara este. Según esta aplicación, la mutación V42I muestra un valor de $\Delta\Delta G_c$ de 1,27 kJ mol⁻¹.

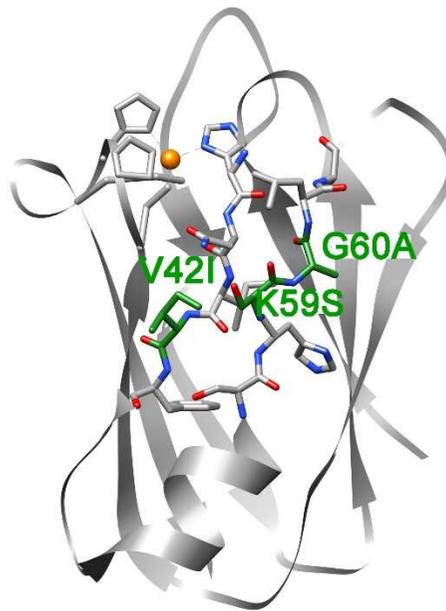


Figura 19. Mutaciones V42I, K59S y G60A

Estructura tridimensional de Syn-Pc (código pdb: 1JXD; Bertini^a *et al.*, 2001) donde se marcan en verde las mutaciones V42I, G60A y K59S.

4.1.1.4. Sustitución A3F

Cálculos previos de dinámica molecular realizados por miembros del grupo muestran que las hebras $\beta 1$ y $\beta 2$ de Syn-Pc son menos estables que en Pho-Pc, lo que a su vez repercute en la estabilidad de la tercera hebra β . De hecho, la movilidad de toda esta región en Syn-Pc es elevada [Feio *et al.*, 2006]. Sin embargo, en Pho-Pc esta misma región se muestra más rígida en las simulaciones bajo idénticas condiciones.

Como ya se adelantó en la introducción, Pho-Pc tiene un residuo de Phe en la posición 3 (hebra $\beta 1$) que interacciona mediante contactos de Van der Waals con las Val21 y Val23 (Ile23 en Syn-Pc) (hebra $\beta 3$). En Syn-Pc hay una alanina en lugar de Phe3 (figura 20). Cabe además

destacar que la mutación F3A en Pho-Pc resultó en una caída de 10°C en la T_m de la proteína [Muñoz-López^a *et al.*, 2010].

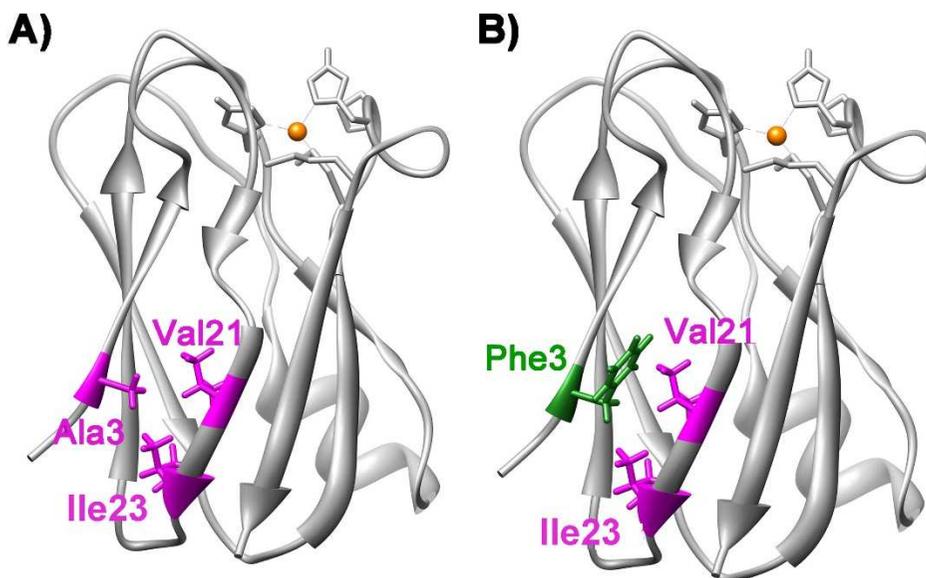


Figura 20. Mutación A3F

(A) Estructura tridimensional de Syn-Pc (código pdb: 1JXD; Bertini^a *et al.*, 2001) mostrando los residuos Ala3, Val21 e Ile23 en magenta. **(B)** La Ala3 se ha cambiado por un residuo de fenilalanina, tal como se encuentra en esa misma posición en Pho-Pc. Los residuos modificados se colorean en verde.

4.1.1.5. Mutantes múltiples.

El mutante triple Syn-A44D/D49P/A62L (figura 21B) fue obtenido por la doctora Berta de la Cerda [Romero *et al.*, 1998]. A diferencia del silvestre (figura 21A), es capaz de mantenerse estable durante días en su forma oxidada, lo cual permitió obtener cristales y la posterior resolución de su estructura (código pdb: 1PCS). Las tres sustituciones, localizadas en los extremos de las hebras quinta y sexta, restablecen en Syn-Pc residuos conservados en la mayor parte de las Pc.

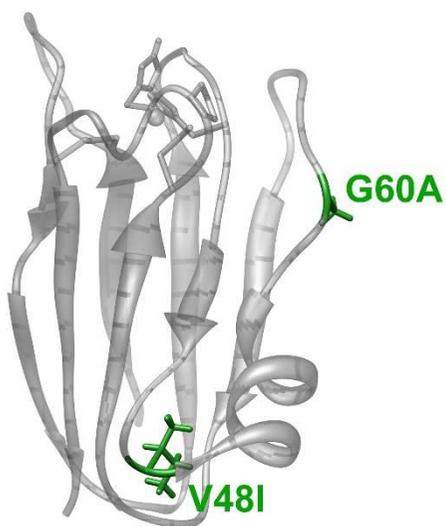
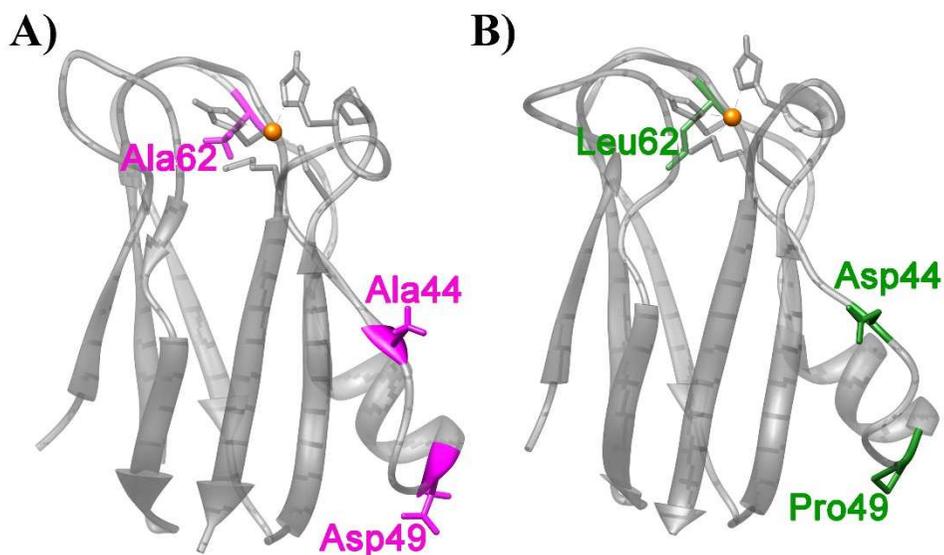


Figura 22. Doble mutante V48I/G60A

Estructura tridimensional de Syn-Pc (código pdb: 1JXD; Bertini^a et al., 2001) donde se muestran en verde los residuos mutados V48I y G60A.

El mutante doble V48I/G60A (figura 22) fue diseñado tras los resultados obtenidos con los mutantes simples V48I y G60A.

4.1.2. Análisis de las mutaciones mediante el programa CUPSAT

La aplicación CUPSAT se usó como elemento de apoyo en el diseño de los diferentes mutantes. Las $\Delta\Delta G_c$ calculadas por este programa para los diferentes mutantes se muestran en la tabla 3. No fue posible la estimación de las mutaciones múltiples, debido a que, a pesar de las instrucciones del programa, no se pudieron subir estructuras no existentes en la PDB.

Tabla 3. Valores de $\Delta\Delta G_c$ calculadas mediante CUPSAT para los mutantes diseñados

Un valor positivo indica para $\Delta\Delta G_c$ indica que el mutante es más estable que la forma silvestre.

Mutante	$\Delta\Delta G_c$ (kJ mol ⁻¹)	Mutante	$\Delta\Delta G_c$ (kJ mol ⁻¹)
Syn-A3F	+ 1,94	Syn-T52Y	-0,82
Syn-V48I	- 1,90	Syn-V42I	+1,27
Syn-G60A	+ 0,29	Syn-K59S	-3,50
Syn-T52I	+0,65	Syn-L56I	-0,26

Como se verá más adelante, la aplicación resultó acertada en el 62,5% de los casos, errando para las mutaciones A3F, V48I y V42I. Sin

embargo, el grado en el que dichos mutantes estabilizan según el programa no se adecua a los resultados obtenidos. De hecho, el mutante que resultó experimentalmente más inestable (A3F), CUPSAT lo marca como la mutación más favorecedora entre las estudiadas. Igualmente, Syn-V48I, como queda patente más adelante en este trabajo, es uno de los mutantes estabilizadores más interesantes, contrario a las predicciones de CUPSAT.

Cabe indicar que el mutante V42I fue el único que se diseñó siguiendo como único criterio a su favor este programa. Al contrario de lo indicado por CUPSAT, este cambio derivó en una Pc menos estable que la forma silvestre.

4.2. Simulaciones de dinámica molecular de corta duración

Para desechar aquellos cambios en la secuencia de Syn-Pc que desestabilizaran la estructura y estabilidad proteica, y previo a la parte experimental, se calcularon dinámicas cortas de 1 ns a temperatura ambiente (298 K) de todos aquellos mutantes de Syn-Pc que se habían barajado para este trabajo. Tal como se menciona en materiales y métodos, y debido al poco tiempo de simulación (1 ns), para cada sustitución se seleccionaron dos posible rotámeros (R1 y R2).

En la figura 23 se han representado los RMSDs en función del tiempo para Syn-Pc y los distintos mutantes diseñados durante este trabajo. Para cada uno de los mutantes se muestran los datos correspondientes a los rotámeros de partida para la simulación, tal como se explica en materiales y métodos. Para el cálculo de los RMSDs se han tenido en cuenta únicamente los esqueletos polipeptídicos.

En la mayor parte de los casos los RMSDs se mantienen alrededor de 0,08 nm, a excepción del rotámero R1 de Syn-V48I, Syn-T52I y Syn-L56I, que alcanzan valores de 0,13 nm al final de la trayectoria. Entre ellos, únicamente Syn-T52I_R1 sufre una recuperación.

Por tanto, el seguimiento de los RMSDs indica que estas estructuras son estables a lo largo de la trayectoria, sin sufrir un proceso de desnaturalización o alteración grave de sus conformaciones respecto a la estructura de partida.

Las fluctuaciones atómicas más elevadas en Syn-Pc, medidas como RMSF, se localizan en regiones de lazos. Destacan las secuencias 10-12, 46-48 y 65-67, localizadas en los lazos L1, L5 y L6, respectivamente (figura 23B). Estos resultados son coherentes con los obtenidos en anteriores trabajos [Muñoz-López^b *et al.*, 2010].

Las diversas mutaciones introducidas en la estructura de esta proteína afectan de diferente forma a su motilidad. La secuencia comprendida entre el residuo 42 y 62 (correspondiente a la cara este) es la que resulta más afectada por todos los cambios, lo cual resulta lógico debido a que todas las mutaciones, a excepción de la A3F, se ubican en esta región. Entre ellos, ambos rotámeros de la mutación L56I, así como el rotámero R2 de Syn-V48I, aumentan claramente el RMSF en dicha zona. La mutación Syn-A3F, aún localizándose totalmente opuesta a la cara este, induce una disminución de la flexibilidad de dicha región, entre los residuos 48 y 62.

La movilidad de la región entre los residuos 6 y 16 también se afecta por las mutaciones. Dicha zona engloba al lazo L1, a parte de la hebra β 1 y a la hebra β 2 completa. Ésta se localiza, como previamente se ha mencionado, en el lado opuesto a la cara este en la estructura proteica. Las mutaciones que más alteran el RMSF de esta región son

A3F, G60A, T52I_R2, V48I y K59S_R1, incrementándolo, y T52I_R1, T52Y y K59S_R2, disminuyéndolo.

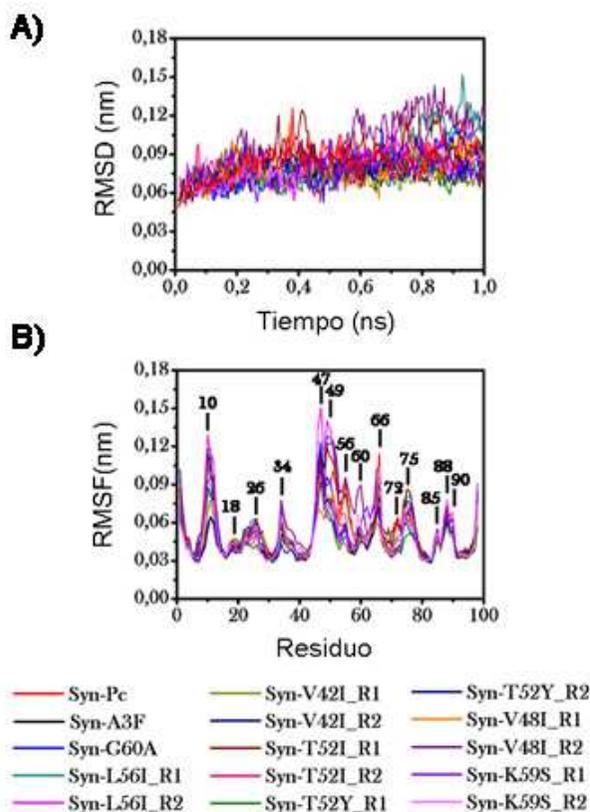


Figura 23. Desviaciones (RMSD) y fluctuaciones cuadráticas medias (RMSF) a lo largo de las trayectorias calculadas a 298K y durante 1 ns.

A) Desviaciones medias de las coordenadas atómicas (*“Root mean Square deviation”* o RMSD) a lo largo de las trayectorias con respecto a las iniciales, calculadas a 298K y durante 1 ns, considerando únicamente los átomos del esqueleto polipeptídico. En la parte inferior se muestra el patrón de color para cada mutante y rotámero. R1 se refiere al rotámero que implica el mínimo grado de colisiones con residuos colindantes y R2 al rotámero con mayor probabilidad acorde con la librería de rotámeros, según la librería Dunbrack (Dunbrack 2002).

B) Fluctuaciones cuadráticas medias (*“Root Mean Square Fluctuation”* o RMSF) de los C α , calculados a lo largo de la fase estable de la trayectoria.

Ninguna de las mutaciones ha incrementado el RMSF correspondiente al lazo L6 respecto a la forma silvestre (máximo en el residuo 65).

4.3. Análisis de la termoestabilidad de Syn-Pc mediante mutagénesis dirigida

4.3.1. Expresión y purificación de plastocianinas silvestres y mutantes.

En la tabla 4 se exponen los rendimientos de producción (mg L^{-1}) en *E.coli* DH5a tanto de la forma silvestre como de los mutantes de Syn-Pc estudiados en este trabajo. La tasa de expresión varía entre $4,16 \text{ mg L}^{-1}$ de Syn-V48I y los $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ de Syn-A3F, lo que supone $3,5 \text{ mg L}^{-1}$ de diferencia.

Tabla 4. Rendimientos de producción de las distintas plastocianinas usadas para este trabajo.

Los valores se refieren a la concentración de Pc en los extractos de periplasma obtenidos tal como se comenta en el apartado 3.3.3 de materiales y métodos.

Proteína	Rendimiento (mg L^{-1})	Proteína	Rendimiento (mg L^{-1})
Syn-Pc	2,37	Syn-V42I	1,06
Syn-V48I	4,16	Syn-K59S	1,23
Syn-G60A	1,7	Syn-A3F	0,6
Syn-T52I	1,58	Syn-V48I/G60A	2,66
Syn-T52Y	1,21	Syn-	3,86
Syn-L56I	0,9	A44D/D49P/A62L	

Tabla 5. Porcentaje de recuperación de proteína en cada uno de los procesos de purificación hasta la obtención de la proteína pura.

La purificación se llevó de acuerdo al apartado 3.3.3.2 de materiales y métodos. Para los cálculos se tienen en cuenta sólo las fracciones obtenidas con una razón de pureza R inferior a 5, 3 y 2,5 para la cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de enfoque y filtración en gel, respectivamente. n.a. no se aplica.

Proteína	Porcentaje de recuperación			Cantidad final de proteína (mg L ⁻¹)
	Intercambio aniónico	Cromatografía de enfoque	Filtración en gel	
	(R<5)	(R<3)	(R<2,5)	
Syn-Pc	82,0	72,0	55,5	1,3
Syn-V48I	81,5	73,0	59,5	2,5
Syn-G60A	94,0	51,0	49,3	0,8
Syn-T52I	76,0	61,0	46,9	0,7
Syn-T52Y	90,0	58,4	52,6	0,6
Syn-L56I	79,6	46,5	54,2	0,5
Syn-V42I	81,3	55,0	57,0	0,6
Syn-K59S	81,5	45,2	47,7	0,6
Syn-A3F	71,0	26,0	n.a.	0,2
Syn-V48I/G60A	90,0	45,0	53,2	1,4
Syn-A44D/D49P/A62L	82,7	53,5	44,7	1,7

La tabla 5 muestra los rendimientos (%) en los sucesivos pasos de purificación. Los rendimientos medios fueron del 82,7, 53,3 y 48,0% para los pasos de cromatografía de intercambio aniónico,

cromatoenfoco y cromatografía de filtración en gel, respectivamente. El coeficiente de absorción usado fue de $4,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 597 nm para la forma oxidada de la proteína [Hervás *et al.*, 1993].

A diferencia del resto de mutantes, Syn-A3F se producía en baja proporción. Además, precipitaba en los procesos de diálisis y pasos sucesivos de purificación, llegándose a perder hasta la tercera parte de la producción proteica inicial. Debido a ello, se omitió la tercera fase de purificación consistente en la columna de filtración en gel. La alícuota de proteína más pura presentaba una razón R de 2,5, suficiente para los ensayos para los cuales se iba a emplear.

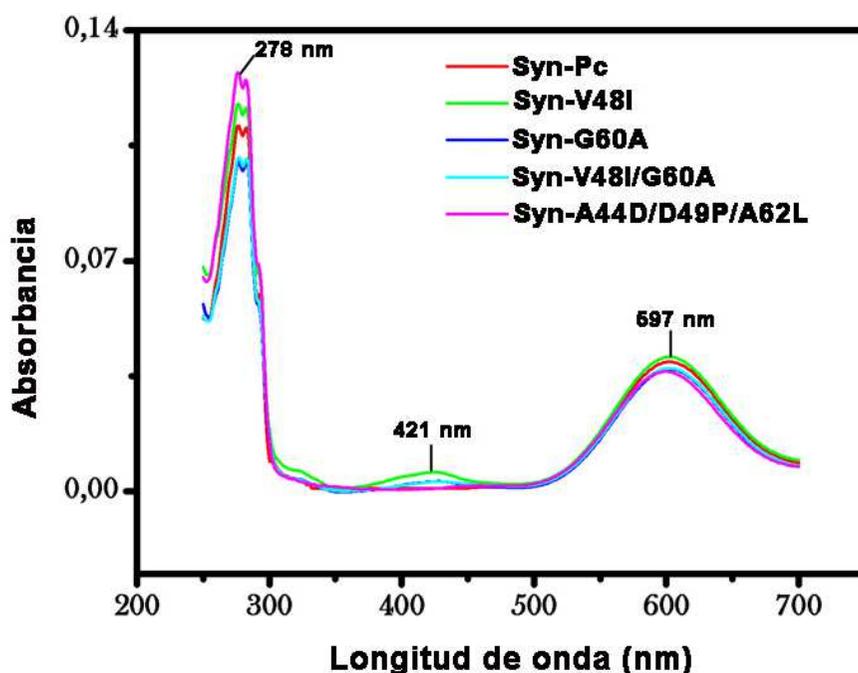


Figura 24. Espectros de absorción en el Uv/vis de Syn-Pc, Syn-V48I, Syn-G60A, Syn-V48I/G60A y Syn-A44D/D49P/A62L.

Espectros obtenidos a partir de las proteínas en estado oxidado. Los espectros se obtuvieron en tampón fosfato 10 mM pH 7 y en presencia de ferricianuro potásico para oxidar los centros metálicos de las Pc.

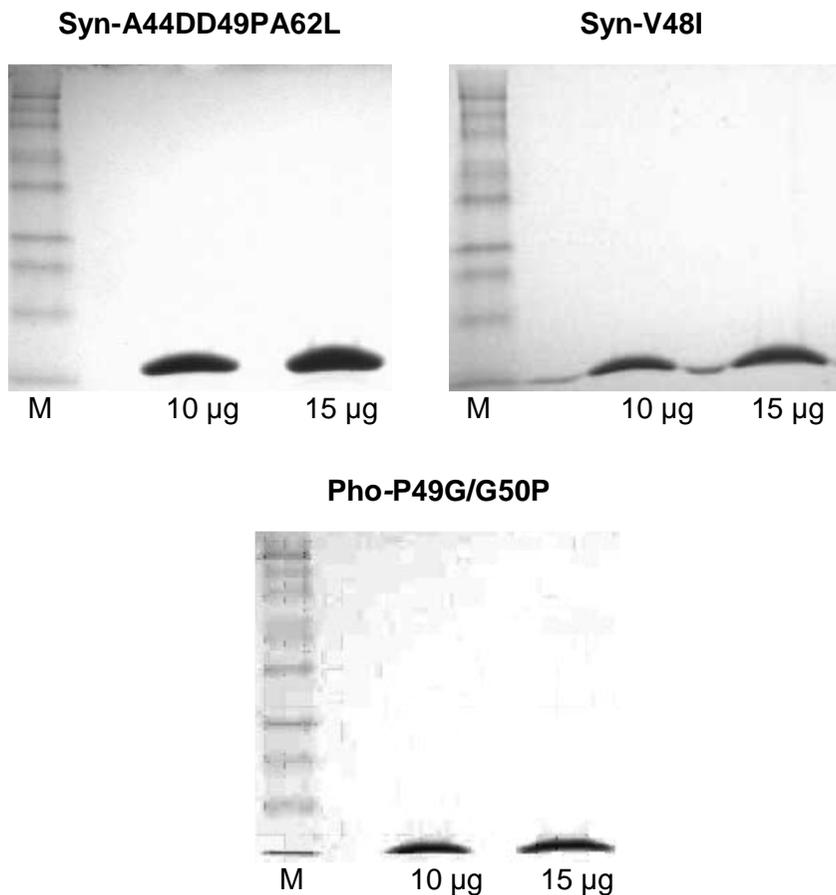


Figura 25. Gel de electroforesis en acrilamida y condiciones desnaturizantes de Syn-V48I, Syn-A44D/D49P/A62L y Pho-P49G/G50P.

En cada gel se cargaron 10 y 15 µg de plastocianina con una R menor a 2,5 para las Pc de *Synechocystis* y 3,0 para Pho-P49G/G50P. Los geles se tiñieron con azul de Comassie, según lo descrito en material y métodos.

Todos los mutantes presentan espectros de absorción en el UV/Vis idénticos al de la forma silvestre. En la figura 24 se muestra la superposición de los espectros de absorción medidos entre 200 y 750 nm de los mutantes Syn-V48I, Syn-G60A, Syn-V48I/G60A y Syn-A44D/D49P/A62L, así como de Syn-Pc, en sus formas oxidadas. Las muestras exhiben razones de pureza (R) entre 2,5 y 2,8, lo que se refleja

en la diferencia en el pico a 278 nm. Los máximos a 278 y 597 nm son debidos a la absorción de los residuos aromáticos de la proteína, mayoritariamente del triptófano en posición 31, y del centro de cobre, respectivamente. El pico que aparece a 421 nm corresponde a restos de ferricianuro potásico usado para oxidar las muestras.

En la figura 25 se muestran las imágenes de los geles de electroforesis en acrilamida y condiciones desnaturalizantes de las muestras de Syn-A44D/D49P/A62L, Syn-V48I y Pho-P49G/G50P que se utilizaron para la obtención de cristales. Como se demuestra en la figura, las proteínas se purificaron a homogeneidad electroforética.

4.3.2. Análisis funcional.

4.3.2.1. Determinación de la estructura secundaria mediante dicroísmo circular.

En la figura 26A se muestra la superposición de los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de Syn-Pc y de todos sus mutantes diseñados y estudiados en este trabajo.

Todas las proteínas recombinantes estaban perfectamente plegadas. Al superponer los espectros se observan ligeras diferencias, lo que indica alguna, muy leve, perturbación de la estructura secundaria. Esta apreciación se corrobora con los porcentajes en estructura secundaria obtenidos con el programa CDpro (figura 26B). Todos los mutantes, así como la forma silvestre, y tal como sucede con el resto de plastocianinas [Redinbo, *et al.* 1994], son proteínas fundamentalmente β , con un contenido mínimo en hélice α .

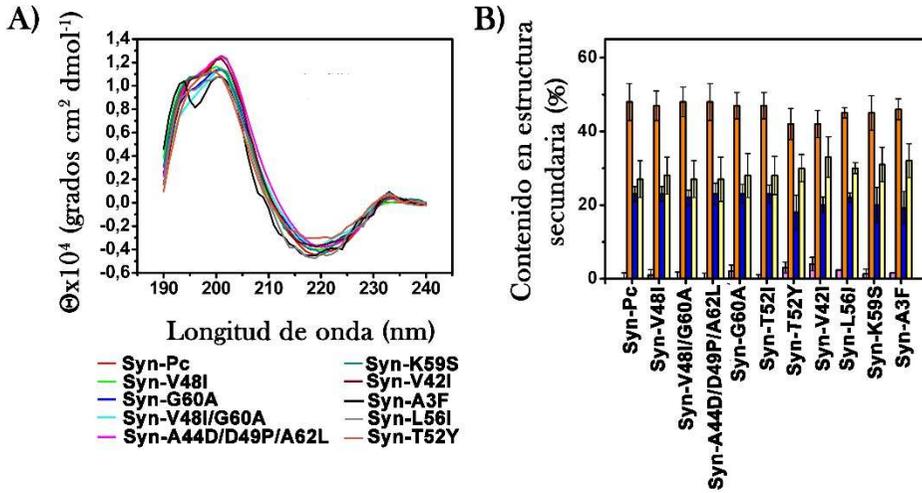


Figura 26. Espectros de CD en el UV-lejano (A) y contenido en estructura secundaria (B) de Syn-Pc y de los mutantes ensayados en este trabajo.

Todas las muestras contenían 3 μM de proteína oxidada en tampón fosfato 10 mM pH 7,0. Las medidas fueron realizadas a 25 $^{\circ}\text{C}$, usando una cubeta de cuarzo con un paso de luz de 0,1 cm. Cada uno de los espectros es el resultado de promediar 20 espectros sencillos. El contenido en estructura secundaria se calculó usando el programa CDpro tal y como se detalla en materiales y métodos.

4.3.2.2. Medidas potenciométricas.

En la figura 27 se representan las curvas de valoraciones redox de Syn-Pc y de todos sus mutantes, a excepción de T52Y y T52I, cuyos valores de T_m no mostraron diferencias significativas con la del silvestre según la técnica de DSF (véase el apartado 4.4.1). También se muestran, como controles, las valoraciones redox de Pho-Pc y su doble mutante, Pho-P49G/G50P.

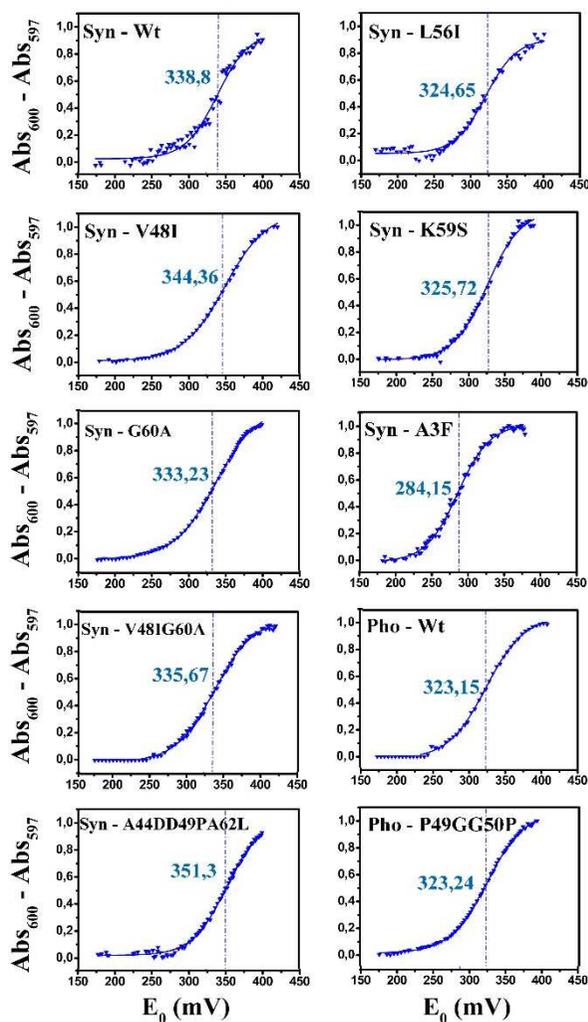


Figura 27. Valoraciones redox de Syn-Pc y de aquéllos de sus mutantes en los que se observó un cambio considerable en la T_m de la forma oxidada según la técnica de DSF.

Como controles se muestran también las curvas obtenidas para Pho-Pc y Pho-P49G/G50P. Los datos experimentales se muestran con símbolos (triángulos invertidos) y el ajuste a la ecuación de Nernst mediante línea continua. Para las medidas se siguió el protocolo descrito por Ortega *et al.* (1988). Las muestras contenían 10 μM de Pc en tampón fosfato 50 mM, pH 7,0, ascorbato sódico 1 mM y 40 μM de cada uno de los mediadores diaminoduro ($E_{m,7} = +240$ mV), 1,4-*p*-benzoquinona ($E_{m,7} = +293$ mV) y menadiona ($E_{m,7} = +422$ mV), en un volumen final de 3 mL.

Los potenciales redox estándar aparente a pH 7,0 de las proteínas mutadas de Syn-Pc no se afectan en gran medida por los cambios introducidos, a excepción de Syn-A3F. Este mutante mostró un potencial casi 55 mV más reductor. Para Syn-Pc, Syn-A44D/D49P/A62L, Pho-Pc y Pho-P49G/G50P los potenciales redox obtenidos se ajustan a los descritos en la bibliografía [Hervás *et al.*, 1993; Romero *et al.*, 1998; Balme *et al.*, 2001; Muñoz-López^a *et al.*, 2010], siendo respectivamente 338,8, 351,3, 323,15 y 323,24 mV. Entre el resto de modificaciones, Syn-L56I y Syn-K59S experimentan una leve caída de su potencial redox, hasta aproximadamente los 325 mV, acercándose a los de Pho-Pc y su doble mutante. Las restantes proteínas mostraron un potencial ligeramente más negativo (Syn-G60A, 333,23 mV; Syn-V48I-G60A, 335,67 mV) o positivo (Syn-V48I, 344,36 mV) que el de la forma silvestre.

Estas variaciones del potencial redox con las diversas mutaciones introducidas pueden ser indicativas de una alteración del centro de cobre [Li *et al.*, 2004; Si y Li, 2009].

4.3.2.3. Espectrofotometría cinética inducida por láser.

Las mutaciones Syn-V48I, Syn-G60A, Syn-V48I/G60A y Pho-P49G/G50P se encuentran localizadas todas ellas en la cara este de la proteína, región implicada en las interacciones electrostáticas que intervienen en la formación de los complejos de las Pcs con sus dianas fisiológicas [Díaz-Moreno *et al.*, 2005]. A pesar de que los cambios a estudiar no supusieron modificaciones de carga, se quiso comprobar si afectaban a la funcionalidad de la proteína. Para ello, se monitorizó el decaimiento monofásico de la absorbancia a 820 nm del P700⁺ del PSI al ser reducido por la Pc (no mostrado). La constante de pseudo-primer orden k_{obs} para la reducción del PSI depende linealmente de la concentración de proteína (figura 28).

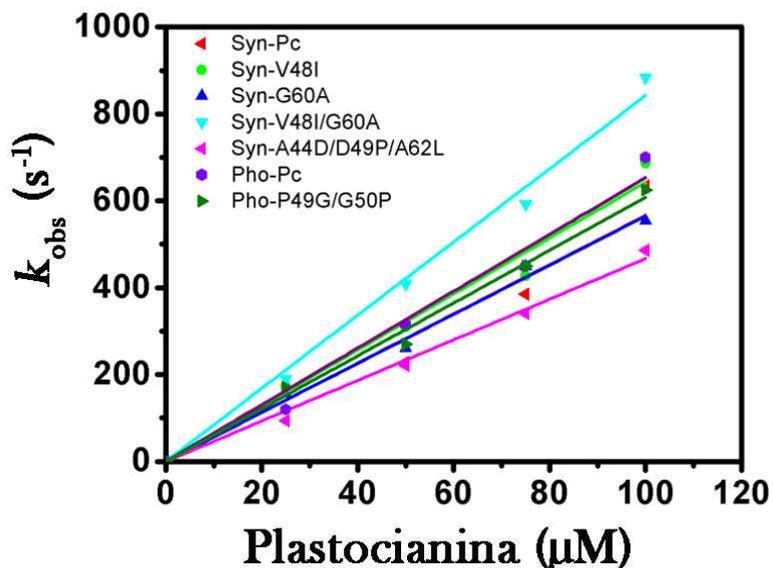


Figura 28. Dependencia de la constante observada (k_{obs}) respecto a la concentración de Pc para la reducción del PSI.

Tabla 6. Constantes bimoleculares de la reacción de reducción del PSI por las distintas Pcs en condiciones estándar (k_2).

Proteína	$k_2 \times 10^{-6} (M^{-1}s^{-1})$
Syn-Pc	5,7
Syn-V48I	6,4
Syn-G60A	5,7
Syn-V48I/G60A	8,4
Syn-A44D/D49P/A62L	4,7
Pho-Pc	6,5
Pho-P49G/G50P	6,1

En la tabla 6 se muestran las constantes de segundo orden (k_2) extraídas a partir de las rectas de regresión de la figura 28. Todos los mutantes de Syn-Pc presentan valores de k_2 muy similares al del silvestre, a excepción del doble mutante V48I/G60A, cuya constante bimolecular tiene un valor 1,5 veces superior al de Syn-Pc. La doble mutación P49G/G50P no afecta en ninguna medida a la interacción de la Pc de *P. laminosum* con el PSI.

La reacción entre el PSI y las plastocianinas de *Synechocystis* y de *Phormidium*, silvestres y mutantes, se ajusta a un mecanismo de reacción limitada por colisión orientada o cinética tipo I [Hervás *et al.*, 1994; Hervás *et al.*, 1995; Schlarb-Ridley *et al.*, 2002].

4.3.2.4. Determinación de la estructura del centro de cobre mediante dicroísmo circular.

Las variaciones en el espectro de CD en la región del visible se correlacionan con diferencias en la estructura electrónica del centro de cobre [Solomon *et al.*, 1976; Solomon *et al.*, 1980; Gewirth y Solomon, 1988; LaCroix *et al.*, 1996]. En la figura 29 se muestra el espectro de Syn-Pc, donde se señalan las transiciones relacionadas tanto con las transferencias de carga que se dan entre el átomo de cobre y sus cuatro ligandos ($\lambda < 600$ nm), como con las transiciones d-d del átomo de cobre ($\lambda > 600$ nm).

En las figuras 30 y 31 se muestran los espectros en el visible de los mutantes de Syn-Pc que mostraron una T_m superior e inferior, respectivamente, al silvestre, según DSF (véase el apartado 4.4.1). En cada una de las gráficas se superponen los espectros de uno de los mutantes con los de Pho-Pc y Syn-Pc. Tal como se observa en la imagen, los espectros son, en general, similares, mostrando el perfil típico para

los centros de cobre tipo-1 [Solomon *et al.*, 1976; Solomon *et al.*, 1980; Gewirth y Solomon, 1988; LaCroix *et al.*, 1996].

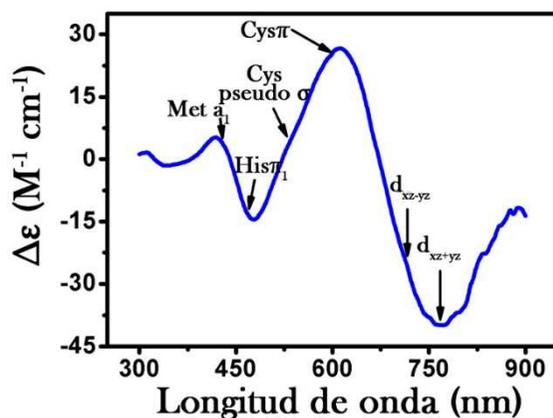


Figura 29. Espectro de CD en la región del visible de Syn-Pc.

Las flechas señalan los picos de transferencias de carga entre el cobre y sus ligandos y las transiciones d-d del propio metal [LaCroix *et al.*, 1996].

Syn-V48I y Syn-G60A (figura 30) son, entre los mutantes ensayados, los que menos se alejan de Syn-Pc en cuanto al espectro de CD visible se refiere. De hecho, sólo difieren ligeramente en las regiones correspondientes a las transiciones de carga de S(Cys83) π y de Cu $3d_{xz+y_2}$. De entre ellos dos, es Syn-G60A el que menos difiere del silvestre.

En el lado totalmente opuesto, el espectro de Syn-A44D/D49P/A62L es el que más variaciones muestra con el de Syn-Pc, y más se asemeja al de Pho-Pc (figura 30). De hecho, se superpone a este último en las regiones correspondientes a las transiciones electrónicas S(Cys83) pseudo σ y S(Cys83) π , así como en las His39/His91 π_1 y Cu $3d_{xz+y_2}$. Sin embargo, difiere tanto del espectro de Syn-Pc y Pho-Pc en las las transiciones M91 a_1 y Cu $3d_{xz-y_2}$.

El espectro de Syn-V48I/G60A (figura 30) coincide con el de Pho-Pc en la región de S(Cys83) π . La doble mutación también induce modificaciones en las bandas correspondientes a Cu $3d_{xz-yz}$ y de Cu $3d_{xz+yz}$.

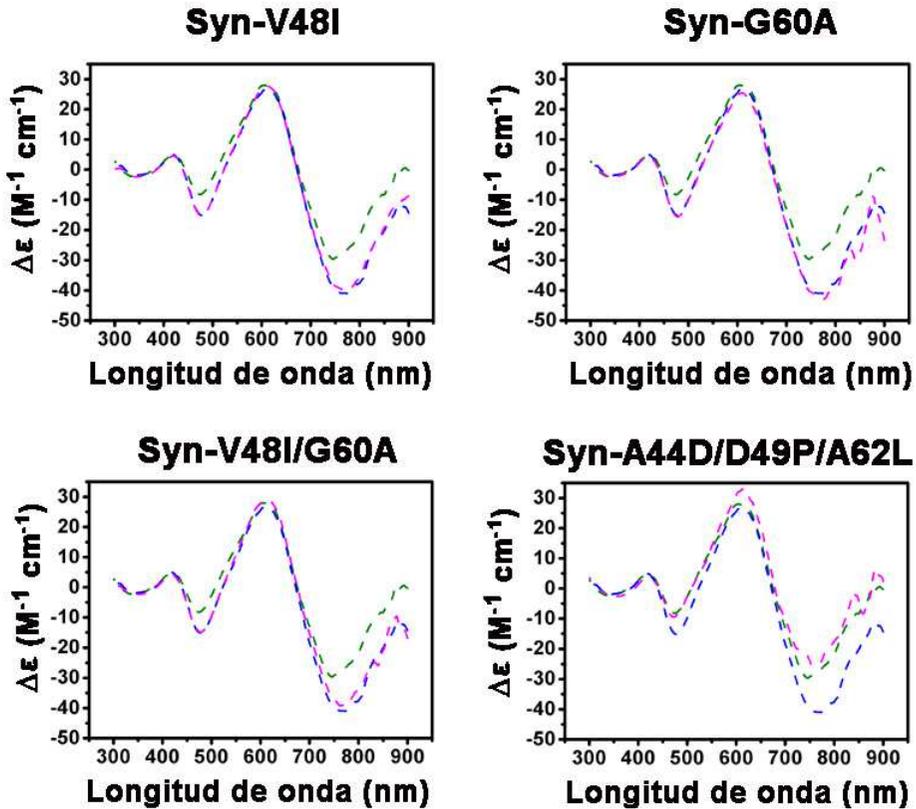


Figura 30. Espectros de CD en el visible de los mutantes estabilizantes de Syn-Pc.

Superposición de los espectros de CD en el visible de Syn-Pc (azul) y Pho-Pc (verde) y de cada uno de los mutantes (magenta) que mostraron una T_m superior que la forma silvestre en sus formas oxidada obtenidas mediante DSF. Las medidas fueron realizadas con 250 μM de proteína oxidada en 10 mM de tampón fosfato pH 7,0. El espectro final fue el resultado de promediar 30 espectros sencillos obtenidos a una velocidad de barrido de 200 nm min^{-1} .

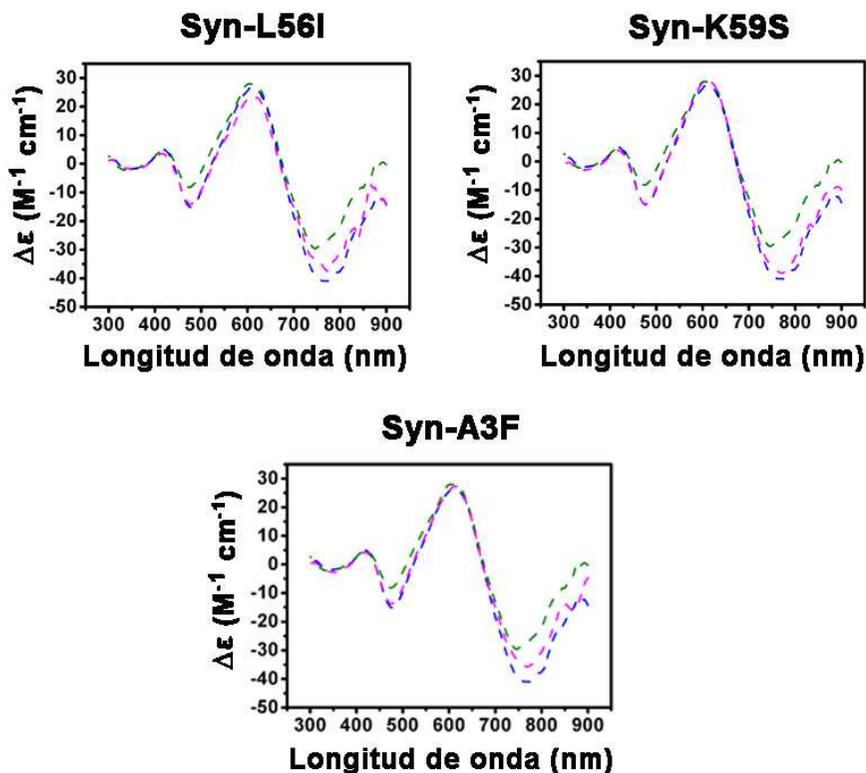


Figura 31. Espectros de CD en el visible de los mutantes desestabilizantes de Syn-Pc.

Superposición de los espectros de CD en el visible de Syn-Pc (azul) y Pho-Pc (verde) y de cada uno de los mutantes (magenta) que mostraron una T_m menor que la forma silvestre en sus formas oxidada obtenidas mediante DSF. Las medidas fueron realizadas con 250 μM de proteína oxidada en 10 mM de tampón fosfato pH 7,0. El espectro final fue el resultado de promediar 30 espectros sencillos obtenidos a una velocidad de barrido de 200 nm min^{-1} .

Los espectros de CD visible de Syn-L56I, Syn-K59S y Syn-A3F (Figura 31) difieren con los de Syn-Pc en la región de $\text{Cu } 3d_{xz+yz}$. En el de Syn-A3F se observan diferencias también en $3d_{xz-yz}$ y, en menor medida en $\text{S}(\text{Cys83})\pi$. Además de lo ya mencionado, el espectro de Syn-L56I se aleja del de la Pc silvestre en las zonas de $3d_{xz-yz}$, $\text{S}(\text{Cys83})\pi$ y Met91a_1 .

En Syn-K59S, la región correspondiente a la transición electrónica de S(Cys83) π coincide con la del espectro de Pho-Pc.

4.4. Medidas de estabilidad térmica.

Como se mencionó en la introducción, se considera necesario que el proceso de desplegamiento proteico sea reversible para poder obtener los parámetros termodinámicos. Sin embargo, se puede asumir que el paso irreversible es mucho más lento que el proceso reversible inicial y que tiene lugar principalmente a una temperatura superior a la T_m , siendo posible entonces obtener los parámetros termodinámicos del paso reversible [Sanchez-Ruiz, 1992; Milardi *et al.*, 1994].

En todo caso, en este estudio estamos interesados en las estabildades relativas entre los diferentes mutantes más que en los valores termodinámicos reales.

4.4.1. Fluorimetría Diferencial de barrido (DSF; differential scanning fluorymetry).

La figura 32 muestra la diferencia entre las T_m entre cada uno de los mutantes y el silvestre de Syn-Pc en sus estados oxidados. Como control se muestran también dichas diferencias para Pho-Pc.

Aunque también se usó esta técnica para el análisis del desplegamiento de las formas reducidas y de las apo-Pc, las curvas obtenidas mostraban demasiado ruido como para ser analizadas de una forma fiable. La única explicación a la que somos capaces de llegar es la de una posible interferencia por parte de restos de ascorbato en el caso de las Pc reducidas o de cianuro potásico en el de las apo-Pc, a pesar de que las muestras fueron filtradas a través de una columna PD10 tras el

tratamiento. En Material Suplementario se pueden ver ejemplos de curvas de DSF para Pc reducidas y apo-Pc.

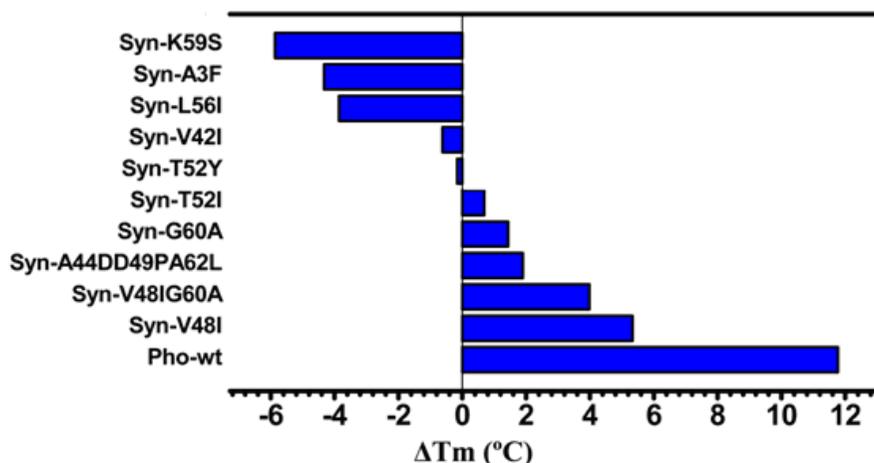


Figura 32. Diferencias en la T_m de las formas oxidadas entre los mutantes de Syn-Pc ensayados en este trabajo y la forma silvestre.

Los ensayos se realizaron mezclando 2,5 o 5 μg de plastocianina oxidada en tampón fosfato 10 mM pH 7,0 con una dilución de Sypro Orange (Invitrogen) 5X, en un volumen total de 25 μl [Niesen *et al.* 2007].

Aquellos mutantes cuyas formas oxidadas mostraban un incremento en la T_m superior a 1 °C respecto al silvestre se analizaron posteriormente mediante espectroscopía de fluorescencia y de dicroísmo circular para determinar con mayor precisión sus valores de T_m para sus formas oxidadas, reducidas y apo-Pc (veasé apartados 4.4.2 y 4.4.3 de Resultados).

Las formas silvestres de Syn-Pc y Pho-Pc se comportaron según lo previamente descrito en la bibliografía [Feio *et al.*, 2006; Muñoz-López^a *et al.*, 2010]. Los mutantes Syn-V48I, Syn-A44D/D49P/A65L y Syn-G60A resultaron más estables que la forma silvestre de Syn-Pc en todo el intervalo de pH (figura 33). El triple mutante Syn-A44D/D49P/A65L mostró

un comportamiento intermedio entre ambas formas silvestres, mientras que Syn-V48I se asemeja más a Pho-Pc. De la misma forma, los mutantes K59S y L56I presentan valores de T_m inferiores que los del silvestre en todo el rango de pH.

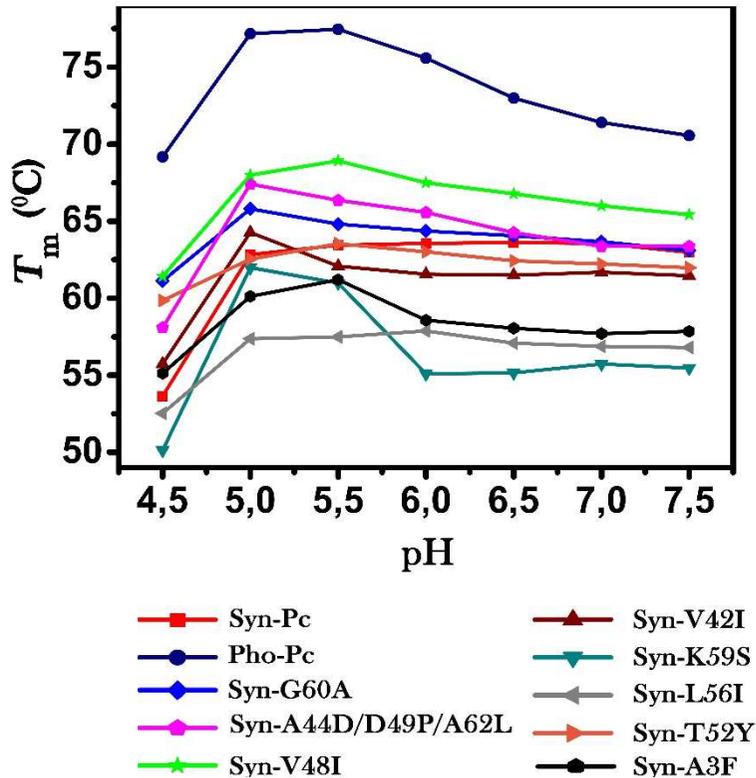


Figura 33. Dependencia de los valores de T_m respecto al pH de las formas oxidadas.

Los experimentos fueron llevados a cabo en tampón citrato 10 mM, tal como se describe en la bibliografía (Feio, *et al.*; 2006). En la parte inferior de la figura se muestra el código de colores.

En los mutantes Syn-A3F, Syn-V42I y Syn-T52Y se observan valores de T_m inferiores al silvestre cuando el pH es superior a 5, pero,

para valores iguales o inferiores a dicho pH, estos mutantes resultan más estables que la forma silvestre. Es interesante señalar que, aún cuando no se observe aumento en la T_m en los mutantes Syn-K59S y Syn-A3F, sí parece haber un comportamiento diferente respecto al pH. En el ejemplo de Syn-K59S el cambio tan brusco observado podría explicarse por la vecindad del residuo mutado con la His58, dada la aparición de un pKa alrededor de 6 en el mutante.

4.4.2. Espectroscopía de fluorescencia.

En las figuras 35 y 36 se han representado las curvas de desplegamiento normalizadas obtenidas por espectroscopía de fluorescencia de las formas oxidadas y reducidas de Syn-Pc y de aquéllos de sus mutantes que resultaron más estables que el silvestre según la técnica de DSF. Se indican los valores de T_m obtenidos a partir del ajuste para cada forma redox, así como la diferencia entre los dos valores de T_m . Resulta evidente en todos los casos la aproximación de ambas curvas. Mientras que en Syn-V48I, Syn-V48I/G60A y Syn-A44D/D49P/A62L este resultado es debido principalmente a un incremento de la estabilidad de la forma oxidada, en Syn-G60A se debe a la desestabilización de la reducida, sin verse prácticamente afectada la proteína oxidada. Ya en Pho-Pc se observó una mayor afectación de la estabilidad de la forma oxidada que de la reducida cuando se realizaban mutaciones puntuales, pero en ningún caso se observó el efecto contrario [Muñoz-López^a *et al.*, 2010].

Por tanto, al compararlos con la forma silvestre, las mutaciones múltiples estabilizan el barril en ambas formas redox, mientras que en Syn-V48I sólo se estabiliza en la forma oxidada, sin alterarse en la reducida. Sin embargo, en Syn-G60A el barril de la Pc reducida se desestabiliza, mientras que la forma oxidada no se afecta.

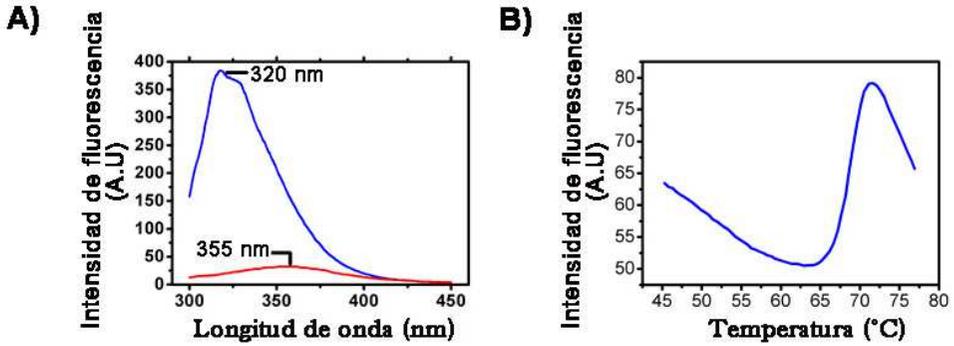


Figura 34. Ejemplos del espectro de emisión de fluorescencia y de la curva de desnaturalización de Syn-Pc mediante espectroscopía de fluorescencia.

A) Espectro de emisión de fluorescencia del mutante Syn-V48I en su estado nativo (azul) y desplegado (rojo). Las muestras fueron excitadas a 275 nm. **B)** Curva de desnaturalización del mutante Syn-V48I oxidado. Las muestras fueron excitadas a 275 nm y el desplegamiento se monitorizó siguiendo el incremento de fluorescencia a 355 nm, tal como se explica en materiales y métodos.

De entre todos los mutantes, destaca, por una parte, Syn-V48I. Este cambio supone una enorme capacidad estabilizadora. De hecho, no sólo consigue casi salvar la diferencia en T_m entre las formas oxidadas y reducidas de Syn-Pc, sino que además revierte el efecto desestabilizador de la mutación Syn-G60A sobre el barril de la proteína reducida. De hecho, Syn-V48I/G60A muestra un valor de T_m en su forma reducida superior al del propio Syn-V48I, y una T_m de la proteína oxidada intermedia entre las de Syn-Pc o Syn-G60A y la de Syn-V48I. Por tanto, se necesita del efecto sinérgico de ambas mutaciones para dar lugar a una Pc de *Synechocystis* cuyo barril sea más estable que el del silvestre independientemente del estado redox.

Por otra parte, el triple mutante Syn-A44D/D49P/A62L no sólo experimenta una estabilización de ambas formas redox, sino que, aún continuando siendo la forma reducida la de mayor T_m , la proteína oxidada parece alcanzar a una mayor temperatura el estado 100% desplegado.

Esto se debe a la desestabilización tan gradual que sufre la forma oxidada de este mutante, de forma que precisa de un incremento en la temperatura de unos 30 °C para alcanzar el estado totalmente desplegado.

4.4.3. Dicroísmo circular

Como ya se adelantó en el apartado 4.3.2.1, los cambios en el espectro de CD al incrementar la temperatura se puede usar para determinar los efectos de una determinada mutación sobre la estabilidad proteica. Por ello, se miden los cambios en la elipticidad a 219 nm para el seguimiento de la desnaturalización térmica en proteínas con un alto contenido en hebras β [Greenfield; 2006].

En las figuras 35 y 36 se han representado las curvas de desplegamiento ajustadas obtenidas por CD de las formas oxidadas (verde), reducidas (azul) y apo-Pc (magenta) de Syn-Pc y de aquéllos mutantes que resultaron estabilizantes en los ensayos de DSF. Para poder comparar con Pho-Pc y su doble mutante Pho-P49G/G50P, se obtuvieron también sus curvas de desplegamiento por CD (figura 37), no realizado con anterioridad a este trabajo. Las tablas 7 y 8 muestran los valores de T_m obtenidos, respectivamente, para las formas oxidada y reducida, y para las apo-Pc.

Al igual que se observaba en los ensayos de espectroscopía de fluorescencia, existe una disminución en la diferencia de T_m entre formas oxidadas y reducidas de Syn-Pc y sus mutantes. Sin embargo, esta diferencia es prácticamente igual para todos los mutantes (en torno a 6,5 °C) cuando la estabilidad se monitoriza mediante CD. Nuevamente es la forma oxidada la que experimenta una mayor estabilización. Sin embargo, en las formas reducidas se observa una mayor variabilidad,

llegando incluso a ser levemente desestabilizante en el caso de Syn-G60A.

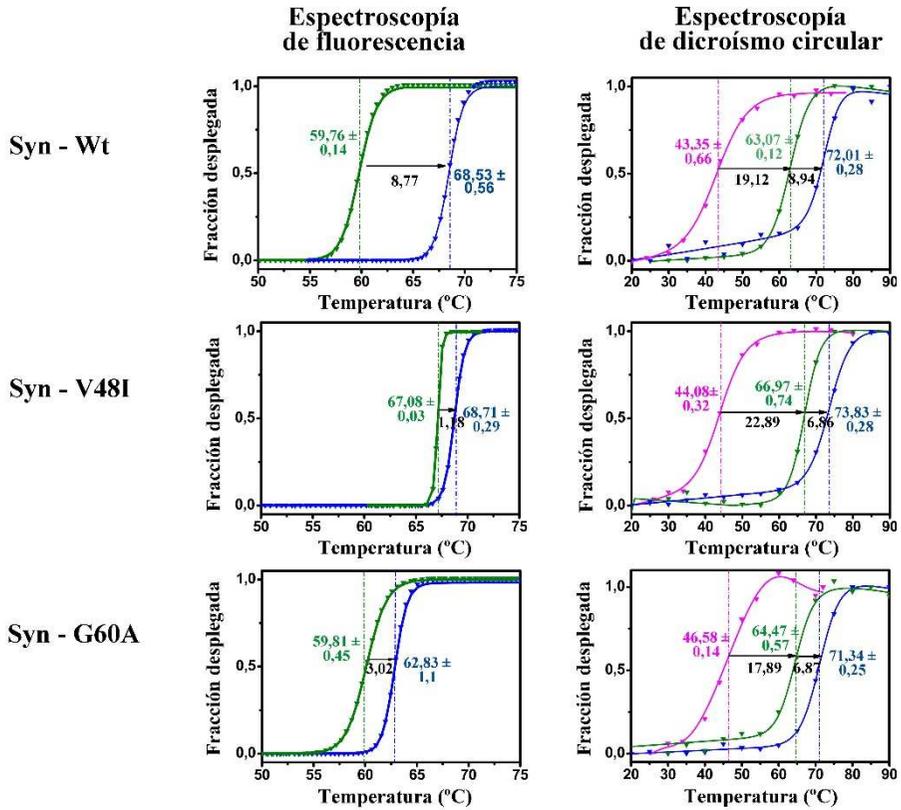


Figura 35. Curvas de desplegamiento normalizadas y ajustadas obtenidas por espectroscopía de fluorescencia y CD de las formas oxidadas y reducidas de Syn-Pc y de aquéllos mutantes simples que resultaron estabilizantes.

A la izquierda se muestran las curvas de desplegamiento obtenidas mediante espectroscopía de fluorescencia, y, a la derecha, por CD. Las curvas correspondientes a las formas oxidadas se muestran en verde, las reducidas, en azul y las apo-Pc, en magenta. Acompañando a cada una de ellas y del mismo color se muestran los valores de T_m obtenidos del ajuste. En negro se indican las diferencias entre los valores de T_m . Los ensayos fueron realizados a pH 7 tal como se explica en materiales y métodos.

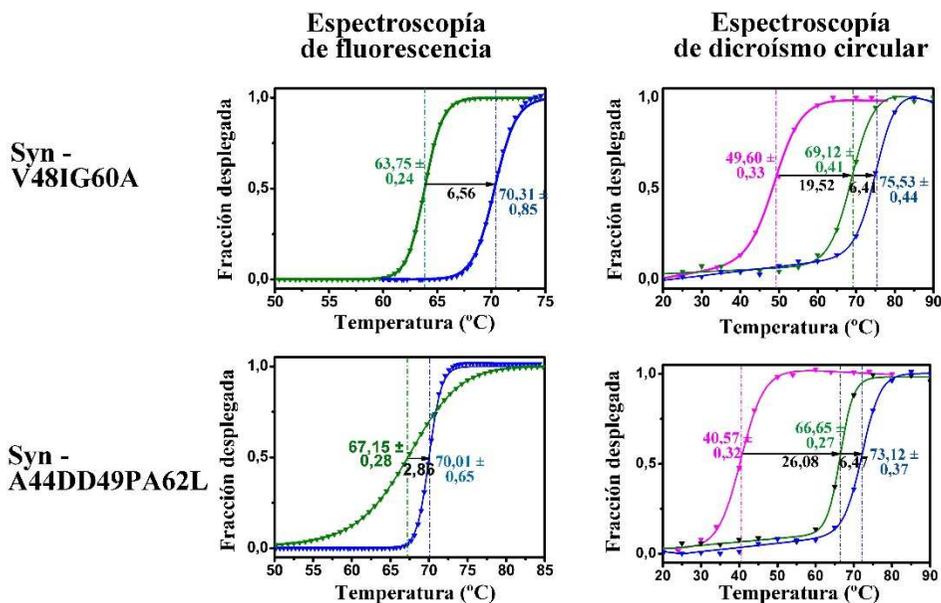


Figura 36. Curvas de desplegamiento normalizadas y ajustadas obtenidas por espectroscopía de fluorescencia y CD de las formas oxidadas y reducidas de los mutantes múltiples de Syn-Pc.

A la izquierda se muestran las curvas de desplegamiento obtenidas mediante espectroscopía de fluorescencia, y, a la derecha, por CD. Las curvas correspondientes a las formas oxidadas se muestran en verde, las reducidas, en azul y las apo-Pc, en magenta. Acompañando a cada una de ellas y del mismo color se muestran los valores de T_m obtenidos del ajuste. En negro se indican las diferencias entre los valores de T_m . Los ensayos fueron realizados a pH 7 tal como se explica en materiales y métodos.

De forma análoga a lo observado mediante la técnica de espectroscopía de fluorescencia, mediante CD se observa también como la mutación V48I revierte el efecto desestabilizador de la G60A sobre la proteína reducida. El doble mutante Syn-V48I/G60A resulta, de hecho, más estable para ambas formas redox que la propia Syn-V48I.

Los valores de T_m obtenidos por CD para Pho-Pc (figura 37A) son muy cercanos a los determinados por espectroscopía de

fluorescencia en las mismas condiciones en estudios previos. Sin embargo, las T_m obtenidas para Pho-P49G/G50P (figura 37B) en el presente trabajo son ligeramente inferiores (3°C para ambas formas redox) que las obtenidas mediante fluorescencia [Muñoz-López^a *et al.*, 2010]. Esta variación puede deberse a diferencias en el pH usado en los dos trabajos.

Tabla 7. Valores de T_m de las formas oxidada y reducida de Syn-Pc y sus mutantes, así como de Pho-Pc y su mutante Pho-P49G/G50P.

Los valores de T_m mostrados se obtuvieron a partir del análisis de las curvas resultantes de los ensayos de desnaturalización térmica realizados mediante espectroscopía de fluorescencia y de CD (figuras 35 a 37).

Proteína	Espectroscopía de fluorescencia		Espectroscopía de CD	
	Oxidada	Reducida	Oxidada	Reducida
Syn-Pc	59,76 ± 0,14	68,53 ± 0,56	63,07 ± 0,12	72,01 ± 0,28
Syn-V48I	67,08 ± 0,03	68,71 ± 0,29	66,97 ± 0,74	73,83 ± 0,28
Syn-G60A	59,81 ± 0,45	62,83 ± 1,10	64,47 ± 0,57	71,34 ± 0,25
Syn-V48I/G60A	63,75 ± 0,24	70,31 ± 0,85	69,12 ± 0,41	75,53 ± 0,44
Syn- A44D/D49P/A62L	67,15 ± 0,28	70,01 ± 0,65	66,65 ± 0,27	73,12 ± 0,37
Pho-Pc	81,80 ± 0,40	75,70 ± 1,00	76,56 ± 0,52	73,88 ± 0,48
Pho-P49G/G50P	69,10 ± 1,00	72,30 ± 1,10	65,21 ± 0,40	69,41 ± 0,98

^aLos valores de T_m para Pho-Pc y Pho-P49G/G50P obtenidos por espectroscopía de fluorescencia no se realizaron en este trabajo. Los valores mostrados han sido tomados de la bibliografía [Muñoz-López *et al.*, 2010; Chaboy *et al.*, 2011].

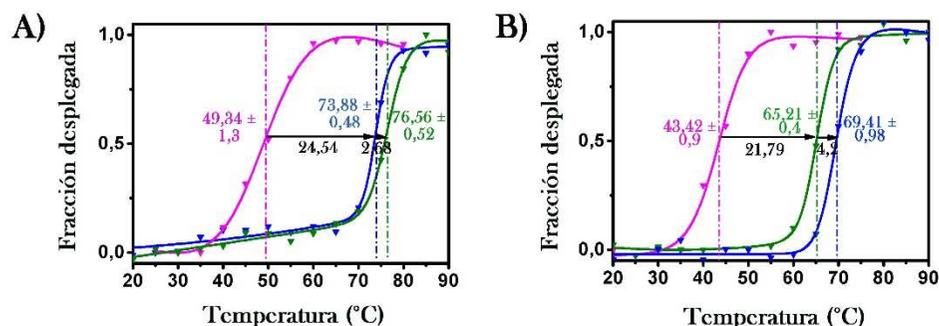


Figura 37. Curvas de desplegamiento normalizadas y ajustadas obtenidas por CD de las formas oxidadas y reducidas de Pho-Pc y de Pho-P49G/G50P.

Curvas de desplegamiento normalizadas CD de las formas oxidadas (verde), reducidas (azul) y apo-Pc (magenta) de Pho-Pc **(A)** y Pho-P49G/G50P **(B)**. Acompañando a cada una de ellas y del mismo color se muestran los valores de T_m obtenidos del ajuste. En negro se indican las diferencias entre los valores de T_m . Los ensayos fueron realizados a pH 7 tal como se explica en materiales y métodos.

4.4.4. Diferencias entre los resultados de espectroscopía de fluorescencia y CD.

Como ya se ha mencionado, mediante espectroscopía de fluorescencia se monitoriza la exposición del triptófano 31, situado en el núcleo hidrofóbico del barril de la Pc, a un ambiente acuoso [Royer, 2006]. Sin embargo, mediante dicroísmo circular en el UV a 219 nm se sigue el cambio en contenido en hebra β de la proteína al incrementar la temperatura [Greenfield, 2006], que no sólo afecta al barril, sino también a las hebras β_5 y β_6 , en la cara este de la Pc.

La existencia de un intermediario en la ruta de desplegamiento se puede detectar cuando las curvas obtenidas mediante diferentes técnicas espectroscópicas no pueden superponerse. Este es el caso de las proteínas estudiadas en este trabajo. En ningún caso, ya se consideren indistintamente las formas oxidadas o reducidas, las curvas

obtenidas por CD se pueden superponer a las resultantes de la espectroscopía de fluorescencia. Esto indica, por tanto, una ruta de desnaturalización de, al menos, tres estados [Sancho, 2013], para Syn-Pc y sus mutantes estudiados en este trabajo. Este hecho difiere de lo propuesto en trabajos anteriores [Feio *et al.*, 2004; Feio *et al.*, 2006; Muñoz-López^a *et al.*, 2010].

Los valores de T_m , así como la temperatura a la que se alcanza el 100% de proteína desplegada, obtenidos por CD son, en la mayoría de los casos, superiores a los obtenidos por fluorescencia. Este comportamiento hace pensar que la proteína sufre en primer lugar una expansión de la matriz proteica, permitiendo la entrada de moléculas de agua en el interior del barril y la modificación del entorno del triptófano, mientras que la pérdida de estructura secundaria se produce de una forma más gradual.

La excepción a lo anteriormente descrito lo plantean Syn-V48I y Syn-A44D7D49P/A62L en sus formas oxidadas. En estos dos casos, tanto por CD como por espectroscopía de fluorescencia se obtienen valores de T_m prácticamente idénticos (en torno a 67 °C para ambos). Sin embargo, las curvas obtenidas por ambas técnicas distan de ser superponibles (figura 38). Esto indica que, aunque sus valores de T_m sean similares, el grado de cooperatividad y la entalpía del proceso de desplegamiento son diferentes.

En el caso de Syn-V48I la rampa de desplegamiento obtenida por espectroscopía de fluorescencia es muy abrupta, de forma que entre la proteína totalmente plegada y la totalmente desplegada hay sólo 2 °C de diferencia (de 66 a 68 °C). Este hecho es indicativo de la existencia de un alto grado de cooperatividad en el desplegamiento de las distintas regiones del barril proteico. Sin embargo, mediante el seguimiento por CD de la pérdida de hebra β , la situación de proteína totalmente desplegada no se alcanza hasta aproximadamente los 75 °C.

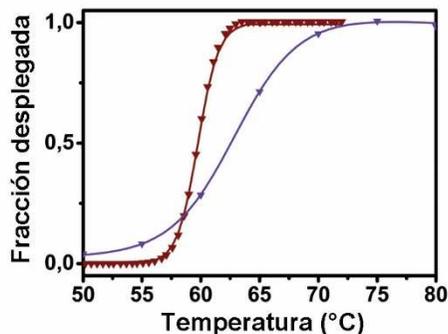
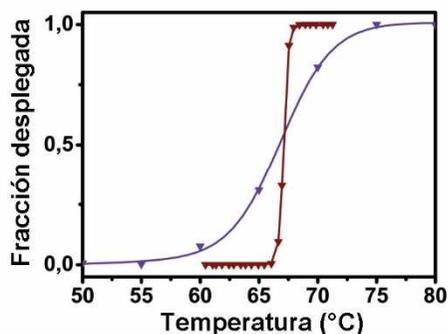
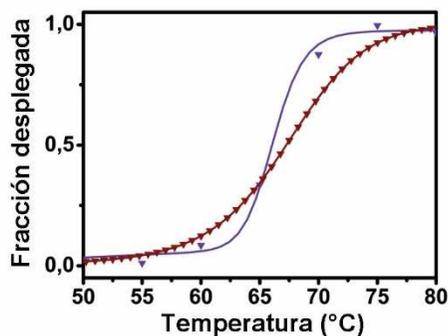
Syn-Pc**Syn-V48I****Syn-A44D/D49P/A62L**

Figura 38. Curvas de desdoblamiento normalizadas y ajustadas obtenidas por espectroscopía de fluorescencia y CD de las formas oxidadas de Syn-Pc, Syn-V48I y Syn-A44D/D49P/A62L.

Las curvas obtenidas por espectroscopía de fluorescencia y CD se muestran en marrón y violeta, respectivamente.

Syn-A44D/D49P/A62L, sin embargo, muestra para su forma oxidada una rampa de desdoblamiento por espectroscopía de fluorescencia muy suave, necesitando que la temperatura aumente en 30

°C (de aproximadamente 50 a 80 °C) para pasar de totalmente plegada a desplegada. En este caso estamos ante un ejemplo de baja cooperatividad en el desplegamiento proteico. Mediante CD el estado desplegado se alcanza a una temperatura inferior (alrededor de los 74 °C).

Por tanto, en base a estos resultados se puede sugerir que a 68 °C, el entorno del Trp31 en Syn-V48I se encuentra totalmente expuesto a pesar de que la proteína aún sigue manteniendo parte de su estructura secundaria. En Syn-A44D/D49P/A62L, al contrario, la proteína desplegada ha perdido gran parte de sus elementos de estructura secundaria a pesar de que mantiene cierta compactación de su núcleo proteico.

4.4.5. Análisis de la aportación de la matriz proteica y del centro metálico a la estabilidad proteica.

Para conocer hasta qué punto los incrementos en la T_m observados mediante DSF, espectroscopía de fluorescencia y CD se debían a la estabilización de la matriz proteica o al centro de cobre, se obtuvieron también las curvas de desplegamiento por espectroscopía de CD de las respectivas apo-Pc (figuras 35 a 37). En la tabla 8 se muestran los valores de T_m obtenidos.

La aportación de la matriz proteica vendrá dada por la T_m de la apo-Pc, mientras que la del centro de cobre por la diferencia de T_m entre la forma reducida u oxidada y la de la proteína sin el cobre. Las diversas mutaciones ensayadas afectarán por una parte a la matriz proteica, induciendo una estabilización o una desestabilización. Pero, a la vez, parte de los efectos en la cadena polipeptídica pueden transmitir una sutil tensión o alteración en el centro de Cu, afectando a su estabilidad. Por tanto, la estabilidad final de las holoproteínas, oxidadas o reducidas, se

debe a ambas contribuciones: estabilización/ desestabilización de la matriz proteica y estabilización/ desestabilización del centro metálico.

Tabla 8. Valores de T_m de las apo-Pc de Syn-Pc y sus mutantes, así como de Pho-Pc y su mutante Pho-P49G/G50P.

Los valores de T_m mostrados se obtuvieron a partir del análisis de las curvas resultantes de los ensayos de desnaturalización térmica realizados mediante espectroscopía de fluorescencia y de CD (Figuras 35 a 37).

Proteína	T_m
Syn-Pc	43,35 ± 0,66
Syn-V48I	44,08 ± 0,32
Syn-G60A	46,58 ± 0,14
Syn-V48I/G60A	49,60 ± 0,33
Syn-A44D/D49P/A62L	40,57 ± 0,32
Pho-Pc	49,34 ± 1,30
Pho-P49G/G50P	43,42 ± 0,90

En la figura 39 se muestran las diferencias de T_m entre cada uno de los mutantes y Syn-Pc ($\Delta T_m^{\text{Mut-WT}}$) para las formas oxidadas (verde) y reducidas (azul), y para las apo-Pc (magenta). La columna denominada “Holo-Apo” corresponde a la diferencia de T_m entre las formas holo y apo, y se corresponde a la contribución del centro de Cu.

Syn-A44D/D49P/A62L resultó en 3,58 y 1,11 °C más estable en sus formas oxidada y reducida respectivamente que la Pc silvestre. Sin embargo, su forma apo muestra una T_m de más de 2,7 °C inferior a la de Syn-Pc. Esto supone que la modificación del centro de Cu induce un cambio de 6,36 °C en la T_m de la Pc oxidada y de 3,89 °C en la de la reducida.

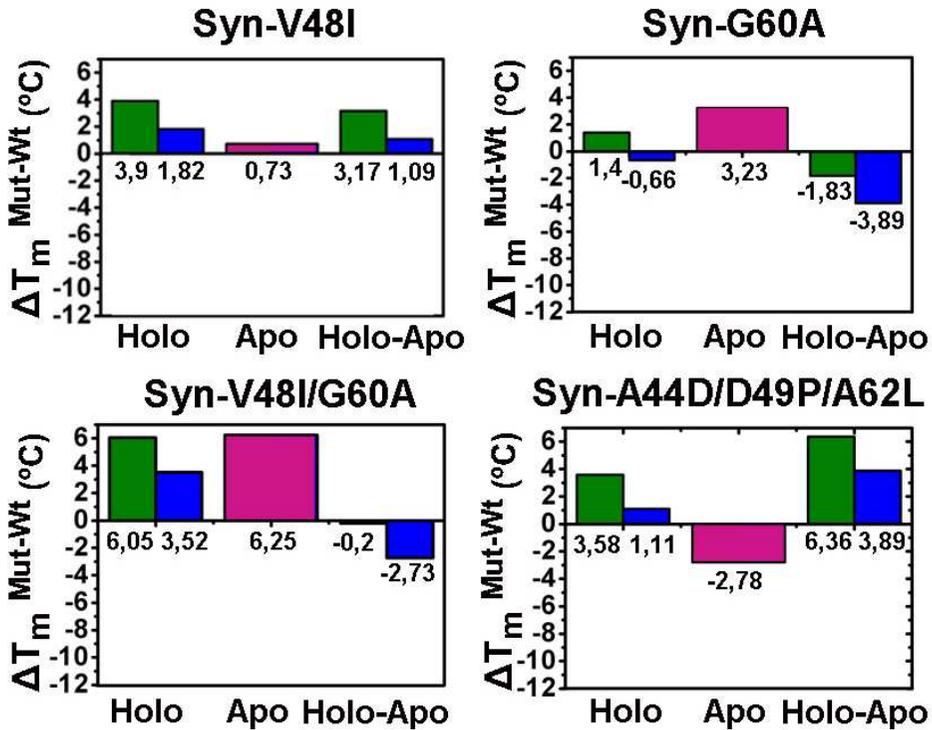


Figura 39. Aportaciones a la estabilidad de la matriz y el centro de cobre para cada uno de los mutantes de Syn-Pc respecto al silvestre.

Los valores de T_m usados para la determinación de los diferentes ΔT_m se corresponden a los obtenidos mediante CD en el UV lejano. En verde se muestra la diferencia entre los valores de T_m de las formas oxidadas de cada mutante y el silvestre; en azul, la diferencia entre los valores de T_m de las formas reducidas de cada mutante y el silvestre; en magenta, la diferencia entre los valores de T_m de las apo-Pc de cada mutante y el silvestre.

En el caso de Syn-V48I, Syn-G60A y Syn-V48I/G60A, todas las modificaciones introducidas inducen una estabilización en menor o mayor medida de la Pc sin el metal. Sin embargo, los cambios que estas mutaciones producen sobre el centro de cobre hacen que la contribución de éste sobre la estabilidad global sea diferente en cada una de ellas. Así, mientras que en Syn-V48I la estabilización debida al centro de Cu es

mayor que la debida a la matriz proteica, en Syn-G60A el centro de Cu tiene un efecto negativo. El resultado es que en Syn-V48I la proteína presenta una mayor T_m que en Syn-Pc en ambas formas redox, mientras que en Syn-G60A la forma reducida es menos estable que el silvestre. La doble mutación V48I/G60A estabiliza la matriz proteica notablemente, más que la suma del aporte de las dos mutaciones de forma individual. Esto explica el incremento de T_m de la forma oxidada, así como la recuperación en la T_m de la forma oxidada de este mutante respecto a Syn-G60A.

4.4.6. Comparación de los resultados de los experimentos de desplegamiento con otros parámetros y resultados

4.4.6.1. Relación entre el potencial redox y la temperatura de desplegamiento.

Al representar los valores de T_m de los diferentes mutantes y de Syn-Pc frente a sus respectivos valores de potencial redox (E_0) no se observa relación aparente entre dichos parámetros (figura 40). Sin embargo, cuando lo que se representa es la diferencia de T_m (ΔT_m) entre las diferentes formas (reducida, oxidada o apo) respecto a E_0 , se observa una alta correlación lineal positiva de la $\Delta T_m(\text{oxidada-apo})$, con un coeficiente de correlación R igual a 0,98, y de la $\Delta T_m(\text{reducida-apo})$, con R igual a 0,99, (figura 41; tabla 9). Por el contrario, $\Delta T_m(\text{reducida-oxidada})$ y E_0 se correlacionan débilmente y de forma negativa ($R=-0,37$).

Tal como se muestra en la tabla 9, el valor de p para la pendiente de la recta de correlación entre $\Delta T_m(\text{reducida-oxidada})$ es igual a 0,15 y E_0 es mayor a 0,05 (5% de nivel de significación), por lo que no se puede afirmar que exista una relación entre ambas variables. Sin embargo, para

los casos de $\Delta T_m(\text{oxidada-apo})$ y $\Delta T_m(\text{reducida-apo})$, los p-valores son menores en ambos que el nivel de significancia.

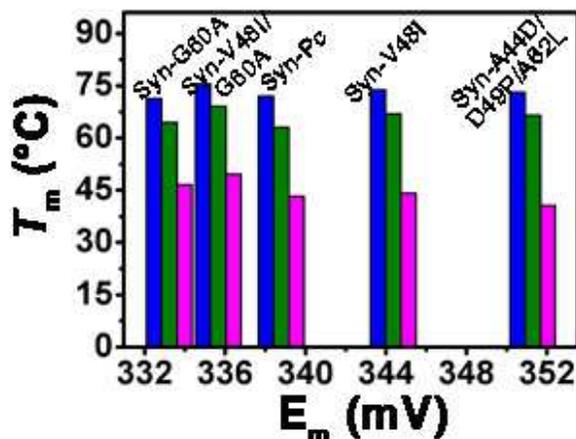


Figura 40. Tendencias en la T_m respecto a los valores de potenciales rédox
 Los valores de T_m se corresponden a los obtenidos mediante CD en el UV lejano para Syn-Pc y para aquellos de sus mutantes que mostraron una diferencia significativa en sus T_m respecto a la del silvestre. En azul se representa la Pc reducida; en verde, la Pc oxidada; y en magenta, la apo-Pc.

Por tanto, se puede afirmar que para Syn-Pc y sus mutantes con T_m superiores existe una relación proporcional entre la estabilidad del centro de cobre y su potencial redox. Esta afirmación es válida para ambas formas redox.

Estos resultados concuerdan con los datos estructurales de Chaboy *et al.*, 2011 en los que la estabilidad de la Pc se relaciona con variaciones en la configuración electrónica del centro metálico.

Tabla 9. Información estadística derivada de los ajustes lineales de los mostrados en la figura 41.

Cálculos realizados con Origin (OriginLab, Northampton, MA).

	Reducida- Apo	Oxidada- Apo	Reducida- Oxidada	
Coeficiente de determinación (R ²)	0,97	0,97	0,14	
Coeficiente de correlación lineal (R)	0,99	0,98	0,37	
Coeficiente de determinación ajustado	0,97	0,96	-0,15	
Intercepción	Valor	-116,86	-137,11	31,41
	Error estándar	15,64	15,38	16,64
	t-Student	-7,47	-8,91	1,89
	valor de p	0,003	0,003	0,150
	Nivel de significación	5%	5%	5%
Pendiente	Valor	0,4258	0,46466	-0,07003
	Error estándar	0,04589	0,04505	0,0488
	t-Student	9,28	10,31	-1,43513
	p-valor	0,00265	0,00194	0,24675
	Nivel de significación	5%	5%	5%

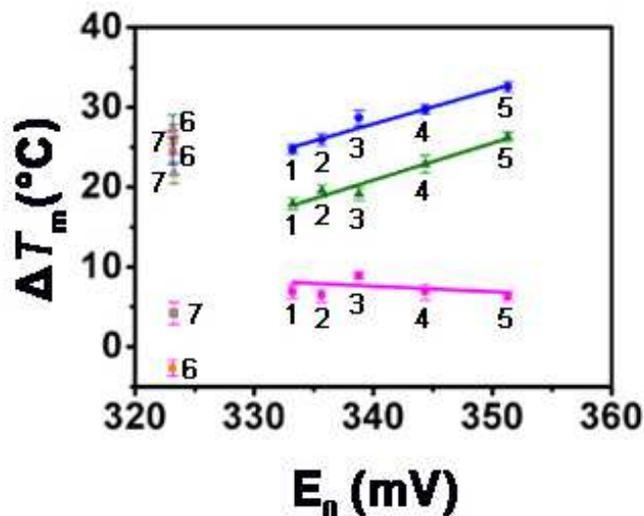


Figura 41. Tendencias de la diferencia de T_m (ΔT_m) entre las diferentes formas respecto a E_0 .

Los valores de T_m usados para la determinación de los diferentes ΔT_m se corresponden a los obtenidos mediante CD en el UV lejano. El código de colores es el siguiente: azul, ΔT_m (reducida-apo); verde, ΔT_m (oxidada-apo); magenta, ΔT_m (reducida - oxidada). Para el ajuste sólo se han tenido en cuenta Syn-Pc y sus mutantes, ya que las Pc de *P. laminosum* no se ajustan a ella. La numeración indica: 1-Syn-G60A; 2-Syn-V48I/G60A; 3-Syn-Pc; 4-Syn-V48I; 5-Syn-A44D/D49P/A62L.; 6-Pho-Pc; 7-Pho-P49G/G50P.

4.5. Simulaciones de dinámica molecular de larga duración

Una vez se obtuvieron los resultados experimentales mediante los estudios de desestabilización térmica, se computaron simulaciones de dinámica molecular de 10 ns de duración a temperatura ambiente (298K) y a alta temperatura (498K) de Syn-Pc y de aquellos de sus mutantes considerados más interesantes.

4.5.1.1. Estabilidad estructural global

En la figura 42 se muestran los RMSDs en función del tiempo para los esqueletos polipeptídicos de cada una de las conformaciones proteicas con respecto a sus correspondientes estructuras iniciales. Se monitorizó dicho parámetro para Syn-Pc y sus mutantes Syn-V48I y Syn-A44D/D49P/A62L, así como para sus correspondientes apo-proteínas, a 298 K (figura 42A) y 498 K (figura 42B). También se muestran dichas representaciones para Syn-G60A y Syn-V48I/G60A calculados a temperatura ambiente (figura 42A). Los valores promedio de RMSDs se muestran en la tabla 10. A temperatura ambiente dichos valores promedios se mantienen estables una vez alcanzado el estado de equilibrio, en torno a 0,1 nm. Este hecho indica que la estructura es estable a lo largo de la trayectoria.

En el caso de Syn-A44D/D49P/A62L fue necesario alargar el ensayo a 298 K debido a que a los 7 ns se produce para la forma holo un salto desde 0,099 a 0,14 nm, donde se mantiene hasta finalizar la trayectoria. Al prolongar el tiempo de la dinámica se observó que el RMSD para la forma apo de este mismo mutante sufre un incremento progresivo entre los 10 y 14,68 ns, tras lo cual oscila ampliamente entorno a los 0,13 nm.

También se prolongó el tiempo de ensayo para el mutante Syn-V48I/G60A tras observar un incremento en el valor de RMSD en torno a los 5,5 ns, siendo más pronunciado para la forma apo que para la holo. Tras ello y durante el tiempo restante de la dinámica los valores de RMSD se mantuvieron constantes entorno a 0,12 nm para ambas formas del mutante.

Cuando la temperatura se incrementa hasta 498 K (figura 42 B), los RMSDs para el esqueleto (tabla 10) alcanzan valores comprendidos entre 0,2844 nm para la forma holo de Syn-Pc y 0,4899 nm para la apo-

Pc de Syn-A44D/D4P/A62L, lo que indica cambios estructurales significativos en las proteínas estudiadas con respecto a sus respectivas estructuras iniciales en la trayectoria. Para las formas holo-Pc el RMSD aumenta gradualmente hasta valores superiores a 0,25 nm para posteriormente estabilizarse.

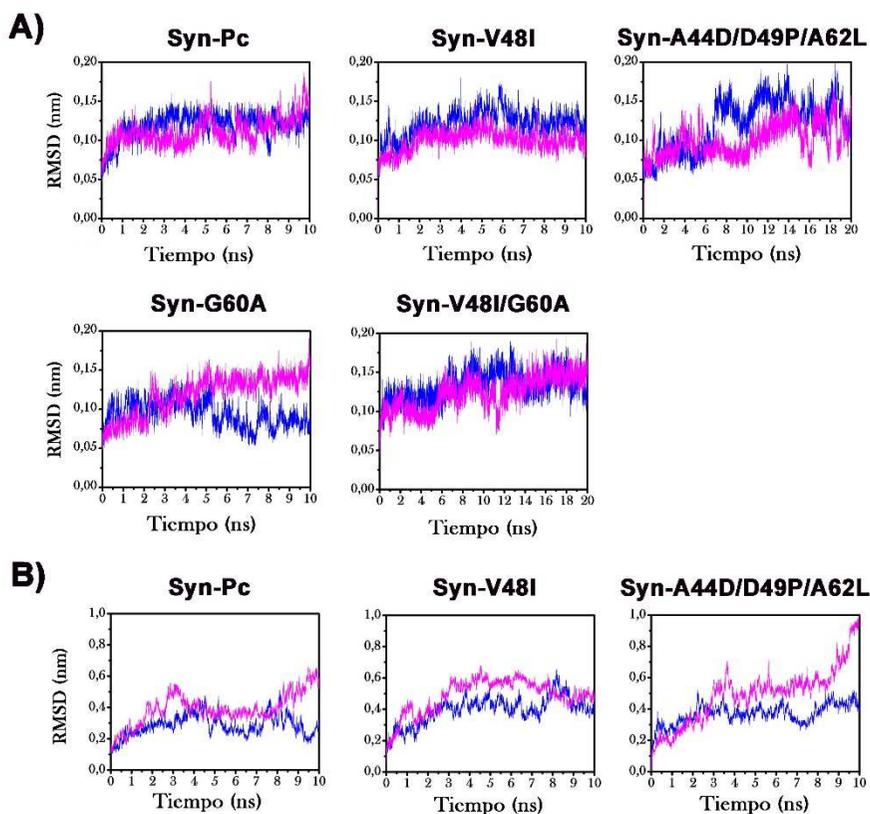


Figura 42. Desviaciones medias (RMSDs) a lo largo de las trayectorias de larga duración calculadas a (A) 298 y (B) 498K.

La duración de las trayectorias a 298K es de 10 ns para Syn-Pc, Syn-V48I y Syn-G60A y 20 ns para Syn-A44D/D49P/A62L y Syn-V48I/G60A. A 498K las trayectorias alcanzan los 10 ns en todos los casos ensayados. Se han considerado únicamente los átomos del esqueleto polipeptídico. En azul se muestra el RMSD correspondiente a las formas holo y en magenta a las formas apo de cada uno de los mutantes.

Tabla 10. Valores promedios de los RMSDs para Syn-Pc y sus mutantes.

Los valores mostrados han sido calculados a partir de las gráficas de la figura 42.

Temperatura (K)	Proteína	RMSD Promedio (nm)	
		Holo-Pc	Apo-Pc
298	Syn-Pc	0,1186	0,1113
	Syn-V48I	0,1206	0,0998
	Syn-G60A	0,0939	0,1188
	Syn-V48I/G60A	0,1324	0,1233
	Syn-A44D/D49P/A62L	0,1208	0,1002
498	Syn-Pc	0,2844	0,3897
	Syn-V48I	0,3954	0,4870
	Syn-A44D/D49P/A62L	0,3685	0,4899

Las trayectorias de las formas apo de los mutantes Syn-V48I y Syn-A44D/D49P/A62L muestran valores de RMSD que indican un comportamiento diferente entre estos dos mutantes. Mientras que el triple mutante, al igual que la proteína silvestre, experimenta un rápido incremento del RMSD al final de la trayectoria, Syn-V48I sufre un descenso del mismo. Estos resultados sugieren que tanto Syn-Pc como Syn-A44D/D49P/A62L alcanzan un mayor grado de desnaturalización que Syn-V48I al final de la trayectoria.

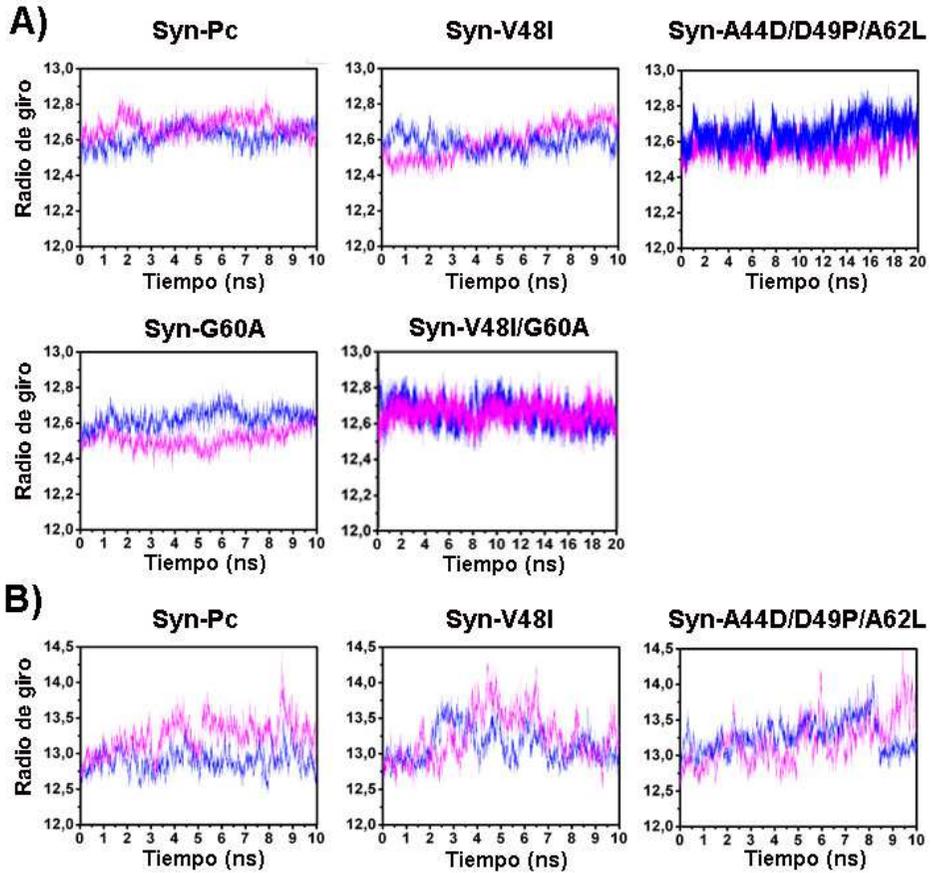


Figura 43. Radio de giro (R_g) a lo largo de las trayectorias de larga duración calculadas a (A) 298 y (B) 498K.

La duración de las trayectorias a 298K es de 10 ns para Syn-Pc, Syn-V48I y Syn-G60A y 20 ns para Syn-A44D/D49P/A62L y Syn-V48I/G60A. A 498K las trayectorias alcanzan los 10 ns en todos los casos ensayados. En azul se muestra R_g correspondiente a las formas holo y en magenta a las formas apo de cada una de las Pc.

El radio de giro (R_g) es un parámetro indicativo del grado de compactación de una proteína. En la figura 43 se muestra la evolución de R_g en función del tiempo de trayectoria para los esqueletos polipeptídicos de Syn-Pc y sus mutantes Syn-V48I y Syn-A44D/D49P/A62L, así como

para sus correspondientes apo-proteínas, a 298 K (figura 43A) y 498 K (figura 43B). También se muestran dichas representaciones para Syn-G60A y Syn-V48I/G60A calculados a temperatura ambiente (figura 43A).

A 298 K, R_g se mantiene constante con el tiempo de trayectoria para todas las proteínas estudiadas, con sutiles diferencias en el comportamiento según la proteína y forma. Así, la apo-Pc de Syn-V48I incrementa su R_g gradualmente a medida que avanza el tiempo.

Los resultados obtenidos a alta temperatura tampoco muestran grandes desigualdades entre Syn-Pc y sus variantes. Syn-Pc y su apo-Pc mantienen estables sus R_g una vez alcanzado el equilibrio. Sin embargo, en Syn-V48I ambas formas ven incrementada sus R_g al principio de la trayectoria para posteriormente recuperarse gradualmente. En la holo-Pc de Syn-A44D/D49P/A62L se observa una caída brusca de su R_g al final de la simulación. Por el contrario, su apo-Pc aumenta su R_g con el avance de la trayectoria sin recuperar su valor de partida en ningún momento.

4.5.1.2. Flexibilidad estructural

Para investigar las características dinámicas se calcularon las fluctuaciones cuadráticas medias ("Root Mean Square Fluctuation" o RMSF) para cada una de las trayectorias de dinámica molecular para Syn-Pc y sus mutantes Syn-V48I y Syn-A44D/D49P/A62L, así como para sus correspondientes apo-proteínas, a 298 (figuras 44 a 46) y 498 K (figuras 47 y 48). También se muestran dichas representaciones para Syn-G60A y Syn-V48I/G60A calculados a temperatura ambiente (figuras 44 a 46). El RMSF refleja la movilidad de un determinado residuo respecto a su posición promedio.

4.5.1.2.1. Flexibilidad estructural a 298 K

El patrón de movilidad a temperatura ambiente (figura 44) de Syn-Pc concuerda con los calculados en trabajos previos [Bertini^a *et al.*, 2001; Muñoz-López^b *et al.*, 2010]. Tal como ya se vio para los RMSF obtenidos para las dinámicas de corta duración, las regiones con mayor movilidad son aquellas pertenecientes a zonas de lazos, mientras que las estructuras que conforman el barril muestran un grado muy bajo de movilidad. Las secuencias comprendidas por los residuos 10-12 (L1) y 46-48 (L5) son las que experimentan los valores más altos. También muestra un alto RMSF el residuo 34 (Asn34), situado en el borde de la hebra β 4.

Los cambios inducidos por las diversas mutaciones en la estructura proteica se reflejan en los patrones de valores RMSF. Así, a temperatura ambiente, se observan los siguientes efectos con respecto a Syn-Pc:

- Lazo L1 (residuos 9-14): la sustitución V48I restringe el movimiento de esta región en la holo-Pc. Los mutantes restantes, sin embargo, muestran una mayor motilidad del lazo.

Al comparar las apo-Pc, se observa que todos los mutantes muestran valores de RMSF menores que los del silvestre.

- Secuencia comprendida entre la hebra β 2 y el lazo L4 (residuos 15-34): Syn-G60A y Syn-A44D/D49P/A62L muestran valores de RMSF ligeramente superiores a los del silvestre, con un máximo en la Gly26.

Al considerar las formas apo, la movilidad de la cadena polipeptídica es levemente inferior en Syn-V48I y Syn-A44D/D49P/A62L.

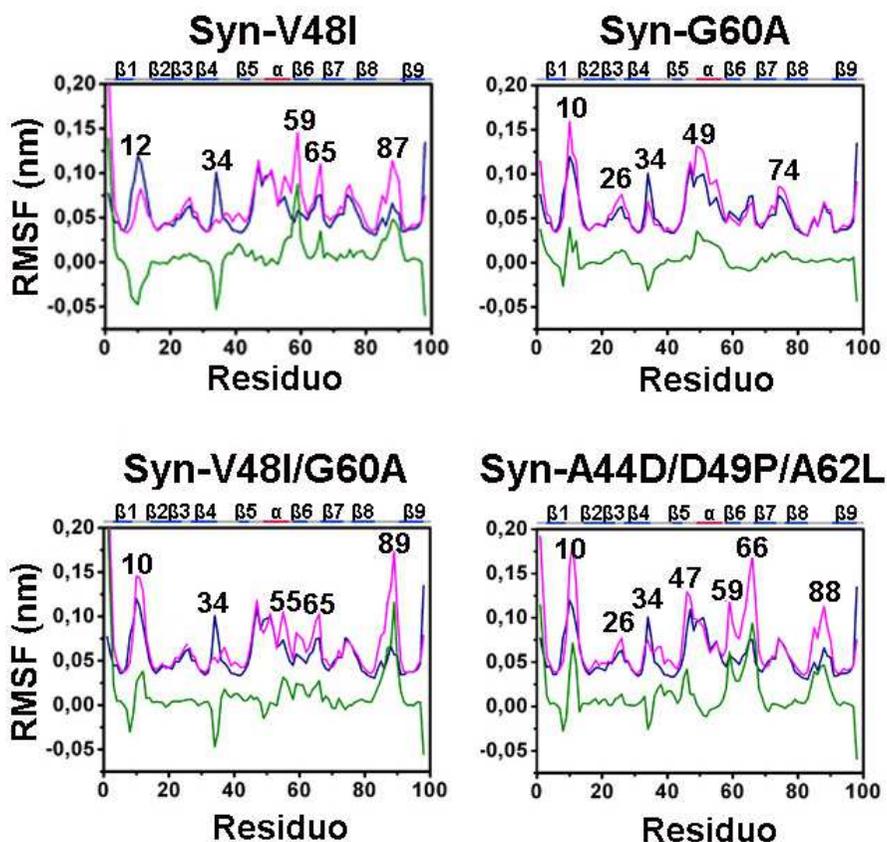


Figura 44. Fluctuaciones cuadráticas medias (RMSF) a lo largo de las trayectorias de larga duración calculadas a 298 K para las formas holo de Syn-Pc y sus mutantes.

Fluctuaciones cuadráticas medias (RMSF) de los C α de las holo-Pc a 298 K, calculados a lo largo de la fase estable de la trayectoria. En azul se muestra el RMSD correspondiente a Syn-Pc, en magenta a los diferentes mutantes, y en verde, la diferencia entre los RMSFs de ambas formas (RMSF del mutante menos del silvestre).

- Entorno del cobre: Lazos L4 y L8 (residuos 33-41 y 83-92): Todas las mutaciones inducen una restricción en la motilidad a la altura de la Asn34, adyacente al ligando del cobre His39. En el caso de Syn-V48I, Syn-V48I/G60A y Syn-A44D/D49P/A62L, esta menor motilidad de

Asn34 se acompaña de una mayor flexibilidad del resto del lazo L4, así como del L8.

La pérdida de motilidad del lazo L4 en la apo-proteína de Syn-Pc hace que la diferencia en RMSF con los diferentes mutantes en esta región sea menor. De hecho, en el entorno de Asn34 de Syn-G60A y Syn-V48I/G60A la motilidad es superior en los mutantes. El lazo L8 también se ve afectado por la pérdida del cobre, siendo el silvestre el que muestra en todos los casos mayor RMSF en esta región.

- Cara este: hebras $\beta 5$ y $\beta 6$, hélice α , y lazos L5 y L6 (residuos 42-62): La triple mutación A44D/D4P/A62L incrementa el RMSF de la hebra $\beta 5$. El lazo L5 y la hélice α se afectan principalmente por Syn-G60A, donde la mutación incrementa la motilidad, y Syn-A44D/D4P/A62L, que induce el efecto inverso. Tanto Syn-A44D/D4P/A62L como Syn-V48I experimentan un incremento significativo del RMSF en la hebra $\beta 6$, principalmente en el entorno de la Lys59.

En cuanto a las apo-Pc, Syn-V48I muestra un comportamiento muy similar a la del silvestre en cuanto a motilidad se refiere, a pesar de que la mutación se localiza en esta región. Syn-V48I/G60A presentan menor motilidad en L5 y en la hélice en comparación con Syn-Pc. La mutación triple A44D/D49P/A62L provoca una reducción de la motilidad de toda la cara este, en especial en el entorno de la Gly47 y la Lys59. Cabe mencionar que estos residuos se encuentran flanqueados por las mutaciones.

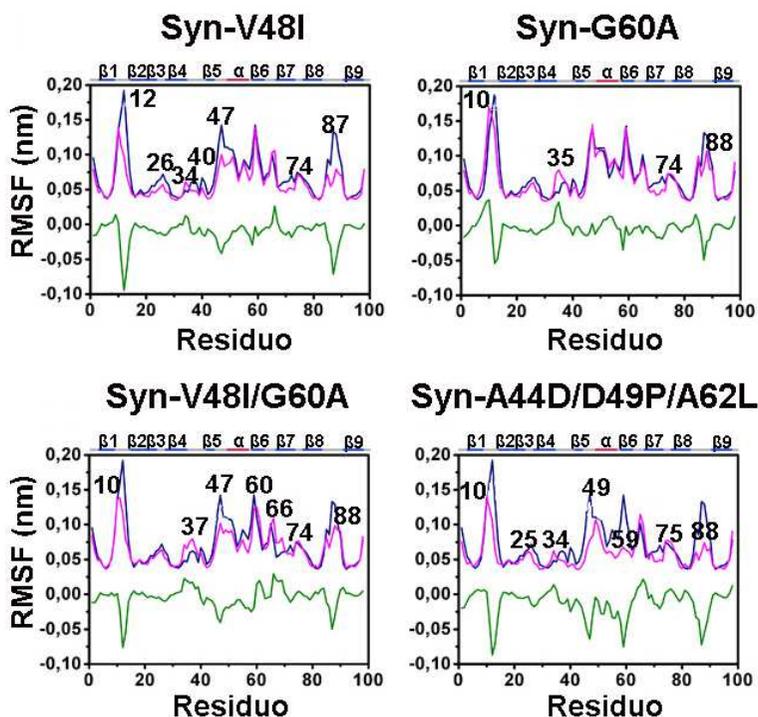


Figura 45. Fluctuaciones cuadráticas medias (RMSF) a lo largo de las trayectorias de larga duración calculadas a 298 K para las formas apo de Syn-Pc y sus mutantes.

RMSF de los C α de las apo-Pc a 298 K, calculados a lo largo de la fase estable de la trayectoria. En azul se muestra el RMSD correspondiente a Syn-Pc, en magenta a los diferentes mutantes, y en verde, la diferencia entre los RMSFs de ambas formas (RMSF del mutante menos del silvestre). Sobre cada gráfico se muestra una barra de color representando los distintos elementos de estructura secundaria de Syn-Pc, siendo: azul, hebra β ; rojo, hélice α y gris, lazo.

- Hebras β 7 y β 8, y lazos L7 y L8 (residuos 63-83): Es el triple mutante el que muestra una diferencia más significativa con Syn-Pc, con un incremento considerable de la motilidad alrededor de la Gly66 (L7).

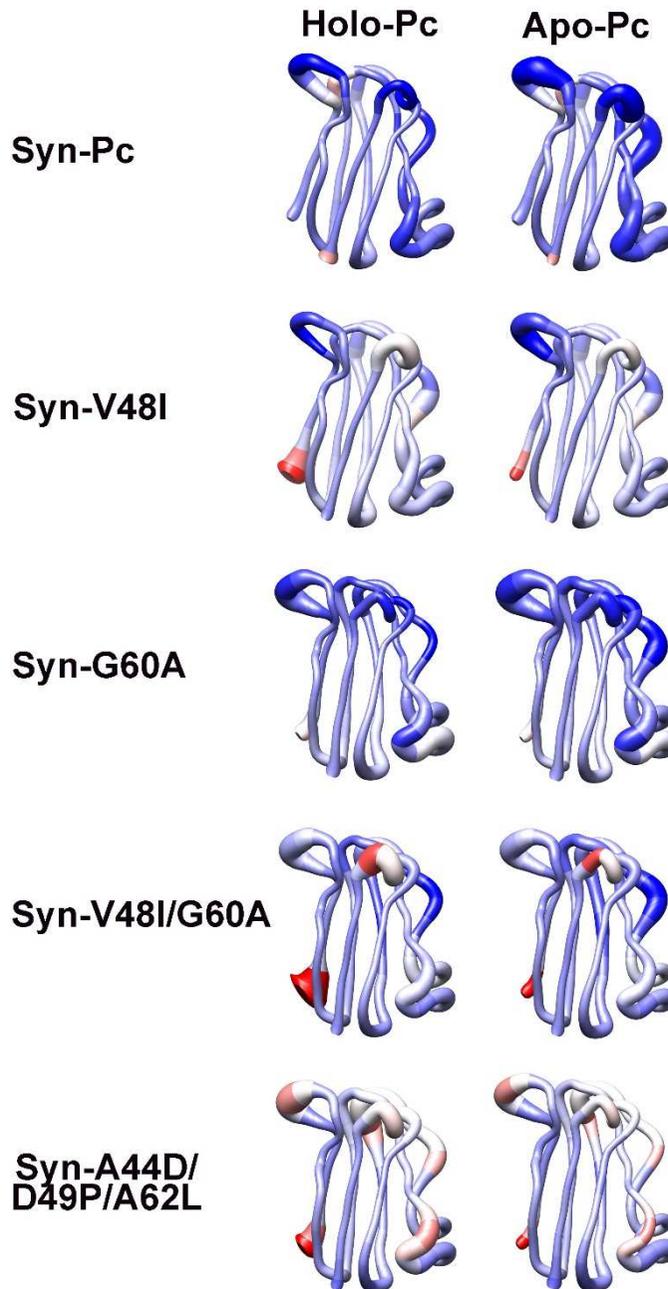


Figura 46. Fluctuaciones cuadráticas medias a 298 K.

Representaciones gráficas donde se muestran las regiones con mayor movilidad de Syn-Pc y sus mutantes. El diámetro de la traza del esqueleto peptídico es proporcional a los valores de RMSF. El color es indicativo de la diferencia entre

los RMSF entre la forma holo y la forma apo, de forma que tanto más azul, más móvil es la apo-Pc respecto a la holo-Pc.

La eliminación del átomo de cobre afecta de forma diferente a cada proteína ensayada (figuras 44 y 45). En la Pc silvestre, la flexibilidad del lazo L1, y en menor medida la del L5, se ve incrementada, mientras que la Asn34 pierde toda la motilidad que exhibía en la holoproteína. Además, los RMSF de la Lys59 y la Arg87, situadas en la hebra $\beta 6$ y el lazo L8, respectivamente, aumentan considerablemente en la apo-Pc. La Arg87 se encuentra adyacente a la His86, y en el mismo lazo que la Met91 y la Cys83, todos ellos ligandos del cobre. Resulta lógico, por tanto, que la pérdida del anclaje del cobre resulte en el incremento en la motilidad de residuos presentes en el lazo L8.

El cambio inducido por la mutación V48I en la estructura hace que la pérdida del metal no afecte tanto a la motilidad proteica como en Syn-Pc. Aún así, el lazo L1 sigue mostrando un RMSF más elevado en la apo-Pc mutante. El extremo N-terminal, sin embargo, es más flexible en el caso de la forma holo.

Un comportamiento similar es el mostrado por la doble mutación V48I/G60A, donde la eliminación del átomo de cobre sólo incrementa considerablemente la motilidad de la hebra $\beta 6$, a la vez que reduce la del extremo N-terminal y el lazo L8.

En Syn-G60A, la apo-Pc muestra una mayor motilidad en la cara norte que la holo-Pc, así como en parte del lazo L5.

En el triple mutante Syn-A44D/D49P/A62L las diferencias entre las formas holo y apo-Pc son mínimas, radicando fundamentalmente en una mayor motilidad de la holo-Pc en los lazos L1, L5, L6 y L8, así como en el entorno de la Lys59.

4.5.1.2.2. Flexibilidad estructural a 498 K

A alta temperatura (498 K) la región que muestra una mayor motilidad en todas las holo-Pc ensayadas es la comprendida aproximadamente entre los residuos Asn40 y Thr70, es decir, la cara este y parte de la hebra $\beta 7$. También muestra un alto RMSF el lazo L1 (figuras 45 y 46). Aparte de esta zona, Syn-Pc muestra un RMSF elevado a la altura de los lazos L1 (Ser11), L3 (Ala25), L4 (Lys35), L7 (Thr74) y L8 (Gly88).

Las mutaciones V48I y Syn-A44D/D49P/A62L afectan de forma muy similar a la flexibilidad estructural de Syn-Pc. Ambas incrementan la movilidad del lazo L8 (Gly88), y, en menor medida del lazo L1 (Ser11). La hélice α también ve incrementada su RMSF, concretamente en torno a Asp51.

Syn-V48I muestra también una mayor movilidad en los lazos L3, L6 y L7, con máximos en los residuos Ala25, Ala65 y Thr74, así como en la secuencia comprendida entre estos dos últimos lazos, que engloba a la hebra comprendida entre ellos ($\beta 7$). Entre los residuos Ala55 y Leu61, Syn-Pc muestra valores de RMSF superiores a la experimentada por estos mutantes. Esta zona se corresponde con el final de la hélice α , el lazo L6 y la mayor parte de la hebra $\beta 6$ (figuras 45A y 46).

La apo-Pc de Syn-Pc muestra valores de RMSF mayores que la forma holo principalmente en la hélice α , y los lazos L1, L6 y L8. Sin embargo, en la hebra $\beta 6$ y en el lazo L5 existen residuos donde se observa la tendencia contraria.

El efecto causado por la eliminación del cobre es principalmente patente en Syn-A44D/D49P/A62L, donde la apo-Pc muestra valores de RMSF superiores a su holo-Pc en prácticamente toda la cadena peptídica (figuras 47B y 48). Este efecto es sobre todo notable en las hebras $\beta 1$,

$\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 6$, así como en los lazos L1, L2 y L6. Sólo a la altura de la hélice α se observan residuos que muestran en la holoproteína valores de RMSF superiores a los de la apo.

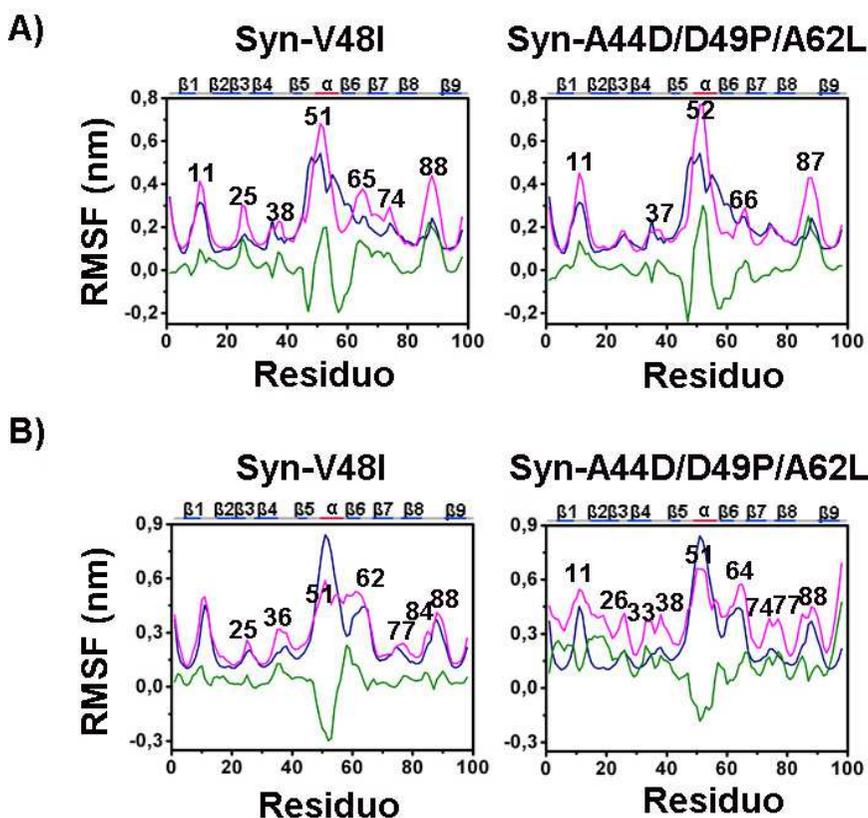


Figura 47. Fluctuaciones cuadráticas medias (RMSF) a lo largo de las trayectorias de larga duración calculadas a 498 K de las formas holo y apo de Syn-Pc y sus mutantes.

RMSF de los C α de las holo-Pc (**A**) y apo-Pc (**B**) a 498 K, calculados a lo largo de la fase estable de la trayectoria. En azul se muestra el RMSD correspondiente a Syn-Pc, en magenta a los diferentes mutantes, y en verde, la diferencia entre los RMSFs de ambas formas (RMSF del mutante menos del silvestre). Sobre cada gráfico se muestra una barra de color representando los distintos elementos de estructura secundaria de Syn-Pc, siendo: azul, hebra β ; rojo, hélice α y gris, lazo.

En el caso de Syn-V48I la hebra $\beta 6$ es la que muestra una mayor afectación por la retirada del metal, mostrando una mayor motilidad en la apo-proteína. Sin embargo, la hélice α y la hebra $\beta 7$ ven disminuídas considerablemente sus motilidades al eliminar el anclaje del cobre.

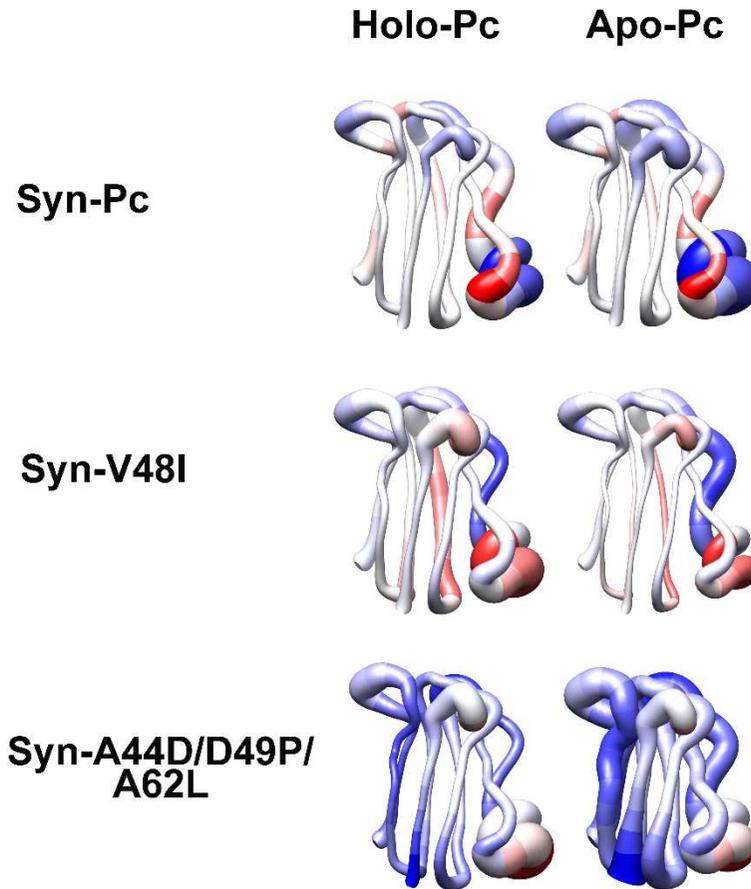


Figura 48. Fluctuaciones cuadráticas medias a 498 K.

Fluctuaciones cuadráticas medias a 498 K. Representaciones gráficas donde se muestran las regiones con mayor movilidad de Syn-Pc y sus mutantes. El diámetro de la traza del esqueleto peptídico es proporcional a los valores de RMSF. El color es indicativo de la diferencia entre los RMSF entre la forma holo y la forma apo, de forma que tanto más azul, más móvil es la apo-Pc respecto a la holo-Pc.

La apo-Pc de Syn-Pc muestra valores de RMSF mayores que la forma holo principalmente en la hélice α , y los lazos L1, L6 y L8. Sin embargo, en la hebra $\beta 6$ y en el lazo L5 existen residuos donde se observa la tendencia contraria.

El efecto causado por la eliminación del cobre es principalmente patente en Syn-A44D/D49P/A62L, donde la apo-Pc muestra valores de RMSF superiores a su holo-Pc en prácticamente toda la cadena peptídica (figuras 47B y 48). Este efecto es sobre todo notable en las hebras $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 6$, así como en los lazos L1, L2 y L6. Sólo a la altura de la hélice α se observan residuos que muestran en la holoproteína valores de RMSF superiores a los de la apo.

4.5.1.3. Estructura secundaria y rutas de desplegamiento

4.5.1.3.1. Estructura secundaria y rutas de desplegamiento a 298K

A 298K (figuras 49 a 51), las estructuras de las tres proteínas se mantienen estables durante la simulación, sin cambios globales importantes respecto a la estructura inicial. Este comportamiento es independiente de que se esté tratando con las holo-proteínas (figuras 49 y 50) o con sus formas apo (figuras 51 y 52).

La figura 49 muestra los cambios en la estructura secundaria con respecto al tiempo de simulación de las holo-Pc. En la figura 50 se representan las instantáneas tomadas a los tiempos inicial y final de simulación, así como una superposición de las correspondientes a los 0,1,2,4,6,8 y 10 ns. En la tabla 11 se indican los RMSD en nm entre la estructura inicial y la final de cada una de las trayectorias.

Syn-Pc muestra una desestabilización de las hebras $\beta 1$ y $\beta 2$, tal y como se menciona en la bibliografía [Feio *et al.*, 2006; Muñoz-López^b

et al., 2010]. Se observa también cierta pérdida de estructura secundaria en las hebras $\beta 4$, $\beta 7$ y $\beta 8$, así como en el lazo L5. A diferencia de anteriores trabajos, no se observa a temperatura ambiente desestabilización de las hebras $\beta 5$ y $\beta 6$ [Muñoz-López^b *et al.*, 2010].

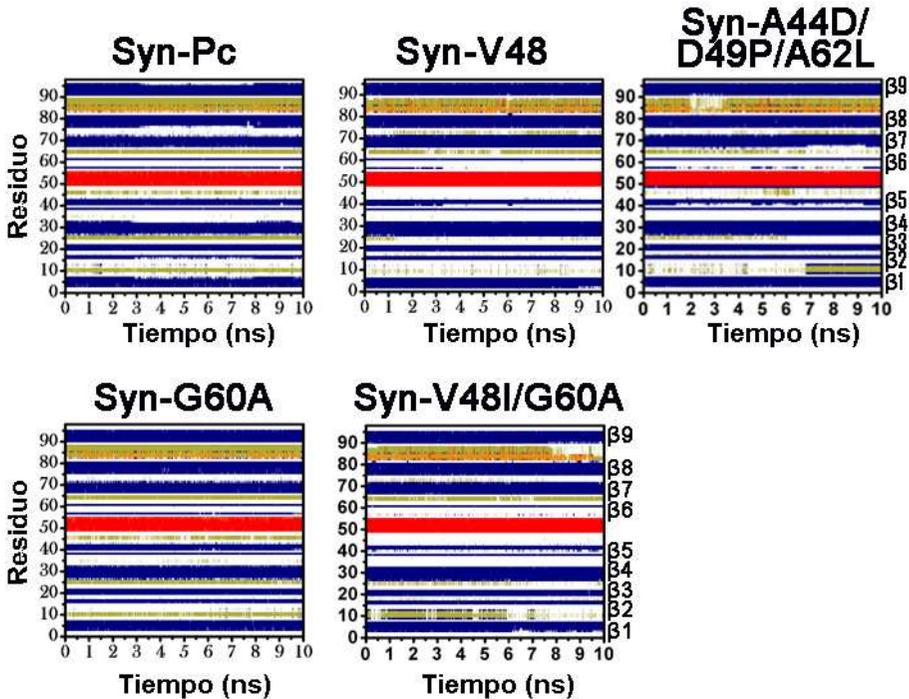


Figura 49. Evolución de la estructura secundaria de las formas holo a 298 K

Evolución de la estructura secundaria de las formas holo de Syn-Pc y de sus mutantes V48I, G60A, V48I/G60A y A44D/D49P/A62L respecto al tiempo de simulación a 298K. Código de colores: hebra β , azul; hélice α , rojo; hélice π , marrón; hélice 3_{10} , naranja; giro, gris; lazo, dorado; irregular, blanco.

Syn-G60A es el mutante que presenta un comportamiento más parecido al silvestre. De hecho, todos los mutantes a excepción de Syn-G60A muestran menor estabilidad que el silvestre en las hebras $\beta 5$ y $\beta 6$, así como en los lazos L1, L3, L5 y L6. También en estos mutantes se

observa una mayor variación de la estructura secundaria del L8 de lazo a hélice 3_{10} , y viceversa. Este lazo muestra una mayor pérdida de estructura secundaria en los mutantes múltiples Syn-V48I/G60A y Syn-A44D/D49P/A62L que en el silvestre (figura 49). Todas las mutaciones incrementan la estabilidad de las hebras β_1 , β_2 , β_4 , β_8 y β_9 .

Concretamente, en Syn-V48I las alteraciones más significativas consisten en la pérdida total de parte de la hebra β_6 a partir de los 3 ns de trayectoria. Además, los lazos L1 y L3 desaparecen totalmente desde el principio de la simulación.

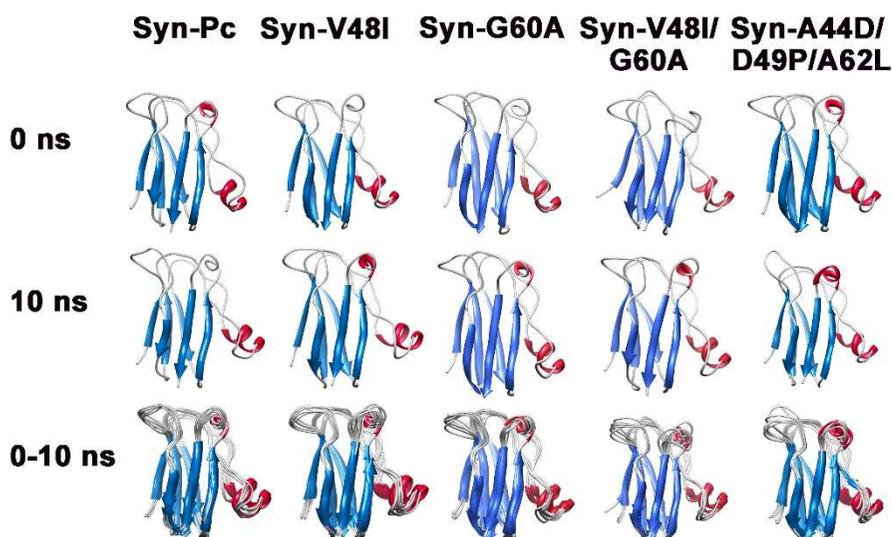


Figura 50. Cambios estructurales experimentados por las formas holo de Syn-Pc y sus mutantes V48I y A44D/D49P/A62L a lo largo de la trayectoria a 298K.

Los diagramas de Robertson representan las instantáneas tomadas al inicio y final de la trayectoria (0 y 10 ns), así como la superposición de las imágenes tomadas a los 0, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 ns. Las hélices α se muestran en rojo, las hebras β en azul y las zonas de lazos en gris.

La hebra β_6 en el triple mutante Syn-A44D/D49P/A62L sufre una continua pérdida y recuperación. A partir de los 7 ns, se produce una recuperación del lazo L1, hasta entonces desaparecido. Este hecho coincide en el tiempo con una cierta desestabilización de la hebra β_7 . Además, el lazo L3 se encuentra desorganizado durante toda la trayectoria.

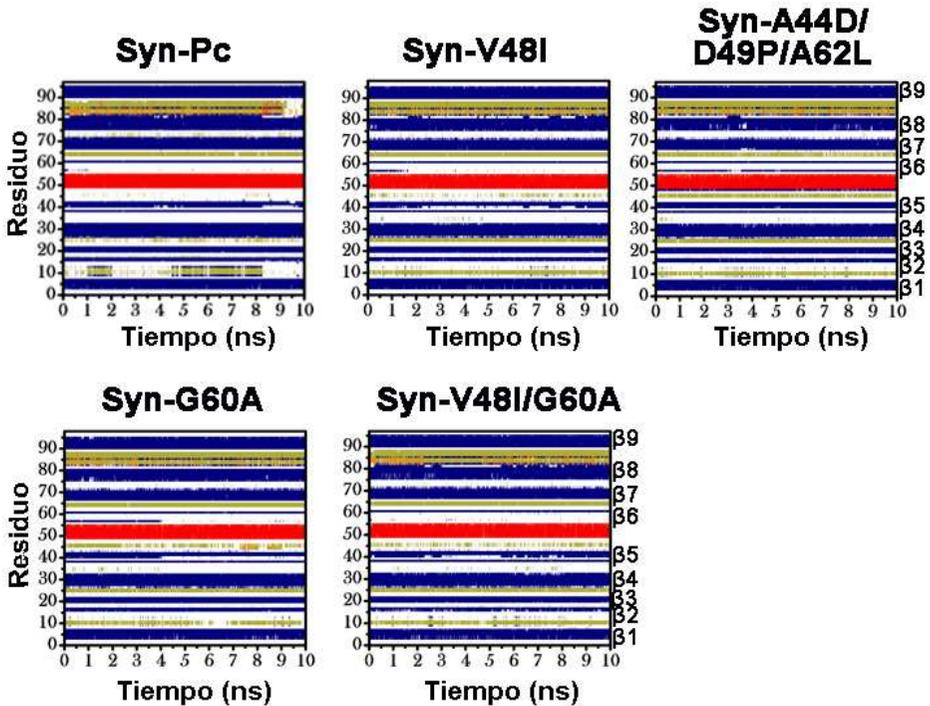


Figura 51. Evolución de la estructura secundaria de las formas apo a 298 K
Evolución de la estructura secundaria de las formas apo de Syn-Pc y de sus mutantes V48I, G60A, V48I/G60A y A44D/D49P/A62L respecto al tiempo de simulación a 298K. Código de colores: hebra β , azul; hélice α , rojo; hélice π , marrón; hélice 3_{10} , naranja; giro, gris; lazo, dorado; irregular, blanco.

La eliminación del átomo de cobre (figuras 51 y 52) provoca en la apo-Pc de *Synechocystis* una pérdida general de estructura secundaria en comparación con la holo-Pc, principalmente a la altura de la hebra β_6 ,

y los lazos L1, L3 y L5. También se muestra menos estable la hebra $\beta 5$. Sin embargo, las hebras $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 4$ y $\beta 9$ resultan más estables que en la holo-Pc.

En el doble mutante Syn-V48I/G60A la hebra $\beta 6$ se pierde parcialmente a lo largo de la trayectoria. El lazo L3, al igual que ocurre con otros mutantes, también se muestra prácticamente ausente durante la dinámica, mientras que L7 sufre desestabilizaciones puntuales. El lazo L8 experimenta una desestabilización importante a partir de los 7,5 ns aproximadamente.

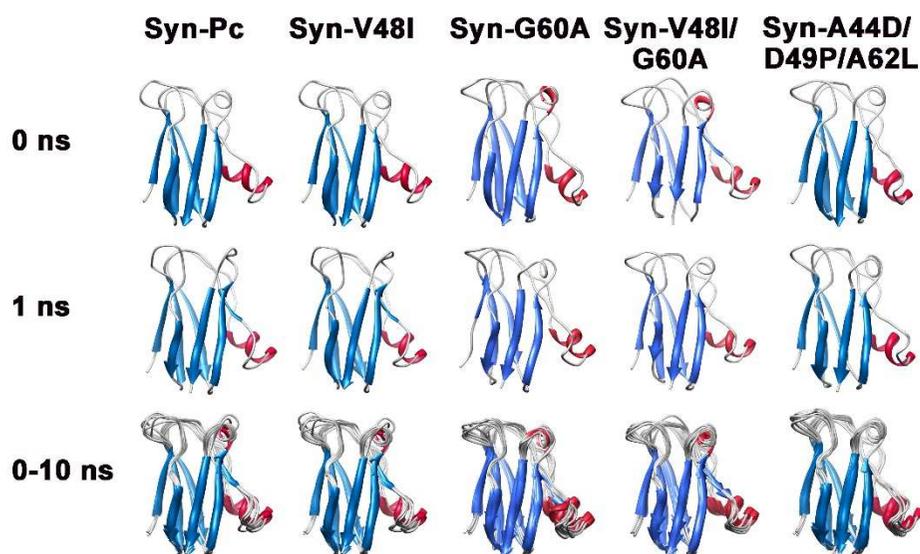


Figura 52. Cambios estructurales experimentados por las formas apo de Syn-Pc y sus mutantes V48I y A44D/D49P/A62L a lo largo de la trayectoria a 298K.

Cambios estructurales experimentados por las formas apo de Syn-Pc y sus mutantes a lo largo de la trayectoria a 298K. Los diagramas de Robertson representan las instantáneas tomadas al inicio y final de la trayectoria (0 y 10 ns), así como la superposición de las imágenes tomadas a los 0, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 ns. Las hélices α se muestran en rojo, las hebras β en azul y las zonas de lazos en gris.

En la apo-Pc de Syn-V48I, las hebras $\beta 2$, $\beta 4$ y $\beta 9$ son menos estables que en su holo-Pc, al contrario de lo que ocurre con los lazos L1, L3 y L7.

Tabla 11. RMSD en nm entre la estructura inicial y la final de cada una de las trayectorias, tomando como referencia la estructura inicial.

Calculada con UCSF Chimera [Pettersen *et al.*, 2004].

Temperatura	Proteína	RMSD (nm)	
		Holo-Pc	Apo-Pc
298 K	Syn-Pc	0,136	0,140
	Syn-V48I	0,126	0,153
	Syn-G60A	0,084	0,089
	Syn-V48I/G60A	0,102	0,095
	Syn-A44D/D49P/A62L	0,117	0,085
498 K	Syn-Pc	0,323	0,587
	Syn-V48I	0,445	0,442
	Syn-A44D/D49P/A62L	0,388	0,999

La apo-Pc de Syn-A44D/D49P/A62L muestra, en comparación con su forma holo, una mayor estabilidad de las hebras $\beta 5$ y $\beta 6$, y de los lazos L3, L5 y L8. La hebra $\beta 8$ resulta menos estable, mientras que la $\beta 4$ sufre una leve desestabilización. El lazo L1 no pierde su estructura durante toda la dinámica.

La eliminación del átomo de cobre en el mutante Syn-G60A desestabiliza las hebras $\beta 5$, $\beta 6$ y $\beta 8$. El lazo L1 resulta también ligeramente desestabilizado.

La apo-Pc de Syn-V48I/G60A muestra hebras $\beta 2$, $\beta 4$, $\beta 7$ y $\beta 8$ menos estables que su holo-Pc. Los lazos L3 y L7 son más estables en la apo-Pc.

4.5.1.3.2. Estructura secundaria y rutas de desplegamiento a 498 K

El contenido en estructura secundaria de Syn-Pc, Syn-V48I y Syn-A44D/D49P/A62L se ve gravemente alterado a alta temperatura (498 K).

Las formas holo (figuras 53A y 54) de los dos mutantes muestran un comportamiento similar, con una pronta desaparición de los elementos de hélice α y hélice 3_{10} en la cara este. A lo largo de la trayectoria el contenido en hebra β oscila debido principalmente por la continua aparición y destrucción de este tipo de elemento entre las hebras $\beta 1$ y $\beta 2$. En la plastocianina silvestre la hélice se mantiene, aunque fluctuante, a lo largo de la trayectoria, mientras que el contenido en hebra β disminuye gradualmente. El lazo entre las hebras $\beta 8$ y $\beta 9$ sólo se mantiene en Syn-Pc, oscilando entre estructura de lazo y hélice 3_{10} .

En relación a las formas apo (figuras 53B y 55), se observa como la pérdida del ion metálico afecta en mayor medida a las proteínas mutantes. Resulta notable que la tendencia mostrada por las holo-Pc se intercambia en las apo-Pc. La rápida desaparición de la hélice α de las hebras $\beta 1$ y $\beta 2$ durante la trayectoria es experimentada ahora por Syn-Pc y no por sus variantes. Es más, en los mutantes la hélice α se extiende en dirección C-terminal reemplazando parte de la hebra $\beta 6$. El lazo L8 en

Syn-V48I y en Syn-A44D/D49P/A62L cambia en ciertos momentos de la trayectoria a hélice α .

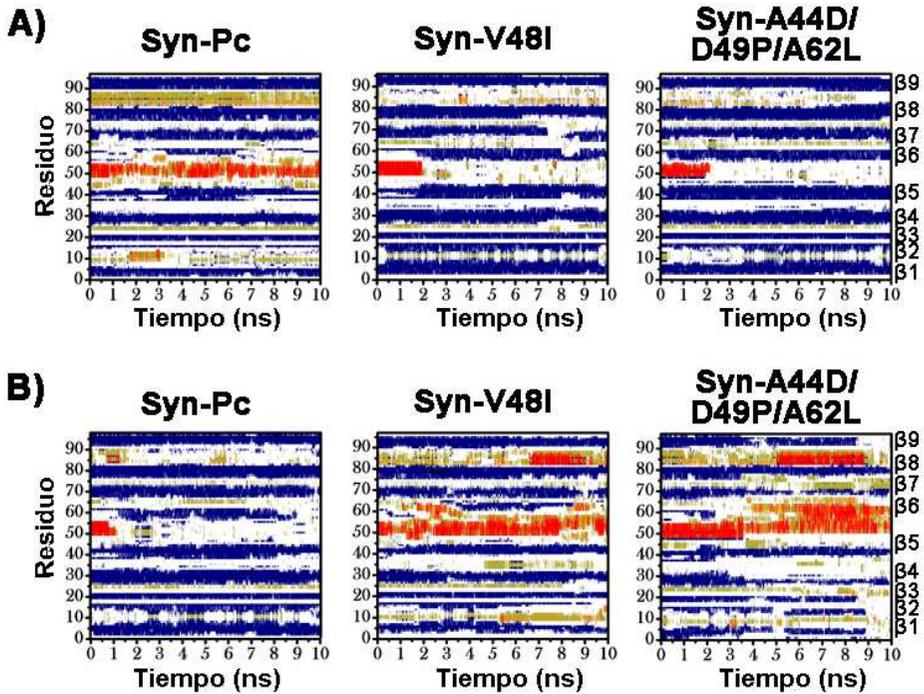


Figura 53. Evolución de la estructura secundaria de las formas (A) holo y (B) apo a 498 K

Evolución de la estructura secundaria de las formas holo y apo de Syn-Pc y de sus mutantes V48I y A44D/D49P/A62L a lo largo del tiempo de simulación a 498K. Código de colores: hebra β , azul; hélice α , rojo; hélice π , marrón; hélice 3_{10} , naranja; giro, gris; lazo, dorado; irregular, blanco.

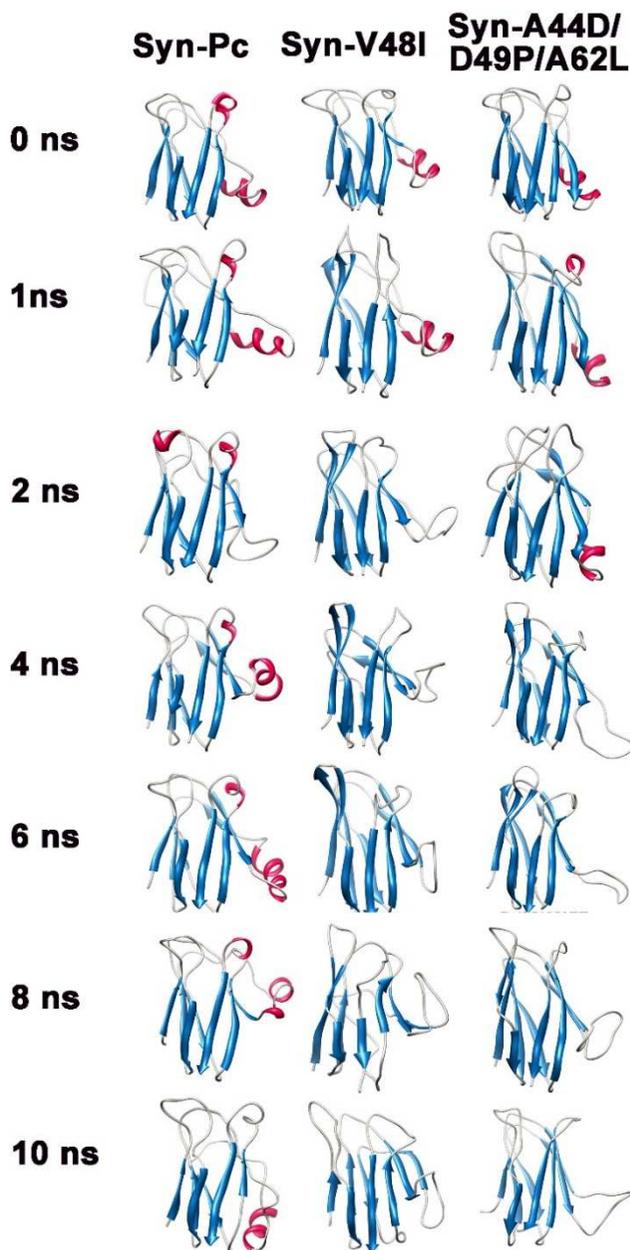


Figura 54. Cambios estructurales experimentados por las formas holo de Syn-Pc y sus mutantes V48I y A44D/D49P/A62L a lo largo de la trayectoria a 498K.

Los diagramas de Robertson representan las instantáneas tomadas a diferentes tiempos. Las hélices α se muestran en rojo, las hebras β en azul y las zonas de lazos en gris.

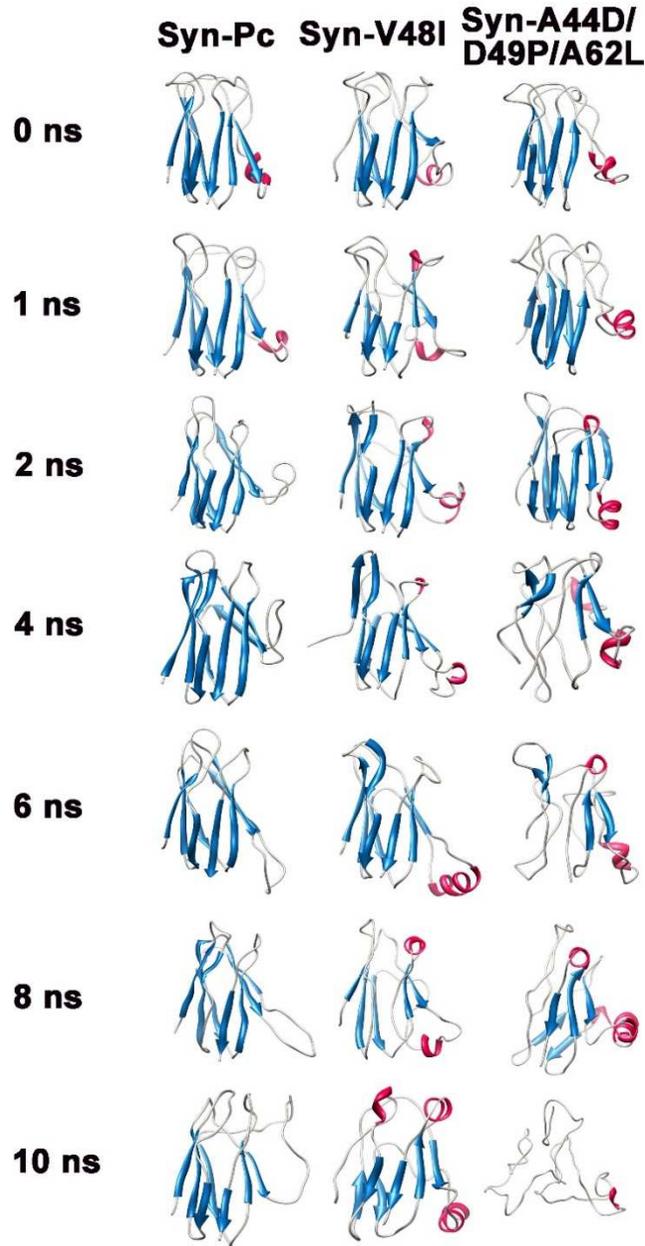


Figura 55. Cambios estructurales experimentados por las formas apo de Syn-Pc y sus mutantes V48I y A44D/D49P/A62L a lo largo de la trayectoria a 498K.

Los diagramas de Robertson representan las instantáneas tomadas a diferentes tiempos. Las hélices α se muestran en rojo, las hebras β en azul y las zonas de lazos en gris.

Entre las formas holo es la del triple mutante la que mejor mantiene la integridad de sus hebras α , seguido por Syn-V48I. En Syn-Pc, sin embargo, se observa el debilitamiento de estos elementos de estructura secundaria, siendo especialmente notorio en las hebras α 5 y α 6, que forman parte de la cara este. Nuevamente, este comportamiento es contrario al que se observa en las apo-Pc. De hecho, la forma apo de Syn-Pc es la que muestra una mayor estabilidad de sus hebras α , mientras que Syn-A44D/D49P/A62L ha perdido la mayor parte de su contenido α al finalizar la trayectoria. De nuevo, el comportamiento de Syn-V48I es intermedio entre las otras dos proteínas.

4.5.1.4. Análisis de componentes principales

Sólo unos cuantos vectores propios son necesarios para describir los movimientos esenciales de una proteína [Hess, 2000; Hess, 2002; Hayward y de Groot, 2008]. De hecho, como se observa en la figura 56, los 5 primeros vectores propios obtenidos para SynPc y sus dos mutantes SynV48I y SynA44D/D49P/A62L describen más del 75% de las fluctuaciones totales de la proteína.

La tabla 12 muestra los contenidos coseno obtenidos para los cinco primeros vectores propios para Syn-Pc, Syn-V48I y Syn-A44D/D49P/A62L a temperatura ambiente. Con excepción del primer modo de Syn-A44D/D49P/A62L, el resto de contenidos cosenos son lo suficientemente bajos como para poder concluir que las trayectorias usadas para la determinación de los componentes principales son lo suficientemente largas como para obtener un muestreo aceptable de movimientos esenciales [Hess, 2000; Hess, 2002; Hayward y L. de Groot, 2008].

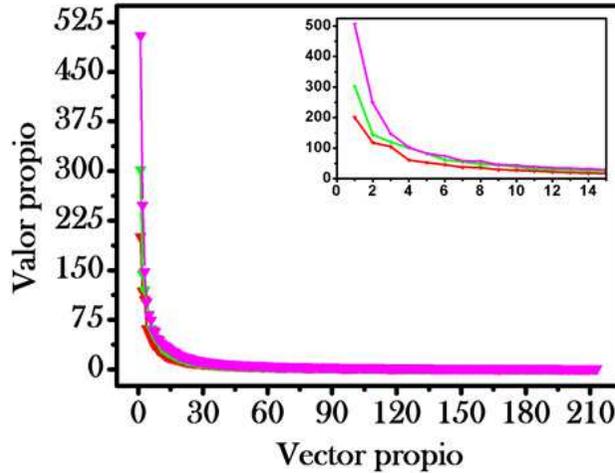


Figura 56. Representación de los valores propios frente a sus respectivos vectores propios.

Valores propios obtenidos a partir del proceso de diagonalización de la matriz de covarianza y representados en forma descendente.

En Syn-Pc, los lazos L1 y L5, aparte de otras regiones de la proteína, muestran movimientos concertados entre sí a lo largo de los cinco primeros vectores propios (figura 57):

- Primer vector propio: movimientos concertados de los lazos L1, L4, L5 y L6. Aparte, se observan movimientos concertados del extremo C-terminal, y en menor medida de L3 y L7.
- Segundo vector propio: movimientos concertados de los lazos L1, L3, L5 y L7, así como con los extremos C- y N-terminales.
- Tercer vector propio: movimientos interrelacionados de los lazos L1 y L5.
- Cuarto vector propio: movimientos concertados de los lazos L1 y L5. También se observan desplazamientos leves en los lazos constituyentes de la cara este.

- Quinto vector propio: movimientos concertados de los lazos L1 y L5 que se extienden a lo largo de las hebras β_4 , β_6 y β_7 .

En Syn-V48I, al contrario de lo que sucede en la Pc silvestre, no se observa la asociación entre movimientos del lazo L5 y L1 (figura 57). Sin embargo, sí se observa una extensión del movimiento del L5 hacia las hebras β_5 y β_6 y el lazo L8 :

- Primer vector propio: El movimiento del lazo L5 se propaga hacia las hebras β_5 y β_6 . A lo largo de este vector propio también se mueven los lazos L3, L7 y L8, y el extremo N-terminal.
- Segundo vector propio: nuevamente el movimiento del lazo L5 se produce de forma concertada con L1, L3 y L7, así como con el extremo N-terminal. En este caso el extremo C-terminal también se ve afectado por estos desplazamientos.
- Tercer vector propio: El movimiento a lo largo del principio de la hebra β_6 (secuencia entre las Lys55 y 59) se transmite a los lazos L6, principalmente a la Gly66, y L8, en la secuencia comprendida entre Met91 e His86, ambos ligandos del cobre. También se afectan la hebra β_5 , entre la Pro38 e Ile41, el extremo N-terminal y, en menor medida, los lazos L3 y L7.
- Cuarto vector propio: Movimientos concertados a lo largo de toda la secuencia comprendida entre Ala55 y Leu61, es decir, L5 y hebra β_6 . El lazo L8 se ve nuevamente afectado, junto con el extremo N-terminal.
- Quinto vector propio: Movimientos en el lazo L8 se acopla a desplazamientos en las hebras β_3 , β_4 , β_6 y β_7 , extremo N-terminal.

Tabla 12. Contenido coseno de los cinco primeros componentes principales (CP) de Syn-Pc y sus mutantes Syn-V48I y Syn-A44D/D49P/A62L a temperatura ambiente.

	Syn - Wt	Syn-V48I	Syn-A44D/D49P/A62L
CP 1	0,3	0,56	0,8
CP 2	0,1	0,058	0,124
CP 3	0,38	0,3	2×10^{-3}
CP 4	0,02	$5,8 \times 10^{-4}$	$1,4 \times 10^{-3}$
CP 5	4×10^{-4}	$4,62 \times 10^{-3}$	$6,72 \times 10^{-3}$

La triple mutación A44D/D49P/A62L no parece afectar a la coordinación entre los movimientos de los lazos L5 y L1 (figura 57). Sin embargo, según la figura, regiones como los lazos de la cara norte, o aminoácidos como la Lys59, se ven afectados por estas mutaciones:

- Primer vector propio: a lo largo de este vector propio se producen desplazamientos en los lazos que forman la cara norte de la Pc (L1, L4, L6 y L8), y, con menor intensidad, los lazos L3, L5 y L7.
- Segundo vector propio: se observan movimientos concertados que involucran al lazo L5 y a aquéllos que forman parte de la cara norte de la Pc. En la hebra $\beta 6$, al igual que se observaba en el primer vector propio de Syn-V48I, la Lys59 se ve altamente afectada.

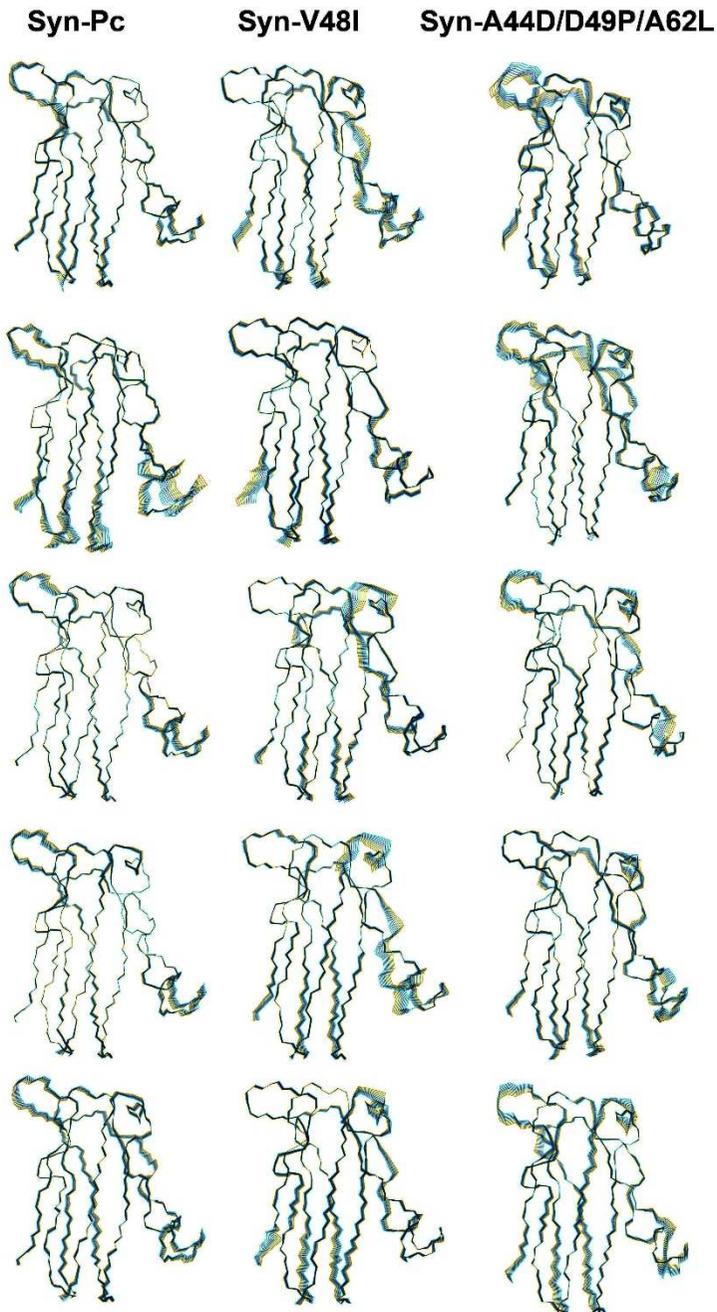


Figura 57. Representaciones gráficas de los movimientos concertados a lo largo de los cinco primeros vectores propios para Syn-Pc, Syn-V48I y Syn-A44D/D49P/A62L a 298K.

- Tercer vector propio: se observan movimientos concertados entre zonas muy discretas de la Pc: residuos Asp46 y Lys59, así como las secuencias comprendidas entre Gly8 y Ala13 (lazo L1), e His86 y Ala89 (lazo L8).
- Cuarto vector propio: Al igual que se observa en el segundo vector propio de este mismo mutante, movimientos en el lazo L5 afectan a la Lys59, aparte de al lazo L8.
- Quinto vector propio: A lo largo de este vector propio se producen movimientos concertados entre los lazos L1, L5, L6 y L8, así como en parte de las hebras β 4, β 7 y β 9.

4.6. Caracterización estructural de las plastocianinas mutantes mediante cristalografía de rayos X.

4.6.1. Obtención de los cristales

4.6.1.1. Syn-V48I

Tal como se explica en el apartado 3.4.1.2 de Materiales y Métodos, para la obtención de los cristales de Syn-V48I se probaron diversas condiciones.

Como punto de partida se usaron las condiciones que dieron mejores resultados con Syn-A44D/D49P/A62L, las cuales derivaron en el caso de Syn-V48I en la aparición de un precipitado proteico. El mismo resultado se obtuvo al disminuir la concentración de sulfato amónico en la solución precipitante hasta 2,7 M. Sin embargo, concentraciones de sal inferiores a esta dieron lugar a gotas claras.



Figura 58. Cristal obtenido para el mutante Syn-V48I de la plastocianina.

El cristal creció en condiciones de gota colgante en presencia de 2,7 M de sulfato amónico en 0,1 M de tampón fosfato sódico pH 7 como solución precipitante tras sembrar las gotas con microcristales de Syn-A44D/D49P/A62L, y a una temperatura de incubación de 19°C. La concentración de Pc usada fue de 2 mg mL⁻¹, en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.

Tras estos resultados se decidió usar microcristales de Syn-A44D/D49P/A62L como semillas para facilitar la nucleación de Syn-V48I [Bergfors, 2003]. Cuando gotas con 2 mg mL⁻¹ de proteína de Syn-V48I en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7, y 2,7 M de sulfato amónico en 0,1 M de tampón fosfato sódico pH 7 como solución precipitante se sembraron mediante *streak seeding* con una solución de semillas de Syn-A44D/D49P/A62L, crecieron cristales de un intenso color azul y con forma de punta de flecha (figura 58).

Estos cristales, al igual que sucede con los del triple mutante y contrario al silvestre [Romero *et al.*, 1998], permanecen estables en su forma oxidada durante días.

4.6.1.2. Pho-P49G/G50P

En Material Suplementario 8.4 se listan las condiciones testadas para la obtención de cristales de Pho-P49G/G50P. El posible cristal de la figura 59 creció en una única gota donde 1 µl de una solución de proteína 10 mg mL⁻¹ en agua ultrapura se mezcló en partes iguales con una solución precipitante que contenía 0,2 M cloruro de magnesio y 15% (p/v)

PEG 8000 en tampón 0,1 M cacodilato sódico pH 6,5 [Crowley *et al.*, 2008].

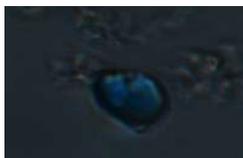


Figura 59. Cristal obtenido para el mutante Pho-P49G/G50P de la plastocianina.

El posible cristal creció en condiciones de *hanging drop* en presencia de 0,2 M de cloruro de magnesio y 15% (p/v) PEG 8000 en 0,1 M de cacodilato sódico pH 6,5, tras sembrar las gotas con microcristales de Syn-A44D/D49P/A62L, y a una temperatura de incubación de 19°C.

La gota obtenida se sembró con una solución de microcristales de Syn-A44D/D49P/A62L. Fueron necesarios 26 días de incubación. Lamentablemente el cristal se disolvió a los pocos días y no fue posible ni comprobar su calidad ni reproducir las condiciones.

4.6.2. Colección de datos de difracción y procesamiento.

4.6.2.1. Syn-V48I

La estructura de Syn-V48I fue resuelta mediante remplazamiento molecular usando la de Syn-A44D/D49P/A62L disponible en la *Protein Data Bank* con código pdb 1PCS. Las dimensiones de la celda unidad, detalladas en la tabla 13, se ajustan a un grupo espacial C2. La unidad asimétrica estaba compuesta por una única molécula de Pc.

Durante la colección de datos se observó cambio de color en el cristal, lo cual es indicativo de fotoreducción.

Tabla 13. Estadísticas correspondientes al proceso de la colección de datos y procesamiento

Parámetro	Valor
Grupo espacial	C2
Dimensiones de la celdilla unidad	
a (Å); b (Å); c (Å)	59,490; 32,970; 41,810
α (°); β (°); γ (°)	90,00; 117,16; 90,00
Rango de resolución (Å)	1,6 - 37,2 (1,7-1,6)
Reflexiones totales	34598 (5760)
Reflexiones únicas	18356 (3108)
Redundancia o multiplicidad media	1,88 (1,85)
R_{meas} o R_{rim} (%)	12,5 (103,5)
$\langle I \rangle / \langle \sigma \rangle$	7,65 (1,41*)
Compleitud (%)	97,9 (98,6)

En paréntesis se indican los datos de la shell con mayor resolución.

* $\langle I \rangle / \langle \sigma \rangle = 2,28$ para una resolución de 1,7.

Redundancia = n° reflexiones totales / n° reflexiones única

R_{merge} independiente de la redundancia

$$R_{\text{meas}} = R_{\text{rim}} = \frac{\sum_h (N_h / N - 1)^{1/2} \sum_{i=1}^{N_h} |I_{(ih)} - \overline{I_{(h)}}|}{\sum_h \sum_{i=1}^{N_h} I_{(ih)}}$$

Siendo $I_{(ih)}$ la intensidad de las i th observaciones para la reflexión i , $\overline{I_{(h)}}$, la media de las intensidades de todas las observaciones de la reflexión i , y N_h , la redundancia o número de veces que la reflexión i ha sido medida.

Aunque la máxima resolución obtenida fue de 1,6 Å, la razón señal/ruido ($\langle I \rangle / \langle \sigma \rangle$) es inferior a 2, exactamente 1,41. Por tanto, se sitúa

como límite inferior una resolución de 1,7 Å, con valores de $\langle I \rangle / \langle \sigma \rangle$ igual a 2,28, una redundancia de 1,87, R_{meas} igual a 63,1% y una completitud del 98,9 % para esa resolución [Wlodawer *et al.*, 2008]. La tabla 14 incluye las estadísticas correspondientes al proceso de colección de datos y al procesamiento para la máxima resolución (1,6 Å).

El refinamiento fue realizado hasta que se redujo a un valor final para $R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ de 0,1664/ 0,1974. En la tabla 14 se resumen las estadísticas correspondientes a dicho proceso.

Tabla 14. Estadísticas correspondientes al proceso de refinamiento

Parámetro	Valores
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	0,1664/0,1974
Nº de átomos	
proteína	744
solvente	108
Cl ⁻	2
SO ₄	10
RMSD respecto al ideal	
Longitud de enlaces (Å)	0,012
Ángulos de enlaces (°)	1,40
Wilson B-factor (Å ²)	10,46
Residuos en Ramachandran plot	
Favorables	69 (84,1%)
Valores atípicos	0 (0,0 %)

La estructura final se compone de un total de 860 átomos, de los cuales 744 constituyen los 98 aminoácidos de la Pc, y 108 son moléculas de agua. Aparte, aparecen 2 iones Cl^- y 4 SO_4^{2-} .

En la figura 60 se muestran las regiones correspondientes a las secuencias entre los residuos 7 y 11 y 44 y 50, los cuales fueron eliminados del modelo durante el refinamiento debido a que se observaron discrepancias en el mapa Fo-Fc. Entre dichos residuos se encontraba el mutado en Syn-V48I. En la figura 60B se muestra el residuo Ile48 de Syn-V48I al final del proceso con el mapa de contorno ajustado a $0,22\sigma$ ($\text{e}/\text{Å}^3$).

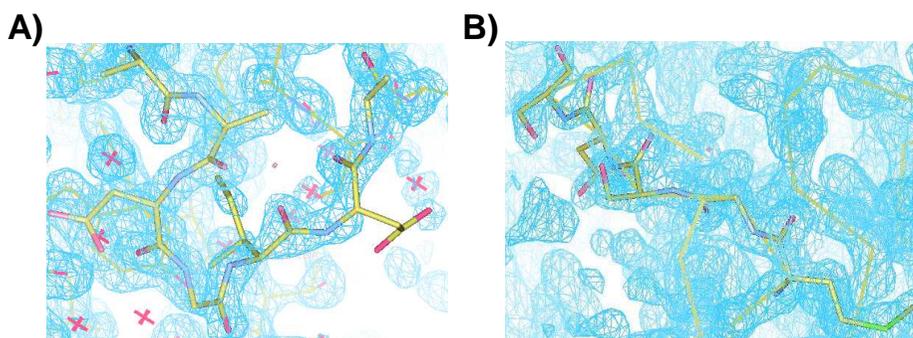


Figura 60. Detalles de los lazos L1 y L5 de Syn-V48I

Se muestran las secuencias comprendidas entre los residuos 7 y 11 (lazo L1)(**A**) y 44 y 50 (lazo L5) (**B**), que fueron eliminadas en la etapa temprana del refinamiento como conjunto de datos independientes para la validación posterior del refinamiento. Los mapas de contorno $2\text{Fo}-\text{Fc}$ se representan a $0,6$ ($\text{e}/\text{Å}^3$) para el lazo L5

El centro de cobre de la Pc quedó totalmente definido en la estructura final, tal como se observa en la figura 61.

En la figura 62 se muestran la estructura de Syn-V48I alineada con la de Syn-A44D/D49P/A62I, (código pdb: 1PCS; Romero *et al.*^a, 1998) usada como modelo para el remplazamiento molecular. Ambas

estructuras son casi idénticas. De hecho el RMSD global entre ambas estructura es de 0,048 nm. Sin embargo, a la altura del lazo L5, precisamente donde se sitúa la mutación V48I, el RMSD per residuo indica regiones con mayores diferencias (datos no mostrados). La mayor de ellas se encuentra en el residuo 49, el cual presenta un RMSD entre ambas Pc de 0,16 nm.

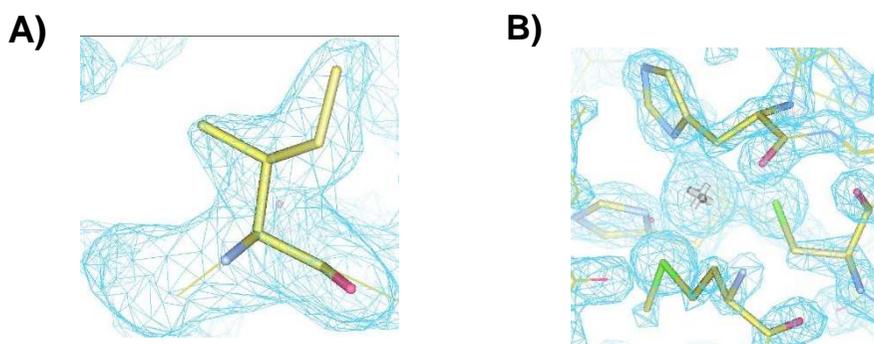


Figura 61. Detalle de la Ile48 y el centro de cobre de Syn-V48I

Los mapas de contorno 2Fo-Fc se representan a $0,22 \sigma$ (electrón/Å³) y El mapa de contorno 2Fo-Fc se representa a 1σ (electrón/Å³).

El ligando del cobre que más difiere entre ambas estructuras es la Cys83, con un RMSD de 0,043 nm. Las distancias entre cada uno de los ligandos y el cobre para ambas estructuras se muestran en la tabla 15.

Según Chaboy et al., 2011, la estabilidad de las plastocianinas está relacionada con la longitud del enlace entre el cobre y el azufre de la cisteína que lo coordina, de forma que a menor Tm de la Pc, mayor longitud de dicho enlace. En el caso de los mutantes Syn-V48I y Syn-A44D/D49P/A62L, la ínfima diferencia entre la longitud de sus respectivos enlaces Cu-S_{Cys} (apenas 0,006 nm) se correlaciona con unos valores Tm prácticamente idénticos (tabla 16). Este hecho unido a que tanto sus respectivas Tm como las longitudes de sus enlaces son intermedios a los

mostrados por Pho-Pc y Syn-Pc, corroboran la hipótesis planteada en dicho trabajo.

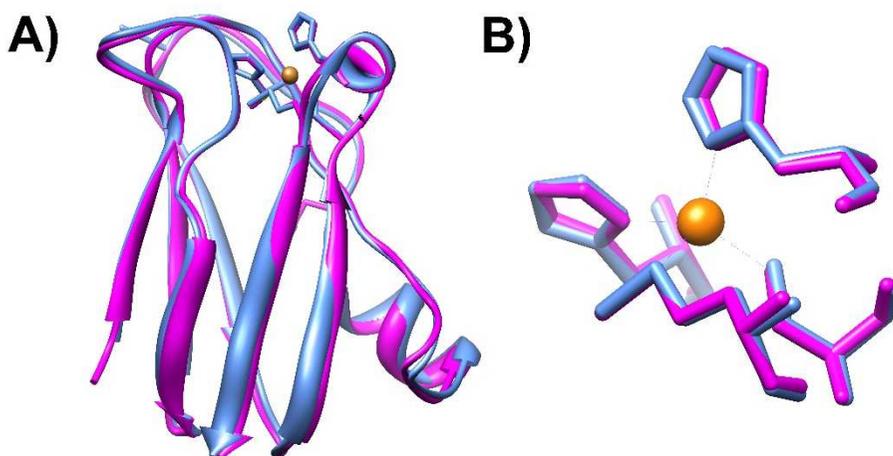


Figura 62. Alineamiento de las estructuras (A) y de los centros metálicos (B) de Syn-V48I y Syn_A44D/D49P/A62L.

En azul se muestra la estructura de Syn-V48I y en magenta la de Syn_A44D/D49P/A62L. El cobre se colorea en marrón.

Tabla 15. Comparación de las longitudes de los enlaces entre el cobre y sus ligandos entre Syn-V48I y Syn-A44D/D49P/A62L.

Las longitudes de los enlaces han sido obtenidas usando el programa Chimera y las estructuras correspondientes al pdb 1PCS para Syn-A44D/D49P/A62L (Romero *et al.*, 1998) y a la obtenida para Syn-V48I en el presente trabajo.

	His 39	Cys83	His86	Met91
Syn-V48I	2,103	2,187	2,046	2,810
Syn-A44D/D49P/A62L	2,032	2,254	2,073	2,651

Tabla 16. Valores de T_m y longitud del enlace Cu-S_{Y,Cys} en distintas plastocianinas.

El orden se corresponde a valores decrecientes de T_m . Los valores de T_m para las Pc oxidadas y reducidas se corresponden a los obtenidos por CD a pH 7 en este trabajo (figuras 35 y 36). La longitud de los enlaces Cu-S_{Y,Cys} han sido obtenidos usando el programa Chimera y las estructuras correspondientes a los pdb 1baw para Pho-Pc (Bond *et al.*, 1999), 1PCS para Syn-A44D/D49P/A62L (Romero *et al.*, 1998) y 1JXD para Syn-Pc (Bertini^a *et al.*, 2001), así como la obtenida para Syn-V48I en este trabajo.

	T_m (°C)		Longitud Cu-S _{Y,Cys}
	Pc oxidada	Pc reducida	
Pho-Pc	76,56	73,88	2,10
Syn-V48I	66,97	73,83	2,19
Syn-A44D/D49P/A62L	66,65	73,12	2,25
Syn-Pc	63,07	72,01	2,28

La mutación V48I en Syn-Pc fue introducida con la intención de reducir el hueco hidrofóbido entre el lazo L5, donde se localiza este residuo, y el barril de la proteína (figura 14, apartado 4.1.1). Tal como se observa en la figura 63, donde se compara el bolsillo para Syn-Pc (63A) y para su mutante (63B), realmente se ha conseguido el efecto deseado. De hecho, el volumen de dicho bolsillo en Syn-Pc (39,5 Å³) es 3,5 veces superior al del mutante (11 Å³).

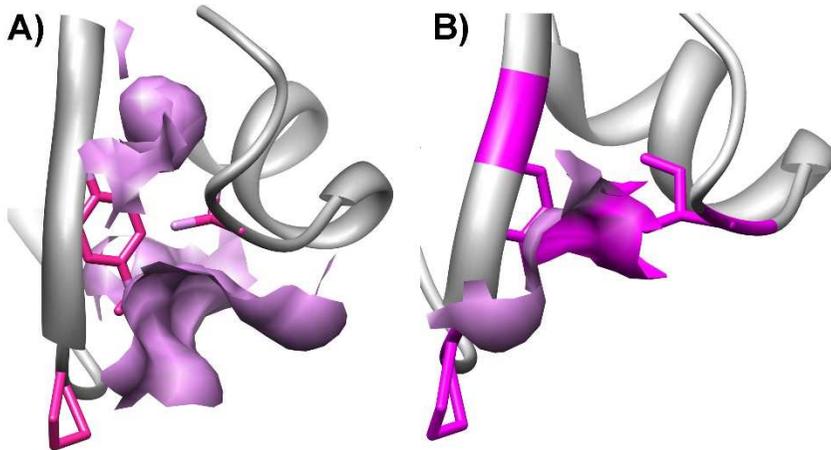


Figura 63. Detalle de la interfase entre los lazos L5 y L7 de Syn-Pc (A) y Syn-V48I (B).

Las cavidades hidrofóbicas han sido calculadas usando la aplicación “CASTp” [Binkowski *et al.*, 2003]. Se muestran en color magenta los residuos implicados en la formación de la agrupación hidrofóbica entre el lazo L5 y el barril.

5. DISCUSIÓN

En las últimas casi cuatro décadas, la elucidación de los factores que determinan la mayor estabilidad frente a la temperatura de las proteínas hipertermófilas y termófilas respecto a sus homólogas mesófilas se ha convertido en el tema central de multitud de estudios científicos y revisiones [Perutz y Raidt, 1975; Matthews *et al.*, 1987; Querol *et al.*, 1996; Szilagyí y Zavodszky, 2000; Luke *et al.*, 2007; Chan *et al.*, 2011; Sen y Nilsson, 2012; Gromiha *et al.*, 2013].

El principal inconveniente para establecer unas reglas generales es el hecho de que cada familia proteica adopta mecanismos propios para adaptarse a las altas temperaturas. Sin embargo, es claro el hecho de que dicha diferencia no implica a fuerzas diferentes a las que gobiernan la estabilidad de cualquier proteína, sino a una diferente redistribución de dichas interacciones intramoleculares que permiten la adaptación a los diversos ambientes.

Entre dichos trabajos cabe destacar aquellos en los que se usa como modelo experimental una metaloproteína, en las que el centro metálico juega un papel primordial en el mantenimiento de la estabilidad proteica. En este sentido las plastocianinas de las cianobacterias mesofílica *Synechocystis sp.* PC6803 (Syn-Pc) y termofílica *Phormidium laminosum* (Pho-Pc) suponen un reto añadido: Pho-Pc no sólo es más estable que Syn-Pc, sino que el estado redox del centro de cobre afecta a dicha estabilidad. De hecho, Pho-Pc muestra una T_m de 83,1 °C y de 76,4 °C para la forma oxidada y reducida, respectivamente, a pH 5,5 y aerobiosis [Feio *et al.*, 2004], mientras que para Syn-Pc estos valores son de 66,1 °C y de 71,9 °C respectivamente y en las mismas condiciones [Feio *et al.*, 2006].

Estudios comparados entre ambas proteínas [Muñoz-López^b *et al.*, 2010] han señalado las diferencias en contenido en puentes de hidrógeno y salinos en la denominada cara este de la Pc, junto a la agrupación hidrofóbica presente entre los lazos L5 y L7, como las

determinantes de la mayor estabilidad de Pho-Pc con respecto a Syn-Pc, y su diferente dependencia con el estado redox. De hecho, mutaciones en esta región de Pho-Pc no sólo han supuesto una pérdida de estabilidad térmica, sino que, además, el doble mutante Pho-P49G/G50P muestra, a pH 6, para su forma reducida una T_m (72,5 °C) superior a la de su forma oxidada (69 °C), tal y como sucede en Syn-Pc [Muñoz-López^a *et al.*, 2010].

El papel del centro metálico en el mantenimiento de la estabilidad de ambas Pc queda vigente en el hecho de que la eliminación del ion cobre supone una pérdida de entre 20 y 25 °C en los valores de T_m para ambas proteínas silvestres [Feio *et al.*, 2004; Feio *et al.*, 2006], además del efecto que su estado de oxidación tiene sobre la estabilidad de la proteína. Análisis de XAS y XANES de Syn-Pc, Pho-Pc y Pho-P49G/G50P condujeron a la conclusión de que una mayor distancia entre el átomo de cobre y el azufre tiolato de la cisteína que lo liga se correlaciona con una menor T_m de la forma oxidada en las Pc [Muñoz-López^b *et al.*, 2010; Chaboy *et al.*, 2011].

Por tanto, para el presente trabajo se han diseñado una serie de mutaciones puntuales sobre Syn-Pc a partir de la información acumulada con el estudio comparativo con su homóloga termofílica que han permitido el análisis de diferentes efectos sobre la termoestabilidad de estas cupredoxinas.

La mayor parte de dichas mutaciones fueron introducidas a diferentes alturas de la denominada cara este de la proteína (figuras 14 a 19; apartado 4.1), región relacionada con la diferencia de estabilidad entre Syn-Pc y su homóloga de *P. laminosum* [Muñoz-López^a *et al.*, 2010; Muñoz-López^b *et al.*, 2010; Chaboy *et al.*, 2011]. A3F fue el único cambio realizado fuera de esta región (figura 20). Esta mutación se introdujo con la finalidad de restringir la motilidad e incrementar la estabilidad de las

hebras $\beta 1$ y $\beta 2$ en Syn-Pc. El mutante inverso F3A de Pho resultó más inestable que la Pc silvestre.

Estas mutaciones fueron analizadas de forma complementaria con el programa CUPSAT. Sin embargo, nuestra experiencia indica que es una aplicación que puede resultar útil como apoyo o herramienta suplementaria, nunca como único criterio para seleccionar o descartar alguna mutación. En un reciente estudio [Kepp, 2014] la idoneidad de CUPSAT fue analizada sobre otra proteína de cobre: la Superóxido Dismutasa 1 humana. Según dicho trabajo, la precisión de las predicciones de CUPSAT depende en gran medida de la resolución de la estructura cristalina usada, y tendía a ser demasiado desestabilizante en comparación con los resultados experimentales. Este efecto se acentuaba en el caso de modificaciones cercanas al metal ($<8 \text{ \AA}$), debido al hecho de que los iones metálicos distorcionan la geometría típicamente asociada a los aminoácidos. Por tanto, no parece que esta herramienta sea efectiva en el caso de metaloproteínas.

Todos los mutantes diseñados demostraron ser estables a temperatura ambiente, tal como se demuestra por los RMSD y RMSF a lo largo de las trayectorias a 298 K (figura 23, apartado 4.2) y por los espectros de CD en el UV lejano realizados a 20 °C (figura 25, apartado 4.3.2.1).

El contenido en estructura secundaria a temperatura ambiente se ve alterado de forma muy leve por las mutaciones introducidas en Syn-Pc (figura 25, apartado 4.3.2.1). No obstante, no consideramos que dichas perturbaciones tengan efecto sobre la termoestabilidad.

Además, a pesar de que las mutaciones fueron introducidas en la región implicada en la formación de los complejos de las Pcs con sus dianas fisiológicas, ninguno de los cambios parece afectar a la función de la Pc como transportador de electrones (figura 44, apartado 4.3.2.4).

5.1. Efecto de las mutaciones sobre la dinámica de la Pc a temperatura ambiente

Aunque a temperatura ambiente no se hayan encontrado grandes diferencias a nivel de estructura secundaria (figuras 49-52, apartado 4.5.1.3), sí existen evidencias de una afectación de las proteínas en cuanto a su motilidad (figuras 44 a 46, apartado 4.5.1.2.1). En Syn-Pc el centro metálico produce una tensión sobre la matriz proteica que restringe la motilidad de sus ligandos, y con ello, la de los lazos de la cara norte. Este efecto ya fue evidenciado por Arcangeli, *et al.* en la Pc de álamo [Arcangeli^a *et al.*, 2001]. Como consecuencia, al eliminar el Cu de la estructura los lazos L1 y L8, así como las hebras $\beta 6$ y $\beta 7$ y parte de la hélice en la apo-Pc, incrementan su motilidad. El análisis de componentes principales denota los movimientos concertados existentes, principalmente, entre el lazo L5 con L1. Estos resultados también son coherentes con los obtenidos para la Pc de álamo [Arcangeli *et al.*^a, 2001].

La mutación V48I a temperatura ambiente parece relajar esta tensión del centro metálico. Esto queda evidenciado por el hecho, por una parte, de que el patrón de RMSF de la holo-Pc de Syn-V48I es más similar a la de la apo-Pc que a la holo-Pc de Syn-Pc, con la excepción de una considerable mayor motilidad del lazo L1 en la apo-Pc de Syn-Pc. Además, la eliminación del cobre sólo induce grandes cambios en los lazos L1 y L8 del mutante.

Tal como se observa en el análisis de componentes principales (figuras 57, apartado 4.5.1.4), la mutación V48I rompe la correlación de los movimientos de los lazos L1 y L5 que exhibe Syn-Pc. Como resultado, se reduce la motilidad del lazo L4 con el que L1 interacciona mediante un puente salino entre Asp10 y Asn34. En Syn-V48I la motilidad de L5 pasa a correlacionarse con la de L8 y la hebra $\beta 6$ a altura de la Lys59. A su

vez, los movimientos de L8 se coordinan con los de Ala65 y Asn40, la cual establece un puente de hidrógeno con el azufre de la Cys83, ligando del cobre.

La mutación simple G60A no afecta en gran medida a Syn-Pc, a excepción de una mayor motilidad del Asp49 en la holo-Pc. Sin embargo, en el doble mutante Syn-V48I/G60A limita el movimiento de la hebra $\beta 6$ entorno a la Lys59 de Syn-V48I, y la motilidad del lazo L8 se ve altamente incrementada.

La mayor motilidad que la holo-Pc de Syn-A44D/D49P/A62L experimenta en los lazos L1, L6 y L8, así como en la hebra $\beta 6$ respecto a Syn-Pc se ve reducida en el momento que el centro metálico es desmantelado. Al igual que en Syn-Pc, los movimientos de los lazos L1 y L5 se correlacionan, del mismo modo que entre dichos lazos y L6 y L8, y la Lys59.

En las diversas Pc, la Leu12, localizada precisamente en L1, se encuentra altamente conservada, y se considera crucial en el proceso de reconocimiento de su pareja fisiológica, al igual que la cara este. Por otra parte, el lazo L8 alberga a tres de los ligandos del cobre Cys83, His86 y Met91, así como a residuos hidrofóbicos considerados importantes para la transferencia electrónica. Por tanto, diferencias en la movilidad y correlaciones de estas regiones pueden estar relacionadas con alteraciones en la cinética de la reacción de transferencia electrónica [Arcangeli *et al.*^b, 2001; Díaz-Quintana, 2002]. A pesar de ello, no parece que se afecte la eficiencia de la reacción en el caso de los mutantes aquí ensayados (figura 44, apartado 4.3.2.4).

5.2. Efecto de la temperatura sobre los mutantes de Syn-Pc. El modelo en tres estados.

Estudios preliminares por fluorimetría diferencial de barrido (DSF; figura 45, apartado 4.4.1) de la desestabilización proteica frente al incremento de temperatura permitieron separar aquellos mutantes que inducían una estabilización apreciable de la proteína silvestre (Syn-V48I, Syn-G60A, Syn-V48I/G60A y Syn-A44D/D49P/A62L) de aquellos que o prácticamente no mostraban cambios aparentes (Syn-T52I, Syn-T52Y, Syn-V42I) o resultaron menos estables (Syn-K59S, Syn-A3F, Syn-L56I). Sin embargo, esta técnica sólo resultó útil a la hora de seguir el desplegamiento térmico de las formas oxidadas.

Un análisis más detallado tanto de las formas oxidada como reducida de cada proteína, realizado por espectroscopía de fluorescencia y de dicroísmo circular en el UV permitió, en primer lugar, asegurar dichos mutantes estabilizantes. Además, se observa como todos los mutantes reducen la distancia en cuanto a estabilidad entre las formas oxidadas y reducidas, aunque por espectroscopía de fluorescencia este efecto es más variable que por CD, donde la diferencia en T_m entre ambas formas redox ronda los 6,5 °C.

Cabe destacar entre todos los mutantes a Syn-V48I, en el cual la diferencia en T_m entre ambas formas redox se reduce hasta poco más de 1 °C (por espectroscopía de fluorescencia) debido a un incremento en estabilidad experimentado por la forma oxidada. Sin embargo, Syn-G60A experimenta una caída en la T_m de su forma reducida. En el doble mutante Syn-V48I/G60A el efecto combinado de ambas mutaciones da lugar a una Pc que es, independientemente de su estado redox y de la técnica usada para su análisis, más estable que Syn-Pc. La triple mutación A44D/D49P/A62L también incrementa la estabilidad de ambas formas redox.

El análisis espectroscópico del desplegamiento térmico de Syn-Pc y los mutantes estudiados en este trabajo indican una ruta de desplegamiento en, al menos, tres estados (apartado 4.4.4, figura 37) [Sancho, 2013] en vez del de dos estados descrito para Pho-Pc [Feio *et al.*, 2004; Muñoz-López^a *et al.*, 2010] y aplicado previamente a Syn-Pc [Feio, 2006]. Ya en estudios previos, Milardi *et al.* (1998), Sandberg *et al.* (2003), Guzzi *et al.* (2004) y Shosheva *et al.* (2005) se obtuvieron resultados de desplegamiento para las Pc de álamo, de espinaca y de *Arabidopsis* que no eran compatibles con el modelo de dos estados.

De forma general en los mutantes analizados en este trabajo, la proteína sufriría en primer lugar una desestabilización del barril, permitiendo la entrada de moléculas de agua en el interior del mismo y la modificación del entorno del Trp31, mientras que la pérdida de estructura secundaria se produciría de una forma más gradual. Como consecuencia, a medida que se incrementa la temperatura se iría acumulando un intermedio en el cual, aún conteniendo bastante estructura secundaria, el núcleo de la Pc estaría en contacto con el solvente.

En los casos particulares de las formas oxidadas de Syn-V48I y Syn-A44D/D49P/A62L, las T_m calculadas a partir de los ensayos de desnaturalización térmica por espectroscopía de fluorescencia y CD (figura 38, apartado 4.4.4) fueron prácticamente iguales entre sí. Sin embargo, las curvas de desnaturalización no eran superponibles. Por tanto, en estas formas proteicas deben afectarse otros parámetros termodinámicos: ΔH o ΔC_p .

Mediante dinámica molecular se ha analizado la ruta de desplegamiento y la evolución de la estructura secundaria a 498 K de Syn-Pc, Syn-V48I y Syn-A44D/D49P/A62L en sus estados oxidado (apartado 4.5.1.3.2, figuras 52 y 53). El análisis combinado de los resultados obtenidos mediante técnicas espectroscópicas y dinámica

molecular permite profundizar en el modo en que estas proteínas se despliegan al incrementar la temperatura.

Syn-Pc comienza a perder estructura secundaria a alrededor de los 50 °C, iniciándose por las hebras $\beta 5$ y $\beta 6$, lo que llevaría a la desestabilización de la $\beta 7$. Esta última hebra se localiza anexa a la hebra $\beta 4$, que alberga al Trp31. Por tanto, el desplegamiento de la cara este y de la hebra $\beta 7$ conduciría a la exposición del fluoróforo al solvente. Como consecuencia, el desplegamiento seguido por espectroscopía de fluorescencia empieza poco después del monitorizado por CD, sobre los 55 °C, y concluye con un incremento de temperatura de unos 9 °C (64 °C). Sin embargo, la Pc silvestre no pierde totalmente su estado nativo hasta los 74 °C.

En Syn-V48I la pérdida de estructura secundaria comienza sobre los 57,5 °C, posiblemente con la pérdida de las hebras $\beta 5$ y $\beta 6$. Sin embargo, el desplegamiento de la hélice α parece llevar a la recuperación de los elementos de hebra β de la cara este, lo que permite salvaguardar la integridad del barril y, con ello, el entorno del Trp31. No es hasta que se incrementa la temperatura hasta los 66 °C cuando se inicia la pérdida de estabilidad del entorno del Trp31, posiblemente por la afectación de las hebras $\beta 7$, $\beta 5$ y $\beta 6$. Esto junto a la posterior pérdida de estructura secundaria de parte de las hebras $\beta 4$, $\beta 8$ y $\beta 9$, explicaría el perfil tan escarpado de la rampa obtenida por espectroscopía de fluorescencia. En este punto, sin embargo, la Pc sigue conteniendo un alto grado de estructura secundaria, y no es hasta los 75 °C que no se alcanzaría el estado totalmente desplegado.

Por tanto, la mutación V48I, localizada en el lazo L5, retarda la pérdida inicial de estructura secundaria, y protege a la Pc de la pérdida de las hebras de la cara este. Debido a ello se consigue postergar la desnaturalización del barril. Sin embargo, una vez iniciado el

desplegamiento, éste sucede a una mayor velocidad que en la proteína silvestre. Del comportamiento de Syn-Pc y de este mutante se deduce la importancia que tiene mantener la estabilidad de la hebra $\beta 7$ para conservar la integridad del barril.

En Syn-A44D/D49P/A62L el desplegamiento proteico sigue un proceso muy gradual, independientemente que se monitorice por CD o fluorescencia. A diferencia de Syn-Pc y Syn-V48I, la exposición del Trp31 sucede a una temperatura ligeramente inferior que el inicio de la pérdida de hebras β . Además, según los datos de espectrometría, la proteína pierde completamente su contenido en estructura secundaria mientras que el barril proteico aún mantiene cierta compactación. Según las simulaciones de estructura secundaria a alta temperatura, este mutante no sufre una pérdida de estructura secundaria general tan evidente como Syn-Pc y Syn-V48I. Este hecho es también válido para las hebras $\beta 5$, $\beta 6$ y $\beta 7$, quedando entonces el Trp31 más protegido del ambiente hidrofílico en el triple mutante que en sus homólogas. Aunque en este mutante también se observa la desorganización de la hélice α , no resulta evidente que ello afecte a la estabilidad de las hebras β de la cara este.

Por tanto, la mutación múltiple A44D/D49P/A62L, también tiene un efecto protector frente a la pérdida general de estructura secundaria y, más concretamente, de la cara este, y, con ello, de la hebra $\beta 7$. En este mutante el desplegamiento debe seguir una ruta diferente al de Syn-Pc y Syn-V48I, de forma que el entorno del Trp31 queda protegido hasta que no se produce la pérdida total de estructura secundaria.

La mayor estabilidad de los mutantes Syn-48I y Syn-A44D/D49P/A62L a alta temperatura se puede relacionar con una serie de efectos sobre la motilidad y la evolución de la estructura secundaria a 498K. Así, a alta temperatura estos mutantes experimentan una menor motilidad de la hebra $\beta 6$, pero una mayor de la hélice α y los lazos L1 y

L8 (figuras 27A y 28, apartado 4.2.2.2.2 de Resultados). A esto le acompaña la pérdida total de la hélice α y de la hélice 3_{10} . Sin embargo, los mutantes mantienen mejor el contenido en estructura secundaria de las hebras $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 6$.

5.3. Aportación del centro metálico a la estabilidad

El centro de cobre juega un papel primordial en la estabilidad de la Pc [Feio *et al.*, 2006], así como en otras cupredoxinas y metaloproteínas.

Para poder determinar la aportación que el centro de cobre tiene a la estabilidad de cada mutante estabilizante de Syn-Pc se procedió a la obtención de las T_m de las formas apo (figuras 35 y 36; apartado 4.4.3). Para la Pc silvestre los valores obtenidos son ligeramente inferiores a los descritos en la bibliografía, posiblemente debido a las diferentes condiciones de experimentación. Sin embargo, las diferencias con las formas holo concuerdan con trabajos anteriores [Feio *et al.*, 2006].

La aportación del centro de cobre a la estabilidad varía entre las distintas mutaciones. De hecho, mientras que la estabilización experimentada por Syn-V48I se debe fundamentalmente al entorno del cobre, con poca contribución de la matriz proteica, en Syn-G60A es la estabilización de la matriz proteica la principal responsable de la mayor estabilidad de esta proteína. Es más, la mutación introducida afecta de forma negativa a la estabilidad del centro metálico.

La enorme estabilización que induce la triple mutación A44D/D49P/A62L se debe sin duda al efecto del centro de cobre. De hecho, a pesar de que las mutaciones introducidas inducen la desestabilización de la matriz proteica, las formas holo muestran valores de T_m superiores a Syn-Pc.

Los resultados de la evolución de la estructura secundaria obtenida a partir de los ensayos de dinámica molecular a alta temperatura (figuras 53B y 55; apartado 4.5.1.3.2) apoyan los derivados del análisis del desplegamiento térmico de las formas apo de Syn-Pc, Syn-V48I y Syn-A44D/D49P/A62L que se realizaron mediante CD (figuras 35 y 36, apartado 4.4.3). Las formas apo de Syn-Pc y Syn-V48I mostraron valores de T_m y perfil de sus curvas de desnaturalización muy similares. De hecho, ambas moléculas sufren una pérdida en contenido de estructura secundaria muy similar. Sin embargo, la simulación de la apo-Pc de Syn-A44D/D49P/A62L mostró una rápida y masiva pérdida de estructura secundaria al poco del inicio del ensayo, denotando una muy baja estabilidad bajo las condiciones ensayadas.

Llama la atención que a 498 K (figuras 33 a 35, apartado 4.2.2.3.2 de Resultados) los comportamientos de las apo-Pc son contrarios a los de sus respectivas formas holo, de forma que las apo de los mutantes recuerdan a la holo-Pc del silvestre, y viceversa. Es más, ambos mutantes en sus formas apo muestran una mayor desestabilización de sus estructuras secundarias que la respectiva apoproteína de Syn-Pc. Esta diferencia es también evidente al observar los RMSFs a 498 K (figuras 27 y 28, apartado 4.2.2.2.2 de Resultados), donde se observa que la mayor diferencia entre formas apo y holo y entre mutantes y silvestre radica en la cara este.

5.4. Alteración del centro metálico y relación entre estabilidad del centro de cobre y potencial redox.

Variaciones en la longitud de los enlaces entre el cobre y los ligandos de este están relacionados con variaciones en los potenciales redox en las proteínas de cobre tipo-1 [Li *et al.*, 2004; Si y Li, 2009]. Por tanto, los diferentes valores obtenidos para los mutantes de Syn-Pc en

sus potenciales redox (figura 27; apartado 4.3.2.2) pueden ser indicativos de una alteración de las interacciones entre el ion Cu y la primera esfera de ligandos.

Los espectros de CD en el visible (figura 30; apartado 4.3.2.4) apoyan esta hipótesis. Las diferencias encontradas en la comparación de los espectros de CD de Syn-Pc con sus mutantes pueden relacionarse con las fluctuaciones atómicas (figuras 44 y 46; apartado 4.5.1.2.1) y los movimientos concertados a temperatura ambiente de los lazos que albergan los residuos ligandos del cobre (figura 57; apartado 4.5.1.4). De hecho, el triple mutante Syn-A44D/D49P/A62L experimenta la mayor desviación de su espectro con respecto al del silvestre, con diferencias en las transiciones de los cuatro ligandos del cobre. Este hecho se relaciona con la mayor fluctuación de los lazos L4 y L8 en este mutante. De la misma forma, este mutante experimenta movimientos concertados entre los lazos de la cara norte, con mayor intensidad en L4 y L8, lo que explicaría también estas desigualdades.

Syn-V48I muestra leves diferencias en la transición correspondiente a la Cys83, alojada en el lazo L8. El lazo L8 presenta un mayor RMSF que el silvestre, así como movimientos concertados con toda la cara este.

Syn-G60A es el mutante cuyo espectro de CD difiere en menor medida con el del silvestre. De este mutante no se disponen datos de PCA. Sin embargo, es también evidente mediante los datos de RMSF que la mutación G60A no altera la flexibilidad de los lazos L4 y L8.

En la estructura de Syn-V48I obtenida mediante cristalografía de rayos X se observa cómo el entorno del cobre se modifica ligeramente. Es más, la longitud del enlace entre el azufre de la Cys83 y el cobre y su relación con la T_m corrobora lo expuesto por Chaboy *et al.*(2011).

Modificaciones puntuales en la matriz proteica conducen a alteraciones que afectan a los enlaces entre el cobre y los ligandos de este, modificando no sólo la estabilidad del mismo, y, por tanto también la de las formas holo de la Pc [Muñoz-López^a *et al.*, 2010; Chaboy *et al.*, 2011], sino, también a su potencial redox. Es más, se ha encontrado una relación directa entre la estabilidad del centro de cobre y el potencial redox de la Pc para Syn-Pc y aquellos de sus mutantes que experimentan un incremento en sus T_m con respecto al silvestre (figura 41; apartado 4.4.6.1). De hecho, entre los mutantes estabilizantes, Syn-G60A y Syn-V48I/G60A, para los que se ha demostrado una desestabilización del centro metálico con respecto a Syn-Pc (figura 39; apartado 4.4.5), mostraron potenciales de óxido-reducción inferiores a este. Sin embargo, Syn-V48I y Syn-A44D/D49P/A62L, cuyos incrementos de T_m se deben fundamentalmente a un incremento de la estabilidad del centro metálico, mostraron los potenciales redox más elevados. Por tanto, los datos sugieren una relación entre los cambios en los potenciales redox de Syn-Pc y la estabilidad de su centro metálico.

6. CONCLUSIONES

Conclusiones

1. El análisis de la estabilidad térmica de la proteína de cobre plastocianina en la cianobacteria mesófila *Synechocystis sp* PCC 6803 ha permitido detectar un estado intermedio en la ruta de desplegamiento de la forma natural y de varios mutantes, a diferencia de lo observado en estudios previos con la plastocianina de la cianobacteria termófila *Phormidium laminosum*.
2. Se ha logrado estabilizar la plastocianina de *Synechocystis sp* PCC 6803 mediante mutaciones la región flexible que comprende los residuos 44 a 56. En determinados mutantes, los criterios comunes utilizados para la estabilización de proteínas y corroborados mediante predicción informática han resultado ser aplicables con la apoproteína, pero no con la holoproteína. En concreto, la mutación G60A en la hebra $\beta 6$ (residuos 58 – 62), que en principio debería permitir una mayor estabilidad, resulta en la desestabilización de la holoproteína.
3. Las diferencias encontradas entre las estabilidades térmicas de las formas holo- y apo- de los mutantes indica cierta cooperatividad entre el centro de cobre y la región flexible comprendida entre los residuos 44 y 56.
4. Según los cálculos de dinámica molecular, existen movimientos concertados entre dicha región flexible y los lazos que definen el área hidrófoba en la superficie de la proteína localizada en el entorno del centro metálico y, entre ellos, el lazo C-terminal, que contiene tres de los ligandos del metal.
5. Asimismo, las mutaciones en la región flexible comprendida entre los residuos 44 y 56 conducen a alteraciones en la dinámica de dichos lazos.

6. Se ha resuelto la estructura del mutante V48I de la plastocianina de *Synechocystis sp* PCC 6803 utilizando datos de difracción de rayos X a 1,6 Å de resolución, sin que se haya podido observar diferencias sustanciales con la especie nativa en cuanto a la estructura de su cadena principal.

Conclusions

1. The analysis of the thermal stability of the copper protein plastocyanin from the mesophyll cyanobacteria *Synechocystis sp* PCC 6803 reveals an intermediate state for the unfolding pathway. The intermediate is observed for the wild-type and several recombinant mutants. This contrasts with former results regarding plastocyanin from the thermophilic cyanobacteria *Phormidium laminosum*.
2. Plastocyanin from *Synechocystis sp* PCC 6803 has been successfully stabilized by mutations on the flexible region spanning residues 44 to 56. For a set of mutants, common criteria to stabilize proteins and informatics tools were effective to stabilize the apo form, but not for the holoprotein. Specifically, mutation G60A was predicted to stabilize the protein, whereas it unstabilizes the holoprotein.
3. The differences found between the thermal stabilities of the mutant holo- and apo- forms indicates cooperativity between the copper site and the flexible region between residues 44 and 56.
4. Molecular dynamics calculations show the occurrence of concerted movements between this region and the loops defining the hydrophobic surface patch surrounding the metal site, including the C-terminal one, which holds three of the four metal ligands.
5. Further, mutation of residues from the sequence stretch from 44 to 56 lead to changes in the dynamics of these loops.
6. The X-ray structure for the V48I mutant of *Synechocystis sp* PCC 6803 plastocyanin has been solved at a resolution of 1.6 Å. No

substantial differences has been observed with the wild-type as to the main chain structure.

7. BIBLIOGRAFÍA

Adams, P. D., Afonine P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Jain, S., Kapral, G. J., Grosse Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R. D., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C. y Zwart, P. H. (2011). The Phenix software for automated determination of macromolecular structures. *Methods* 55, 94-106.

Adams, P. D, Grosse-Kunstleve, R. W, Hung, L. W., Loerger, T. R., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Read, R. J., Sacchettini, J. C., Sauter, N. K. y Terwilliger, T. C. (2002). PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallographica Section D: Biological crystallography* 58, 1948-1954.

Adman, E.T. y Jensen, L.H. (1981). Structural features of Azurin at 2.7 Angstroms resolution. *Israel Journal of Chemistry* 21, 8.

Adman, E.T. (1991). Copper protein structures. *Advances in Protein Chemistry* 42, 145-197.

Aiyar, A. (2000). The use of CLUSTAL W and CLUSTAL X for multiple sequence alignment. *Methods in Molecular Biology* 132, 221-241.

Alsop, E., Silver, M. y Livesay, D. R. (2003). Optimized electrostatic surfaces parallel increased thermostability: a structural bioinformatic analysis. *Protein Engineering design & selection* 16, 871-874.

Amadei, A., Linssen, A. B. y Berendsen, H. J. (1993). Essential dynamics of proteins. *Proteins* 17, 412-425.

Andreini, C. , Banci, L., Bertini, I. y Rosato, A. (2007). Occurrence of copper proteins through the three domains of life: A bioinformatic approach. *The Journal of Proteome Research* 7, 209–216.

Andrew, C.R., Han, J., de Vries, S., van der Oost, J., Averill, B. A., Loehr, T.M. y Sanders-Loehr, J. (1994). CUA of Cytochrome c Oxidase and the A site of N2O Reductase are tetrahedrally distorted Type 1 Cu

cysteinates. *Journal of the American Chemical Society* 116, 10805-10806.

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

Augustine, A. J., Kjaergaard, C., Qayyum, M., Ziegler, L., Kosman, D. J., Hodgson, K. O., Hedman, B. y Solomon, E. I. (2010). Systematic perturbation of the trinuclear copper cluster in the multicopper oxidases: the role of active site asymmetry in its reduction of O₂ to H₂O. *Journal of the American Chemical Society* 132, 6057-6067.

Avvaru, B. S., Busby, S. A., Chalmers, M. J., Griffin, P. R., Venkatakrisnan, B., Agbandje-McKenna, M., Silverman, D. N. y McKenna, R. (2009). Apo-human carbonic anhydrase II revisited: implications of the loss of a metal in protein structure, stability, and solvent network. *Biochemistry* 48, 7365-7372.

Baker, E. N. (1988). Structure of azurin from *Alcaligenes denitrificans* refinement at 1.8 Å resolution and comparison of the two crystallographically independent molecules. *Journal of Molecular Biology* 203, 1071-1795.

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

Battistutta, R., Mazzorana, M., Cendron, L., Bortolato, A., Sarno, S., Kazimierczuk, Z. Zanotti, G., Moro, S. y Pinna, L. A. (2007). The ATP-binding site of protein kinase CK2 holds a positive electrostatic area and conserved water molecules. *Chembiochem* 8, 1804-1809.

Battistuzzi, G., Borsari, M., Canters, G. W., de Waal, E., Leonardi, A., Ranieri, A. y Sola, M. (2002). Thermodynamics of the acid transition in blue copper proteins. *Biochemistry* 41, 14293-14298.

Beaucamp, N., Hofmann, A. y Kellerer, B. (1997). Dissection of the gene of the bifunctional PGK-TIM fusion protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: design and characterization of the separate triosephosphate isomerase. *Protein Science* 6, 2159-2165.

Beeby, M., O'Connor, B. D., Ryttersgaard, C., Boutz, D. R., Perry, L. J. y Yeates, T. O. (2005). The genomics of disulfide bonding and protein stabilization in thermophiles. *PLoS Biology* 3, e309.

Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., DiNola, A. y Haak, J. R. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics* 81, 3684-3690.

Berezovsky, I.N., Chen, W.W., Choi, P.J. y Shakhnovich, E.I. (2005). Entropic Stabilization of Proteins and Its Proteomic Consequences. *PLoS Computational Biology* 1, e47.

Bergfors, T. (2003). Seeds to crystals. *Journal of Structural Biology* 142, 66-76.

Bertini^a, I., Bryant, D. A., Ciurli, S., Dikiy, A., Fernandez, C. O., Luchinat, C., Safarov, N. y Vila, A. J. (2001). Backbone dynamics of plastocyanin in both oxidation states. Solution structure of the reduced form and comparison with the oxidized state. *Journal of Biological Chemistry* 276, 47217-47226.

Binkowski, T. A., Naghibzadeh, S. y Liang, J. (2003). CASTp: Computed atlas of surface topography of proteins. *Nucleic Acids Research* 31, 3352-3355.

Bolen, D.W y Santoro, M.M. (1988). Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 2. Incorporation of DELTA.G.degree.N-U values in a thermodynamic cycle. *Biochemistry* 27, 8069–8074.

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

Bonisch, H., Backmann, J., Kath, T., Naumann, D. y Schafer, G. (1996). Adenylate kinase from *Sulfolobus acidocaldarius*: expression in *Escherichia coli* and characterization by Fourier transform infrared spectroscopy. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 333, 75-84.

Botuyan, M. V., Toy-Palmer, A., Chung, J., Blake, R. C., Beroza, P., Case, D. A. y Dyson, H. J. (1996). NMR solution structure of Cu(I) rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans*: structural basis for the extreme acid stability and redox potential. *Journal of Structural Biology*. 263, 752-767.

Bowie, J. U. (2011). Membrane protein folding: how important are hydrogen bonds? *Current Opinion in Structural Biology* 21, 42-49.

Bullen, R. A., Arnot, T. C., Lakeman, J. B. y Walsh, F. C. (2006). Biofuel cells and their development. *Biosensors and Bioelectronics* 21, 2015-2045.

Calhoun, M. W., Hill, J. J., Lemieux, L. J., Ingledew, W. J., Alben, J. O. y Gennis, R. B. (1993) Site-directed mutants of the cytochrome bo ubiquinol oxidase of *Escherichia coli*: amino acid substitutions for two histidines that are putative CuB ligands. *Biochemistry* 32, 11524-11529.

Cambillau, C. y Claverie, J. M. (2000). Structural and genomic correlates of hyperthermostability. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 32383-32386.

Canters, G. W. y Gilardi, G. (1993). Engineering type 1 copper sites in proteins. *FEBS Letters* 325, 39-48.

Carrell, C.J., Davidson, V.L., Chen, Z., Cunane, L.M., Trickey, P. y Mathews, F.S. (2007). Structure of the blue copper protein Amicyanin to 0.75 Å resolution. No publicado.

Case, D.A., Darden, T., Cheatham, T.E., Simmerling, C., Wang, J., Duke, R.E., Luo, R., Merz, K.M., Pearlman, D.A., Crowley, M., et al. (2006). AMBER 9. San Francisco, CA. University of California.

Chaboy, J. (2009). Relationship between the structural distortion and the Mn electronic state in $\text{La}_{1-x}\text{Ca}_x\text{MnO}_3$: a Mn K-edge XANES study. *Journal of Synchrotron Radiation* 16, 533-544.

Chaboy, J., Diaz-Moreno, S., Diaz-Moreno, I. y De la Rosa, M. A. (2011). How the local geometry of the Cu-binding site determines the thermal stability of blue copper proteins. *Chemistry and Biology* 18, 25-31.

Chakravarty, S. y Varadarajan, R. (2000). Elucidation of determinants of protein stability through genome sequence analysis. *FEBS Letters* 470, 65-69.

Chan, C. H., Yu, T. H. y Wong, K. B. (2011). Stabilizing salt-bridge enhances protein thermostability by reducing the heat capacity change of unfolding. *PLoS One* 6, e21624.

Chaubey, A. y Malhotra, B.D. (2001). Mediated biosensors. *Biosensors & Bioelectronics* 17, 441-456.

Coleman, R. G. y Sharp, K. A. (2010). Shape and evolution of thermostable protein structure. *Proteins* 78, 420-433.

Comba, P. y Remenyi, R. (2000). A new molecular mechanics force field for the oxidized form of blue copper proteins. *J Comput Chem.* 23, 697-705.

Cracknell, J. A., McNamara, T. P., Lowe, E. D. y Blanford, C. F. (2011). Bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria*: X-ray determination of the complete crystal structure and a rational surface modification for enhanced electrocatalytic O₂ reduction. *Dalton Transactions* 40, 6668-6675.

Crane, B. R., Di Bilio, A. J., Winkler, J. R. y Gray, H. B. (2001). Electron tunneling in single crystals of *Pseudomonas aeruginosa* azurins. *Journal of the American Chemical Society* 123, 11623-11631.

Creighton, T. E. (1997). *Proteins: structures and molecular properties.* Freeman & Company, New York 2nd ed., 1-20.

Crowley, P. B., Matias, P. M., Mi, H., Firbank, S. J., Banfield, M. J. y Dennison, C. (2008). Regulation of protein function: crystal packing interfaces and conformational dimerization. *Biochemistry* 25, 6583-6589.

Danielsen, E., Scheller, H. V., Bauer, R., Hemmingsen, L., Bjerrum, M. J. y Hansson, O. (1999). Plastocyanin binding to photosystem I as a function of the charge state of the metal ion: effect of metal site conformation. *Biochemistry* 38, 11531-11540.

Decker, H., Schweikardt, T., Nillius, D., Salzbrunn, U., Jaenicke, E. y Tuczek, F. (2007). Similar enzyme activation and catalysis in hemocyanins and tyrosinases. *Gene* 398, 183-191.

Deckert, G., Warren, P. V., Gaasterland, T., Young, W. G., Lenox, A. L., Graham, D. E., Overbeek, R., Snead, M. A., Keller, M., Aujay, M. Huber, R., Feldman, R. A., Short, J. M., Olsen, G. J. y Swanson, R. V. (1998). The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* 392, 353-358.

Dell'Acqua, S., Pauleta, S. R., Moura, I. y Moura, J. J. (2011) The tetranuclear copper active site of nitrous oxide reductase: the CuZ center. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 16, 183 - 194.

Deng, N., Dai, W. y Levy, R.M. (2013). How Kinetics within the unfolded state affects protein folding. An analysis based on Markov state models and an ultra-Long MD trajectory. *The Journal of Physical Chemistry B* 117, 12787-12799.

Dennison, C. (2005). Investigating the structure and function of cupredoxins. *Coordination Chemistry Reviews* 249, 3025-3054.

Dennison, C. (2008). The role of ligand-containing loops at copper sites in proteins. *Natural Product Reports* 20, 15-24.

Dennison, C. y Lawler, A. T. (2001). Investigations of the alkaline and acid transitions of umecyanin, a stellacyanin from horseradish roots. *Biochemistry* 40, 3158-3166.

Diaz, A., Hervas, M., Navarro, J. A., De La Rosa, M. A. y Tollin, G. (1994). A thermodynamic study by laser-flash photolysis of plastocyanin and cytochrome c6 oxidation by photosystem I from the green alga *Monoraphidium braunii*. *European Journal of Biochemistry* 222, 1001-1007.

Díaz-Quintana, A., B. De la Cerda, M. Hervás, J.A. Navarro y M.A. De la Rosa (2002). Mutations in both leucine 12 and lysine 33 in plastocyanin from *Synechocystis* sp. PCC 6803 induces drastic changes in the hydrophobic interactions with photosystem I. *Photosynthesis Research* 72, 223-230.

Diaz-Moreno, I., Diaz-Quintana, A., 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.

Dong, S., Ybe, J. A., Hecht, M. H. y Spiro, T. G. (1999). H-bonding maintains the active site of type 1 copper proteins: site-directed mutagenesis of Asn38 in poplar Plastocyanin. *Biochemistry* 38, 3379-3385.

Duan, Y., Wu, C., Chowdhury, S., Lee, M.C., Xiong, G., Zhang, W., Yang, R., Cieplak, P., Luo, R., Lee, T., Caldwell, J., Wang, J., Kollman, P. (2003). A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *Journal of Computational Chemistry* 24, 1999-2012.

Ducros, V., Brzozowski, A.M., Wilson, K.S., Brown, S.H., Ostergaard P., Schneider, P., Yaver, D.S., Pedersen, A.H. y Davies, G.J. (1998). Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. *Nature Structural & Molecular Biology* 5, 310-316.

Dunbrack, R. L. (2002). Rotamer libraries in the 21st century. *Current Opinion in Structural Biology* 12, 431-440.

Durley, R., Chen, L., Lim, L. W., Mathews, F. S. y Davidson, V. L. (1993). Crystal structure analysis of amicyanin and apoamicyanin from *Paracoccus denitrificans* at 2.0 Å and 1.8 Å resolution. *Protein Science* 2, 739-752.

Dutton, P. L., Wilson, D. F. y Lee, Ch. (1970). Oxidation-reduction potentials of cytochromes in mitochondria. *Biochemistry* 9, 5077-5082.

Elcock, A. H. (1998). The stability of salt bridges at high temperatures: implications for hyperthermophilic proteins. *Journal of Structural Biology* 284, 489-502.

Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. y Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallographica Section D: Biological crystallography* 66, 486-501.

Farrar, J. A., Zumft, W. G. y Thomson, A. J. (1998) CuA and CuZ are variants of the electron transfer center in nitrous oxide reductase. PNAS 95, 9891-9896.

Farzadfard, F., Gharaei, N., Pezeshk, H. y Marashi, S. A. (2008). Beta-sheet capping: signals that initiate and terminate beta-sheet formation. Journal of Structural Biology 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 (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.

Feller, G. (2010). Protein stability and enzyme activity at extreme biological temperatures. Journal of Physics: Condensed Matter 22, 323101.

Fu, Y., Gao, J., Bieschke, J., Dendle, M. A. y Kelly, J. W. (2006). Amide-to-E-olefin versus amide-to-ester backbone H-bond perturbations: Evaluating the O-O repulsion for extracting H-bond energies. J Am Chem Soc 128, 15948-15949.

Fujii, T., Hata, Y., Oozeki, M., Moriyama, H., Wakagi, T. y Tanaka, N. (1997). The crystal structure of zinc-containing ferredoxin from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus* sp. strain 7. Biochemistry 36, 1505-1513.

Gao, J. y Kelly, J. W. (2008). Toward quantification of protein backbone-backbone hydrogen bonding energies: An energetic analysis of an amide-

to-ester mutation in an alpha-helix within a protein. *Protein Science* 17, 1096-1101.

Gao, J., Bosco, D. A., Powers, E. T. y Kelly, J. W. (2009). Localized thermodynamic coupling between hydrogen bonding and microenvironment polarity substantially stabilizes proteins. *Nature Structural and Molecular Biology* 16, 684-690.

Garrett, T. P., 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. *The Journal of Biological Chemistry* 259, 2822-2825.

Ge, M., Xia, X. Y. y Pan, X. M. (2008). Salt bridges in the hyperthermophilic protein Ssh10b are resilient to temperature increases. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 31690-31696.

Ge, M. y Pan, X. M. (2009). The contribution of proline residues to protein stability is associated with isomerization equilibrium in both unfolded and folded states. *Extremophiles* 13, 481-489.

Gershenson, A., Schauerte, J. A., Giver, L. y Arnold, F. H. (2000). Tryptophan phosphorescence study of enzyme flexibility and unfolding in laboratory-evolved thermostable esterases. *Biochemistry* 39, 4658-4665.

Gewirth, A.A. y Solomon, E.I. (1988). Electronic structure of Plastocyanin: Excited state spectral features. *Journal of the American Chemical Society* 110, 3811-3819.

Goodenough, P.W. y Jenkins, J.A. (1991). Protein engineering to change thermal stability for food enzymes. *Biochemical Society Transactions* 19, 655-662.

Gray, H. B., Malmstrom, B. G. y Williams, R. J. (2000). Copper coordination in blue proteins. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 5, 551-559.

Greaves, R.B. y Warwicker, J. (2007). Mechanisms for stabilisation and the maintenance of solubility in proteins from thermophiles. *BMC Structural Biology* 7, 18.

Greenfield, N. J. (2006). Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nature Protocols* 1, 2527-2535.

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

Gromiha, M. M., Pathak, M. C., Saraboji, K., Ortlund, E. A. y Gaucher, E. A. (2013). Hydrophobic environment is a key factor for the stability of thermophilic proteins. *Proteins* 81, 715-721.

Guss, J. M., Harrowell, P. R., Murata, M., Norris, V. A. y Freeman, H. C. (1986). Crystal structure analyses of reduced (CuI) poplar plastocyanin at six pH values. *Journal of Molecular Biology* 192, 361-387.

Guss, J. M. y Freeman, H. C. (1983). Structure of oxidized poplar plastocyanin at 1.6 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 169, 521-563.

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. *Biophysical Chemistry* 112, 35-43.

Haki, G.D. y Rakshit, S.K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology* 89, 17-34.

Hall^a, J. F., Kanbi, L. D., Strange, R. W. y Hasnain, S. S. (1999). Role of the axial ligand in type 1 Cu centers studied by point mutations of met148 in rusticyanin. *Biochemistry* 38, 12675-12680.

Hall^b, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95-98.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166, 557-580.

Hart, P. J., Nersissian, A. M., Herrmann, R. G., Nalbandyan, R. M., Valentine, J. S. y Eisenberg, D. (1996). A missing link in cupredoxins: crystal structure of cucumber stellacyanin at 1.6 Å resolution. *Protein Science* 5, 2175-2183.

Hayward, S. y de Groot, B.L. (2008). Normal modes and essential dynamics. *Methods in Molecular Biology* 443, 89-106.

Hervás, M., Navarro, F., Navarro, J. A., Chavez, S., Diaz, A., Florencio, F. J. y De la Rosa, M. A. (1993). *Synechocystis* 6803 plastocyanin isolated from both the cyanobacterium and *E. coli* transformed cells are identical. *FEBS Letters* 319, 257-260.

Hervás, M., Ortega, J.M., Navarro, J.A., De la Rosa, M.A. y Bottin, H. (1994). Laser flash kinetic analysis of *Synechocystis* PCC 6803 cytochrome c6 and plastocyanin oxidation by Photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1184, 235-241.

Hervás, M., Navarro, J. A., Diaz, A., Bottin, H. y De la Rosa, M. A. (1995). Laser-flash kinetic analysis of the fast electron transfer from plastocyanin and cytochrome c6 to photosystem I. Experimental evidence on the evolution of the reaction mechanism. *Biochemistry* 34, 11321-11326.

Hervás, M., Navarro, J. A. y De La Rosa, M. A. (2003). Electron transfer between membrane complexes and soluble proteins in photosynthesis. *Accounts of Chemical Research* 36, 798-805.

- Hervás, M. y Navarro, J.A.** (2011). Effect of crowding on the electron transfer process from plastocyanin and cytochrome c6 to photosystem I: a comparative study from cyanobacteria to green algae. *Photosynthesis Research* 107, 279-286.
- Hess, B.** (2000). Similarities between principal components of protein dynamics and random diffusion. *Physical Review E* 62, 8438-8448.
- Hess, B.** (2002). Convergence of sampling in protein simulations. *Physical Review E* 65, 031910.
- Hol, W. G., van Duijnen, P.T. y Berendsen, H. J.** (1978). The alpha-helix dipole and the properties of proteins. *Nature* 273, 443-446.
- 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. *Journal of Molecular Biology* 216, 1031-1044.
- Ito, S., Ishii, T., Sakai, H. y Uchida, K.** Crystal structures of H₂O₂-treated Cu,Zn-superoxide dismutase. No publicado.
- Jelesarov, I. y Karshikoff, A.** (2009). Defining the Role of Salt Bridges in Protein Stability. *Methods in Molecular Biology* 490, 227-260.
- Ji, H. F. y Zhang, H. Y.** (2008). Bioinformatic identification of the most ancient copper protein architecture. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 26, 197-201.
- Johnson, W.C.**(1999). Analyzing Protein CD for Accurate secondary Structures. *Proteins: Structure, Function and Genetics* 35, 307-312.
- Jorgensen, W.L. y Madura, J.D.** (1983). Quantum and statistical mechanical studies of liquids. 25. Solvation and conformation of methanol in water. *Journal of the American Chemical Society* 105, 1407-1413.
- Kabsch, W.** (2010). Xds. *Acta Crystallographica Section D: Biological crystallography* 66, 125-132.

Kannan, N. y Vishveshwara, S. (2000). Aromatic clusters: a determinant of thermal stability of thermophilic proteins. *Protein Engineering Design and Selection* 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 in Biochemical Sciences* 26, 550-556.

Keating, K. M., Ghosaini, L. R., Giedroc, D. P., Williams, K. R., Coleman, J. E. y Sturtevant, J. M. (1988). Thermal denaturation of T4 gene 32 protein: effects of zinc removal and substitution. *Biochemistry* 27, 5240-5245.

Kelly, S.M., Thomas, J.J. y Price, N. C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1751, 119-139.

Kepp, K.P. (2014). Computing stability effects of mutations in human Superoxide Dismutase 1. *The Journal of Physical Chemistry B* 118, 1799-1812.

Kim, E., Chufan, E. E., Kamaraj, K. y Karlin, K. D. (2004) Synthetic models for heme-copper oxidases. *Chemical Reviews* 104, 1077-1133.

Kosman, .J. (2010). Multicopper oxidases: a workshop on copper coordination chemistry, electron transfer, and metallophysiology. *J Biol Inorg Chem* 15, 15-28.

Kumar, S. y Nussinov, R. (1999). Salt bridge stability in monomeric proteins. *Journal of Molecular Biology* 293, 1241-1255.

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

LaCroix, L.B., Shadle, S.E., Wang, Y., Averill, B.A., Hedman, B., Hodgson, K. O. y Solomon, E. I. (1996). Electronic Structure of the Perturbed Blue Copper Site in Nitrite Reductase: Spectroscopic

Properties, Bonding, and Implications for the Entatic/Rack State. *Journal of the American Chemical Society* 118, 7755-7768.

Lancaster, K. M., DeBeer, G.S., Yokoyama, K., Richards, J. H. y Gray, H. B. (2009). Type-zero copper proteins. *Nature Chemistry* 1, 711-715.

Laskowski, R.A. (2007). Enhancing the functional annotation of PDB structures in PDBsum using key figures extracted from the literature. *Bioinformatics* 23, 1824-1827.

Li, W. F., Zhou, X. X. y Lu, P. (2005). Structural features of thermozymes. *Biotechnology Advances* 23, 271-281.

Li, H., Webb, S. P., Ivanic, J. y Jensen, J. H. (2004). Determinants of the relative reduction potentials of type-1 copper sites in proteins. *Journal of the American Chemical Society* 126, 8010-8019.

Li, C., Banfield, M. J. y Dennison, C. (2007). Engineering copper sites in proteins: loops confer native structures and properties to chimeric cupredoxins. *Journal of the American Chemical Society* 129, 709-718.

Liang, J. y Dill, K.A. (2001). Are proteins well-packed? *Biophysical Journal* 81, 751-766.

Linder, M.C. (1991). *Biochemistry of Copper*. *Biochemistry of the Elements*, 10, 1-13. Plenum Press. New York.

Lindley^a, P.F. (2001). Multicopper oxidases. *Handbook of metalloproteins*, 763- 880. Marcel Dekker. New York.

Lindley^b, P.F. (2001). Copper proteins of various functions. *Handbook of metalloproteins*, 763 - 880. Marcel Dekker. New York.

Loach, P. (1973). Oxidation-reduction potentials, absorbance bands and molar absorbance of compounds used in biochemical studies. *Handbook of chemistry. Selected data for molecular biology*, 2^a edition, J33-J40, CRC press, Cleveland.

- Lobanov, M. Yu., Bogatyreva, N. S., y Galzitskaya, O. V.** (2008). Radius of Gyration as an Indicator of Protein Structure Compactness. *Molecular Biology* 42, 623–628.
- Luke, K. A., Higgins, C. L. y Wittung-Stafshede, P.** (2007). Thermodynamic stability and folding of proteins from hyperthermophilic organisms. *FEBS Journal* 274, 4023-4033.
- Lumry, R. y Eyring, H.** (1954). Conformation Changes of Proteins. *The Journal of Physical Chemistry* 58, 110-120.
- Ma, J.K., Bishop, G.R. y Davidson, V.L.** (2005). The ligand geometry of copper determines the stability of amicyanin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444, 27-33.
- Machonkin, T.E., Zhang, H.H., Hedman, B., Hodgson, K.O. y Solomon, E.I.** (1998). Spectroscopic and magnetic studies of human ceruloplasmin: identification of a redox-inactive reduced Type 1 copper site. *Biochemistry* 37, 9570-9578.
- MacPherson, I.S. y Murphy, M.E.** (2007). Type-2 copper-containing enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64, 2887-2899.
- Makhatadze, G.I., Loladze, V.V., Ermolenko, D.N., Chen, X. y Thomas, S.T.** (2003). Contribution of surface salt bridges to protein stability: guidelines for protein engineering. *Journal of Molecular Biology* 327, 1135-48.
- Malmström, B.G. y Vänngård, T.** (1960). Electron spin resonance of copper proteins and some model complexes. *Journal of Molecular Biology* 2, 118-124.
- Malmström, B.G.** (1994). ck-induced bonding in blue-copper proteins. *European Journal of Biochemistry* 223, 711-718.
- Manco, G., Giosue, E., D'Auria, S., Herman, P., Carrea, G. y Rossi, M.** (2000). Cloning, overexpression, and properties of a new thermophilic and

thermostable esterase with sequence similarity to hormone-sensitive lipase subfamily from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 373, 182-192.

Marqusee, S. y Sauer, R.T. (1994). Contributions of a hydrogen bond/salt bridge network to the stability of secondary and tertiary structure in lambda repressor. *Protein Science* 3, 2217-2225.

Mathis, P. y Sétif, P. (1981). Near- infrared absorption spectra of the chlorophyll a cations and triplet state in vitro and in vivo. *Israel Journal of Chemistry*, 316-320.

Matsumura, M., Signor, G. y Matthews, B. W. (1989). Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds. *Nature* 342, 291-293.

Matthews, B.W., Nicholson, H. y Bechtel, W.J. (1987). Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding. *PNAS* 84, 6663-6667.

May, R. A. y Stevenson, K. J. (2009). Software Review of Origin 8. *Journal of the American Chemical Society* 1, 872.

McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. y Read, R.J. (2007). Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography* 40, 658-674.

Medina, M., Diaz, A., Hervas, M., Navarro, J. A., Gomez-Moreno, C., de la Rosa, M. A. y Tollin, G. (1993). A comparative laser-flash absorption spectroscopy study of *Anabaena* PCC 7119 plastocyanin and cytochrome c6 photooxidation by photosystem I particles. *Eur J Biochem* 213, 1133-1138.

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.

Merchant, S., Hill, K. y Howe, G. (1991). Dynamic interplay between two copper-titrating components in the transcriptional regulation of cyt c6. *The Embo Journal* 10, 1383-9.

Meyer, T., Ferrer-Costa, C., Alberto Pérez, A., Rueda, M., Bidon-Chanal, A., Luque, F. J., Laughton, C. y Orozco, M. (2006). Essential Dynamics: A tool for efficient trajectory compression and management. *Journal of Chemical Theory and Computation* 2, 251- 258.

Messerschmidt, A. (2010). Copper metalloenzymes. *Comprehensive Natural Products II* 8.14, 489-545. Elsevier Inc.

Milardi, D., Grasso, D. M., Verbeet, M. P., Canters, G. W. y La Rosa, C. (2003). Thermodynamic analysis of the contributions of the copper ion and the disulfide bridge to azurin stability: synergism among multiple depletions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 414, 121-127.

Milardi, D., La Rosa, C. y Grasso, D. (1994). Extended theoretical analysis of irreversible protein thermal unfolding. *Biophysical Chemistry* 52, 183-189.

Milardi, D., La Rosa, C., Grasso, D., Guzzi, R., Sportelli, L. y Fini, C. (1998). Thermodynamics and kinetics of the thermal unfolding of plastocyanin. *European Biophysics Journal* 27, 273-282.

Minteer, S.D., Liaw, B.Y. y Cooney, M.J. (2007). Enzyme-based biofuel cells. *Current Opinion in Biotechnology* 18, 228-234.

Missimer, J. H., Steinmetz, M. O., Baron, R., Winkler, F. K., Kammerer, R. A., Daura, X. y van Gunsteren, W. F. (2007). Configurational entropy elucidates the role of salt-bridge networks in protein thermostability. *Protein Science* 16, 1349-1359.

Mizoguchi, T.J., Di Bilio, A. J., Harry B.G. y Richards, J.H. (1992). Blue to type 2 binding. Copper(II) and cobalt(II) derivatives of a

Cys112Asp mutant of *Pseudomonas aeruginosa* azurin. *JACS* 114, 10076-10078.

Moehlenbrock, M. J. y Minteer, S.D. (2008). Extended lifetime biofuel cells. *Chemical Society Reviews* 37, 1188-1196.

Mrabet, N. T., Van den Broeck, A., et al. (1992). Arginine residues as stabilizing elements in proteins. *Biochemistry* 31, 2239-2253.

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

Muñoz-López^b, F. J., Raugei, S., De la Rosa, M. A., Diaz-Quintana, A. y J. Carloni, P. (2010). Changes in non-core regions stabilise plastocyanin from the thermophilic cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 15, 329-338.

Murphy, M. E., Lindley, P. F. y Adman, E. T. (1997). Structural comparison of cupredoxin domains: domain recycling to construct proteins with novel functions. *Protein Science* 6, 761-770.

Musiani, F., Carloni, P. y Ciurli, S. (2004). The Asn 38-Cys 84 H-Bond in Plastocyanin. *The Journal of Physical Chemistry B* 108, 7495-7499.

Nakamura, K., Kawabata, T., Yura, K. y Go, N. (2003). Novel types of two-domain multi-copper oxidases: possible missing links in the evolution. *FEBS Letters* 553, 239-244.

Nakamura, K. y Go, N. (2005). Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62, 2050-2066.

Nar, H., Messerschmidt, A., Huber, R., van de Kamp, M. y Canters, G. W. (1991). Crystal structure analysis of oxidized *Pseudomonas aeruginosa* azurin at pH 5.5 and pH 9.0. A pH-induced conformational

transition involves a peptide bond flip. *Journal of Molecular Biology* 221, 765-772.

Nersissian, A. M. y Shipp, E. L. (2002). Blue copper-binding domains. *Advances in Protein Chemistry* 60, 271-340.

Nicholson, H., Tronrud, D. E., Bechtel, W. J. y Matthews, B. W. (1992). Analysis of the effectiveness of proline substitutions and glycine replacements in increasing the stability of phage T4 lysozyme. *Biopolymers* 32, 1431-1441.

Niesen, F.H., Berglund, H. y Vedadi, M. (2007). The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature Protocols* 2, 2212-2221.

Noyer, M. y Putnam, F. W. (1981). A circular dichroism study of undegraded human ceruloplasmin. *Biochemistry* 20, 3536-3542.

Ortega, J. M., Hervás, M. y Losada, M. (1988). Redox and acid-base characterization of cytochrome b-559 in photosystem II particles. *European Journal of Biochemistry* 171, 449-455.

Osman, M.H., Shah, A.A. y Walsh, F.C. (2011). Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part I: enzymatic cells. *Biosensors and Bioelectronics* 26, 3087-3102.

Pace, C. N., Grimsley, G. R., Thomson, J. A. y Barnett, B. J. (1988). Conformational stability and activity of ribonuclease T1 with zero, one, and two intact disulfide bonds. *The Journal of Biological Chemistry* 263, 11820-11825.

Pace, C.N. (1992). Contribution of the hydrophobic effect to globular protein stability. *Journal of Molecular Biology* 226, 29-35.

Pace, C.N. (2009). Energetics of protein hydrogen bonds. *Nature Structural & Molecular Biology* 16, 681-682.

Pack, S.P. y Yoo, Y.J. (2004). Protein thermostability: structure-based difference of amino acid between thermophilic and mesophilic proteins. *Journal of Biotechnology* 111, 269-277.

Paltrinieri, L., Borsari, M., Battistuzzi, G., Sola, M., Dennison, C., de Groot, B. L., Corni, S. y Bortolotti, C. A. (2013). How the dynamics of the metal-binding loop region controls the acid transition in cupredoxins. *Biochemistry* 52, 7397-7404.

Paraskevopoulos, K., Antonyuk, S. V., Sawers, R. G., Eady, R. R. y Hasnain, S. S. (2006) Insight into catalysis of nitrous oxide reductase from high-resolution structures of resting and inhibitor-bound enzyme from *Achromobacter cycloclastes*. *Journal of Molecular Biology* 362, 55-65.

Parthiban, V., Gromiha, M.M. y Schomburg, D. (2006). CUPSAT: prediction of protein stability upon point mutations. *Nucleic Acids Research* 34 (Web Server issue): W239-242.

Pearson, R.G. (1963). Hard and Soft Acids and Bases. *Journal of the American Chemical Society* 85, 3533-3539.

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. *Journal of the American Chemical Society*. 103, 4382-4388.

Permyakov, S.E., Bakunts, A.G., Denesyuk, A.I., Knyazeva, E.L., Uversky, V.N. y Permyakov, E.A. (2008). Apo-parvalbumin as an intrinsically disordered protein. *Proteins* 72, 822-836.

Perutz, M.F. y Raidt, H. (1975). Stereochemical basis of heat stability in bacterial ferredoxins and in haemoglobin A2. *Nature* 255, 256-259.

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. y Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* 25, 1605-1612.

Polizzi, K.M., Bommarius, A.S., Broering, J.M. y Chaparro-Riggers, J.F. (2007). Stability of biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology* 11, 220-225.

Privalov, P.L. (1979). Stability of proteins: small globular proteins. *Advances in Protein Chemistry* 33, 167-241.

Priyakumar, U.D., Ramakrishna, S., Nagarjuna, K.R. y Reddy, S.K. (2010). Structural and energetic determinants of thermal stability and hierarchical unfolding pathways of hyperthermophilic proteins, Sac7d and Sso7d. *The Journal of Physical Chemistry B* 114, 1707-18.

Querol, E., Perez-Pons, J.A. y Mozo-Villarias, A. (1996). Analysis of protein conformational characteristics related to thermostability *Protein Engineering* 9, 265-271.

Quintanar, L. y Rivillas-Acevedo, L. (2013). Studying Metal Ion–Protein Interactions: Electronic Absorption, Circular Dichroism, and Electron Paramagnetic Resonance. *Methods in Molecular Biology* 1008, 267-297.

Radestock, S. y Gohlke, H. (2008). Exploiting the Link between Protein Rigidity and Thermostability for Data-Driven Protein Engineering. *Engineering in Life Sciences*. 8, 507-522.

Redinbo, M.R., Yeates, T.O. y Merchant, S. (1994). Plastocyanin: structural and functional analysis. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 26, 49-66.

Romero, A., De la Cerda, B., Varela, P. F., Navarro, J. A., Hervás, M. y De la Rosa, M.A. (1998). The 2.15 Å crystal structure of a triple mutant

plastocyanin from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Molecular Biology* 275, 327-336.

Ronkainen, N.J., Halsall, H.B. y Heineman, W.R. (2010). Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews* 39, 1747-1763.

Rosato, V., Pucello, N. y Giuliano, G. (2002). Evidence for cysteine clustering in thermophilic proteomes. *Trends in Genetics* 18, 278-281.

Rosenzweig, A.C. y Sazinsky, M.H. (2006). Structural insights into dioxygen-activating copper enzymes. *Current Opinion in Structural Biology* 16, 729-735.

Rother, K., Hildebrand, P. W., Goede, A., Gruening, B. y Preissner, R. (2009) Voronoi: analyzing packing in protein structures. *Nucleic Acids Research* 37, D393-D395.

Royer, C.A. (2006). Probing protein folding and conformational transitions with fluorescence. *Chemical Reviews* 106, 1769-1784.

Rubenwolf, S., Kerzenmacher, S., Zengerle, R. y von Stetten, F. (2011). Strategies to extend the lifetime of bioelectrochemical enzyme electrodes for biosensing and biofuel cell applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89, 1315-1322.

Rubino, J. T. y Franz, K. J. (2012). Coordination chemistry of copper proteins: how nature handles a toxic cargo for essential function. *Journal of Inorganic Biochemistry* 107, 129-143.

Russell, R. J., Ferguson, J. M., Hough, D. W. y Danson, M. J. (1997). The crystal structure of citrate synthase from the hyperthermophilic archaeon *pyrococcus furiosus* at 1.9 Å resolution. *Biochemistry* 36, 9983-9994.

Rychaert, J. P., Ciccotti, G. y Berendsen, H. J. C. (1977). Numerical-integration of Cartesian equations of motion of a system with constraints-

molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics* 23, 327-341.

Ryde, U., Olsson, M.H., Pierloot, K. y Roos, B.O. (1996). The cupric geometry of blue copper proteins is not strained. *J Mol Biol* 261, 586-596.

Ryden, L. (1988). Evolution of blue copper proteins. *Progress in clinical and biological research* 274, 349-66.

Ryden, L.G. y Hunt, L.T. (1993). Evolution of protein complexity: the blue copper-containing oxidases and related proteins. *J Mol Evol* 36, 41-66.

Salari, R. y Chong, L.T. (2012). Effects of high temperature on desolvation costs of salt bridges across protein binding interfaces: similarities and differences between implicit and explicit solvent models. *The Journal of Physical Chemistry B* 116, 2561-2567.

Sambrook, J., Fritschi, E.F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sanchez-Ruiz, J. M. (1992). Theoretical analysis of Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry. *Biophysical Journal* 61, 921-935.

Sanchez-Ruiz, J. M. (2010). Protein kinetic stability. *Biophysical Chemistry* 148, 1-15.

Sancho, J. (2013). The stability of 2-state, 3-state and more-state proteins from simple spectroscopic techniques... plus the structure of the equilibrium intermediates at the same time. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 531, 4-13.

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., Shi, Y. y Schwarz, F. P. (2002). Effects of metal ligation and oxygen on the reversibility of the thermal denaturation of *Pseudomonas aeruginosa* azurin. *Biochemistry* 41, 1060-1069.

Sato, K., Li, C., Salard, I., Thompson, A.J., Banfield, M.J. y Dennison, C. (2009). Metal-binding loop length and not sequence dictates structure. *PNAS* 106, 5616-5621.

Savelieff, M.G., Wilson, T. D., Elias, Y., Nilges, M. J., Garner, D. K. y Lu, Y. (2008). Experimental evidence for a link among cupredoxins: red, blue, and purple copper transformations in nitrous oxide reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7919-7924.

Sawle, L. y Ghosh, K. (2011). How do thermophilic proteins and proteomes withstand high temperature? *Biophys J* 101, 217-227.

Schlarb-Ridley, B.G., Navarro, J.A., Spencer, M., Bendall, D.S., Hervás, M., Howe, C.J. y De La Rosa, M.A. (2002). Role of electrostatics in the interaction between plastocyanin and photosystem I of the cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *European Journal of Biochemistry* 269, 5893-902.

Sen, S. y Nilsson, L. (2012). *Thermostable proteins: structural stability and design*. CRC Press. Taylor & Francis Group, LLC.

Shosheva, A.Ch., Donchev, A.A. y Dimitrov. M.I. (2005). Crystal Forms of poplar plastocyanin a and b. *Genetics and Plant Physiology* 2, 151-160.

Shleev, S., Tkac, J., Christenson, A., Ruzgas, T., Yaropolov, A.I., Whittaker, J.W. y Gorton, L. (2005). Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes. *Biosensors and Bioelectronics* 20, 2517-2554.

Shukla, A.K., Suresh, P. y Berchmans, S. (2004). Biological fuel cells and their applications. *Current Science* 87, 455-468.

Si, D. y Li, H. (2009). Quantum chemical calculation of type-1 cu reduction potential: ligand interaction and solvation effect. *The Journal of Physical Chemistry A* 113, 12979-12987.

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. *Biochemical Journal*. 345:711–717.

Solomon, E. I., Hare, J. W. y Gray, H. B. (1976). Spectroscopic studies and a structural model for blue copper centers in proteins. *PNAS* 73, 1389-1393.

Solomon, E.I., Hare, J. W., Dooley, D.M., Dawson, J.H., Stephens, P.J. y Gray, H.B. (1980). Spectroscopic studies of Stenellacyanin, Plastocyanin, and Azurin. Electronic structure of the Blue Copper Sites. *Journal of the American Chemical Society* 102, 168-178.

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. *Chemical Reviews* 104, 419-58.

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

Sreerama, N., Venyaminov, S.Y y Woody, R.W. (2001). Analysis of protein CD spectra with a reference protein set based on tertiary structure class. *Analytical Biochemistry* 299, 271-274.

Sternier, R. y W. Liebl (2001). Thermophilic adaptation of proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 36, 39-106.

Stevens, F.J. (2008). Homology versus analogy: possible evolutionary relationship of immunoglobulins, cupredoxins, and Cu₂Zn-superoxide dismutase. *Journal of Molecular Recognition* 21, 20-29.

Sun, D. P., Sauer, U., Nicholson, H. y Matthews, B.W. (1991). Contributions of engineered surface salt bridges to the stability of T4 lysozyme determined by directed mutagenesis. *Biochemistry* 30, 7142-7153.

Svensson-Ek, M., Abramson, J., Larsson, G., Tornroth, S., Brzezinski, P. y Iwata, S. (2002) The X-ray crystal structures of wild-type and EQ(I-286) mutant cytochrome c oxidases from *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Molecular Biology* 321, 329-339.

Sykes, A.G. (1985). Structure and electron-transfer reactivity of the blue copper protein plastocyanin. *Chemical Society Reviews* 14, 283-315.

Sykes, A.G. (1991). Active-sites properties of the blue copper proteins. *Advances in Inorganic Chemistry* 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.

Takano, K., Scholtz, J.M., Sacchettini, J.C. y Pace, C.N. (2003). The contribution of polar group burial to protein stability is strongly context-dependent. *The Journal of Physical Chemistry* 278, 31790-31795.

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

Teilum, K., Smith, M.H., Schulz, E., Christensen, L.C., Solomentsev, G. y Oliveberg, M. (2009). Transient structural distortion of metal-free Cu/Zn superoxide dismutase triggers aberrant oligomerization. *PNAS* 106, 18273-18278.

Trivedi, M.V., Laurence, J. S. y Siahaan, T. J. (2009). The role of thiols and disulfides on protein stability. *Current Protein and Peptide Science* 10, 614-625.

Ubbink, M., Lian, L. Y., Modi, S., Evans, P. A. y Bendall, D. S. (1996). Analysis of the ¹H-NMR chemical shifts of Cu(I)-, Cu(II)- and Cd-substituted pea plastocyanin. Metal-dependent differences in the hydrogen-bond network around the copper site. *Eur J Biochem* 242, 132-147.

Vakoufari, E., Wilson, K.S. y Petratos, K. (1994). The crystal structures of reduced pseudoazurin from *Alcaligenes faecalis* S-6 at two pH values. *FEBS Letters* 347, 203-206.

Valentine, J. S. y Gralla, E. B. (2002). *Copper-Containing Proteins*. Advances in protein chemistry, 60. Academic Press, San Diego.

Vieille, C. y Zeikus, G.J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65, 1-43.

Vogt, G. y Argos, P. (1997). Protein thermal stability: hydrogen bonds or internal packing? *Folding and Design* 2, S40-46.

Vogt, G., Woell, S. y Argos, P. (1997). Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs. *Journal of Molecular Biology* 269, 631-643.

Von Wachenfeldt, C. de Vries, S. y van der Oost, J. (1994) The CuAsite of the *caa3*-type oxidase of *Bacillus subtilis* is a mixed-valence binuclear copper centre. *FEBS Letters* 340, 109-113.

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.

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. *Journal of Molecular Biology* 269, 142-153.

Wlodawer, A., Minor, W., Dauter, Z. y Jaskolski, M. (2008). Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. *FEBS Journal* 275, 1-21.

Wood, P.M. (1978). Interchangeable copper and iron proteins in algal photosynthesis. Studies on plastocyanin and cytochrome c-552 in *Chlamydomonas*. *European Journal of Biochemistry* 87, 9-19.

Xue, Y., Okvist, M., Hansson, O. y Young, S. (1998). Crystal structure of spinach plastocyanin at 1.7 Å resolution. *Protein Science* 7, 2099-2105.

Yang, J.T., Wu, C.S. y Martinez, H.M. (1986). Calculation of protein conformation from circular dichroism. *Methods in Enzymology* 130, 208-269.

Yang, L.Q., Ji, X.L. y Liu, S.Q. (2013). The free energy landscape of protein folding and dynamics: a global view. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 31, 982-92.

Yip, K.S., Stillman, T.J., Britton, K.L., Artymiuk, P.J., Baker, P.J., Sedelnikova, S. E., Engel, P.C., Pasquo, A., Chiaraluce, R. y Consalvi, V. (1995). The structure of *Pyrococcus furiosus* glutamate dehydrogenase reveals a key role for ion-pair networks in maintaining enzyme stability at extreme temperatures. *Structure* 3, 1147-1158.

Zhaxybayeva, O., Swithers, K.S., Lapierre, P., Fournier, G.P., Bickhart, D.M., DeBoy, R.T., Nelson, K. E., Nesbo, C. L., Doolittle, W. F., Gogarten, J. P. y Noll, K. M. (2009). On the chimeric nature, thermophilic origin, and phylogenetic placement of the Thermotogales. *PNAS* 106, 5865-5870.

Zhou, H.X. (2002). Toward the physical basis of thermophilic proteins: linking of enriched polar interactions and reduced heat capacity of unfolding. *Biophysical Journal* 83, 3126-33.

Zhou, X. X., Wang, Y. B. y Pan, Y. J. (2008). Differences in amino acids composition and coupling patterns between mesophilic and thermophilic proteins. *Amino Acids* 34, 25-33.

Zhu, Z., Cunane, L.M., Chen, Z., Durley, R.C., Mathews, F.S. y Davidson, V.L. (1998). Molecular basis for interprotein complex-dependent effects on the redox properties of amicyanin. *Biochemistry* 37, 17128-17136.

8. MATERIAL SUPLEMENTARIO

8.1. Material Suplementario 1: Difusión de resultados y publicaciones

8.1.1. Publicaciones en revistas

Frutos-Beltrán, E., J. Olloqui, M. Engel, A. Guerra-Castellano, J.J. Calvente, M. A. De la Rosa, R. Andreu, A. Wagner, A. Díaz-Quintana (2015). Interplay between the copper site and the remote east patch in plastocyanin. (en preparación).

Olloqui-Sariego, J.L., **Frutos-Beltrán, E.**, Roldán, E., Calvente, J.J., Díaz-Quintana, A., Andreu R. (2012). Voltammetric Study of the Adsorbed Thermophilic Plastocyanin from Phormidium Laminosum. *Electrochem. Commun.*, 19, 105-107. Doi: 10.1016/j.elecom.2012.03.012.

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. doi:10.1016/j.febslet.2010.04.013.

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. doi:10.1016/j.bioelechem.2009.06.003.

8.1.2. Comunicaciones a congresos

Frutos-Beltrán, E., Muñoz López, F.J., De la Rosa, M.A. y Díaz Quintana, A. Mejora de la Estabilidad Térmica de la Plastocianina de *Synechocystis* sp. PCC 6803. XXXII Congreso de la SEBBM. Oviedo, 2009

Frutos-Beltrán, E., Díaz-Moreno, I., Muñoz-López, F.J., Hervás, M., Navarro, J.A., De la Rosa, M.A. y Díaz Quintana, A. Improvement of the Thermostability of Plastocyanin from *Synechocystis* sp. PCC 6803 by Site Mutations. Workshop on Understanding Transient Interactions in Biology. Sevilla, 2010.

Frutos-Beltrán, E., De la Rosa, M. A. y Díaz-Quintana, A. The specific H-bonding and packing at the interface between the α -barrel and site 2 are responsible for the different stability of meso- and thermophilic plastocyanins. IV Spanish Portuguese Biophysical Congress. Zaragoza, 2010.

Frutos-Beltrán, E., Díaz Moreno, S., Chaboy Nalda, J., Wagner, A., Díaz Moreno, I., Muñoz López, F., Raugei, S., Carloni, P., De la Rosa, M.A. & Díaz Quintana, A. Modulation of a single copper-ligand bond by remote residues determines the stability of plastocyanins. IV Spanish Portuguese Biophysical Congress. Zaragoza, 2010.

Díaz-Quintana, A. Wagner, I. Díaz-Moreno, E. Frutos-Beltrán, M. A. De la Rosa, J. Chaboy y S. Díaz-Moreno. Metal-protein interplay in protein function and stability. XXII Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography. IUCr. Madrid, 2011.

8.2. Material Suplementario 2: Seguimiento del desplegamiento proteico de la Pc reducida mediante DSF

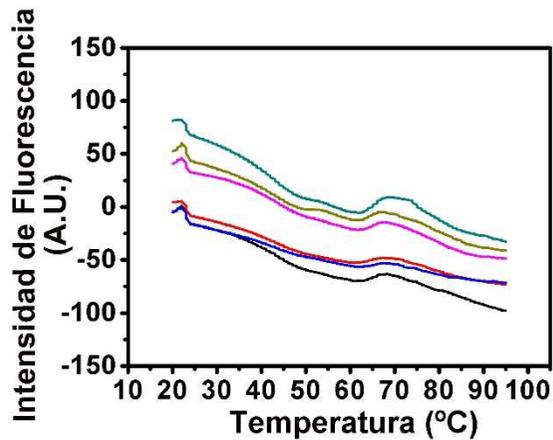


Figura TMS 1. Espectros de desnaturalización de la forma reducida de Syn-Pc mediante DSF.

8.3. Material Suplementario 3: Seguimiento del desplegamiento proteico de la apo-Pc mediante DSF y espectroscopía de fluorescencia

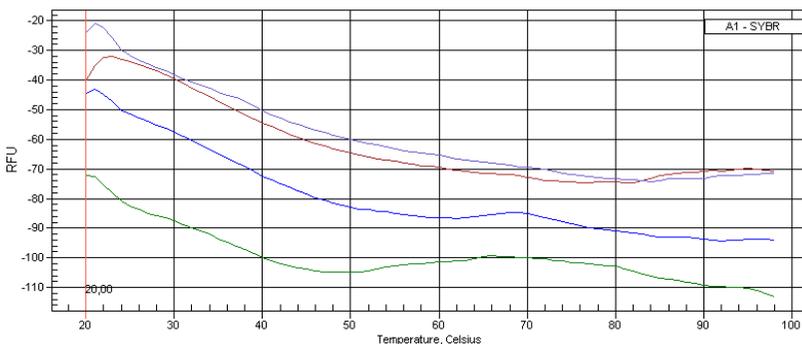


Figura TMS 2. Captura de pantalla de los espectros de desnaturalización de la apo-Pc de Syn-Pc mediante DSF.

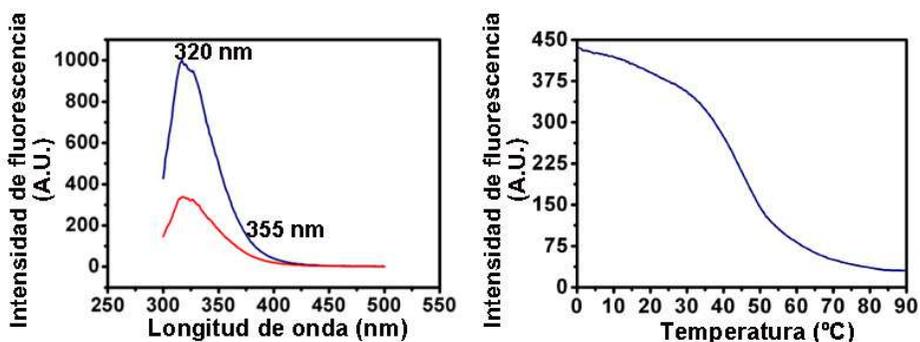


Figura TMS 3. Ejemplos del espectro de emisión de fluorescencia y de la curva de desnaturalización de la apo-Pc de Syn-Pc mediante espectroscopía de fluorescencia.

A) Espectro de emisión de fluorescencia de la apo-Pc de Syn-Pc en su estado nativo (azul) y desplegado (rojo). Las muestras fueron excitadas a 275 nm. **B)** Curva de desnaturalización de la apo-Pc de Syn-Pc. Las muestras fueron excitadas a 275 nm y el desplegamiento se monitorizó siguiendo el incremento de fluorescencia a 355 nm, tal como se explica en materiales y métodos.

8.4. Material Suplementario 4: Cristalización y obtención de la estructura cristalográfica de Syn-A44D/D49P/A62L

8.4.1. Obtención de los cristales

Los cristales de Syn-A44D/D49P/A62L crecieron tras 24 horas de incubación a 19°C (figura TMS 4), independientemente del método de difusión usado (*gota colgante o sentada*), mientras que a 4°C sólo se observó precipitación proteica. De la misma forma tampoco parecía influir en los resultados el volumen de las gotas.



gota colgante

temperatura ambiente



gota sentada

temperatura ambiente

Figura TMS 4. Cristales obtenidos para el triple mutante Syn-A44D/D49P/A62L de la plastocianina.

Los cristales crecieron tanto en condiciones de gota colgante (*hanging drop*) como en gota sentada (*sitting drop*) en presencia de 3,2 M de sulfato amónico en 0,1M de tampón fosfato sódico pH 7 como solución precipitante, y a una temperatura de incubación de 19°C. La concentración de Pc usada fue de 10 mg ml⁻¹, en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.

8.4.2. Colección de datos de difracción y procesamiento.

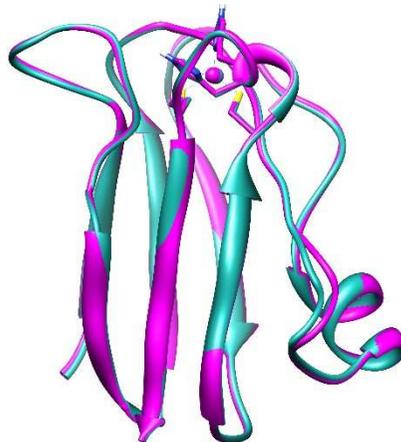


Figura TMS 5. Alineamiento de las estructuras cristalográficas del mutante Syn-A44D/D49P/A62L ya publicada (1PCS.pdb,(Romero *et al.*, 1998)) y la obtenida en este trabajo.

Tabla TMS 1

Parámetro	Valor
Grupo espacial	P3 ₂ 21
Dimensiones de la celdilla unidad	
a (Å); b (Å); c (Å)	34,10; 34,10; 110,46
α (°); β (°); γ (°)	90,00; 90,00, 120,00
Rango de resolución (Å)	1,513 – 29.531 (1.5821 -1.5132)
R _{work} /R _{free}	0,1498/0,1885
Nº de átomos	
proteína	800
solvente	124
SO ₄	5
Wilson B-factor (Å ²)	10,49
Residuos en Ramachandran plot	
Favorables	72 (88,9%)
Valores atípicos	0 (0,0 %)

8.5. Material Suplementario 5: condiciones de cristalización de Pho-P49G/G59P y gotas resultantes

Test 1: Aunque las condiciones de cristalización de Pho-Pc y algunos de sus mutantes descritos en la bibliografía [Bond *et al.*, 1999; Crowley *et al.*, 2008] implicaban el uso de cacodilato sódico 0,1 M como tampón, la no disposición del mismo llevó el empleo de un tampón alternativo. Se decidió usar el mismo empleado en la bibliografía para el mutante Syn-A44D/D49P/A62L: fosfato sódico potásico 0,1 M, pH 6,5. Por ello, las condiciones de partida fueron: gota con 1 μl proteína oxidada 10 mg ml^{-1} en MES 0,1 M pH 6,5 mezclada con 1 μl de solución precipitante. En cada pocillo se depositó 1 ml de solución precipitante. En la tabla TMS 1 se detallan las composiciones de las diferentes soluciones precipitantes usadas en este test.

Test 2: Condiciones experimentales de los ensayos de cristalización para Pho-P49G/G50P correspondientes a condiciones del kit "Crystal screen HR2-110" de Hampton Research. Se eligieron aquellas condiciones que o contuvieran cacodilato sódico como tampón o una composición similar a los detallados en la bibliografía para la cristalización de Pho-Pc o alguno de sus mutantes [Bond *et al.*, 1999; Crowley *et al.*, 2008]. Siguiendo las directrices del fabricante se mezclaron 2 μl proteína oxidada 10 mg ml^{-1} en agua con 2 μl de solución precipitante. En cada pocillo se depositó 1 ml de solución precipitante. En la tabla TMS 2 se detallan las composiciones de las diferentes soluciones precipitantes usadas en este test.

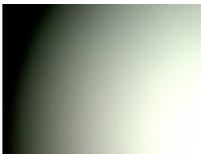
Como era de esperar, las mejores condiciones resultaron ser aquellas que contenían Polientilenglicol como solución precipitante y cacodilato sódico trihidrato pH 6,5 como tampón, tal como indica la bibliografía para otros mutantes y la forma silvestre [Bond *et al.*, 1999; Crowley *et al.*, 2008].

Tabla TMS 2. Composiciones de las soluciones precipitantes usadas en el test 1 de cristalización de Pho-P49G/G50P.

Sal	Buffer	Precipitante	Gota
0,2 M Cloruro de magnesio	0,1 M Fosfato de Sorensen, pH 6,5	15% (p/v) PEG 8,0	 <p>Cristal de sal (no se tiñe con azul de metileno o IZIT)</p>
0,2 M Acetato de zinc	0,1 M Fosfato de Sorensen, pH 6,5	10% (p/v) PEG 8,0	 <p>Precipatación de proteína y posible cristal amorfo</p>

Test 3: Basándonos en los resultados del Test 2 se decidió testar diferentes concentraciones de polietilenglicol (PEG) 8000 (entre 8 y 18 %) y de pH.(entre 5,5 y 6,5). Las condiciones fueron: gota con 1 μl proteína oxidada 10 mg ml^{-1} en MES 0,1 M pH 6,5 mezclada con 1 μl de solución precipitante. En cada pocillo se depositó 1 ml de solución precipitante. No se obtuvieron resultados concluyentes de este test.

Tabla TMS 3. Composiciones de las soluciones precipitantes usadas en el test 2 de cristalización de Pho-P49G/G50P. todas las condiciones pertenecen al kit "Crystal screen HR2-110" de Hampton Research.

Sal	Buffer	Precipitante	Gota
Condición nº 7			
	0,1 M Cacodilato sódico trihidrato, pH 6,5	1,4 M, Acetato sódico trihidrato	 Clara
Condición nº 8			
0,2 M sodium citrate tribasico dihidrato	0,1 M Cacodilato sódico trihidrato, pH 6,5	30% (v/v) 2-propanol	 Clara
Condición nº 15			
0,2 M Sulfato amónico	0,1 M Cacodilato sódico trihidrato, pH 6,5	30% (p/v) PEG 8000	 Buena precipitación proteica
Condición nº 18			
0,2 M Acetato de magnesio tetrahidrato	0,1 M Cacodilato sódico trihidrato, pH 6,5	20% (p/v) PEG 18000	 Buena precipitación proteica

Sal	Tampón	Precipitante	Gota
Condición nº 21			
0,2 M acetato de magnesio tetrahidrato	0,1 M cacodilato sódico trihidrato, pH 6,5	30% (v/v) (+/-)2-Metil-2,4-pentanodiol	 <p>Separación de fase</p>
Condición nº 25			
	0,1 M Imidazol pH 6,5	1,0 M acetato sódico trihidrato	 <p>Clara</p>
Condición nº 28			
0,2 M acetato sódico trihidrato	0,1 M cacodilato sódico trihidrato, pH 6,5	30% (p/v) PEG 8000	 <p>Clara</p>
Condición nº 30			
0,2 m sulfato amónico		30% PEG 8000	 <p>Mala precipitación proteica</p>

Sal	Tampón	Precipitante	Gota
Condición nº 31			
0,2 M Sulfato amónico		30% (p/v) PEG 4000	 Mala precipitación proteica
Condición nº 32			
		0,2 M Sulfato amónico	 Buena precipitación proteica
Condición nº 28			
0,2 M Acetato de sodio trihidrato	0,1 M Cacodilato sódico trihidrato, pH 6,5	30% (p/v) PEG 8000	 Clara
Condición nº 45			
0,2 M Zinc acetate dihydrate	0,1 M Cacodilato sódico trihidrato, pH 6,5	18% (p/v) PEG 8000	 Esferulitas

Sal	Tampón	Precipitante	Gota
Condición nº 46			
0,2 M Acetato de calcio hidrato	0,1 M Cacodilato sódico trihidrato, pH 6,5	18% (p/v) PEG 8000	 Piel

PEG: Polientilenglicol

Test 4: Una vez que se dispone de cacodilato sódico fue posible reproducir las condiciones de la bibliografía [Bond *et al.*, 1999; Crowley *et al.*, 2008]. Sin embargo, las condiciones de temperatura no fueron las más adecuadas y no se puede garantizar que esta se mantuviera de forma constante a 20 °C. Las condiciones de partida fueron: gota con 1 µl proteína oxidada 10 mg ml⁻¹ en agua ultrapura mezclada con 1 µl de solución precipitante. En cada pocillo se depositó 0,3 ml de solución precipitante. En la tabla TMS 3 se detallan las composiciones de las diferentes soluciones precipitantes usadas en este test.

Test 5: Tras obtener un cristal bajo una de las condiciones del test 4, se procedió a repetir las condiciones, sin resultado positivo. Ante ello se decidió modificar las concentraciones de PEG 8000, usando concentraciones de 15 a 18% (p/v). Nuevamente 1 µl proteína oxidada 10 mg ml⁻¹ en agua ultrapura se mezcla con 1 µl de solución precipitante. En cada pocillo se depositó 0,3 ml de solución precipitante. No se obtuvieron mejores resultados de este test que precipitado proteico.

Tabla TMS 4 Composiciones de las soluciones precipitantes usadas en el test 4 de cristalización de Pho-P49G/G50P.

Sal	Buffer	Precipitante	Gota
0,2 M Cloruro de magnesio	0,1 M cacodilato sódico 0,1 M pH 6,5	15% (p/v) PEG 8000	 Posible cristal
0,2 M Acetato de zinc dihidrato	0,1 M cacodilato sódico 0,1 M pH 6,5	10% (p/v) PEG 8000	 Esferulitas
0,2 M Acetato de zinc dihidrato	0,1 M cacodilato sódico 0,1 M pH 6,5		 Buena precipitación proteica

Test 6: Igual que Test 4, pero con la temperatura nuevamente bajo control y fijada a 19 °C. Se probó también con diferentes concentraciones de proteína (10, 12 y 14 mg ml⁻¹)

Con respecto a las diferentes concentraciones de Pc, sólo en las condiciones que incluían 10% (p/v) PEG 8000 y 0,2 M Acetato de zinc dihidrato se observaron algunas diferencias. Mientras que con 10 mg ml⁻¹

¹ se observaba un buen precipitado y algunas esferulitas, a 12 y 14 mg ml⁻¹ sólo se obtuvo precipitado.

Tabla TMS 5. Composiciones de las soluciones precipitantes usadas en el test 5 de cristalización de Pho-P49G/G50P.

Sal	Buffer	Precipitante	Gota
0,2 M Cloruro de magnesio	0,1 M cacodilato sódico 0,1 M pH 6,5	15% (p/v) PEG 8000	 Buen precipitado proteico
0,2 M Cloruro de magnesio	0,1 M cacodilato sódico 0,1 M pH 6,5	16% (p/v) PEG 8000	 Buen precipitado proteico
0,2 M Cloruro de magnesio	0,1 M cacodilato sódico 0,1 M pH 6,5	17% (p/v) PEG 8000	 Mal precipitado proteico
0,2 M Cloruro de magnesio	0,1 M cacodilato sódico 0,1 M pH 6,5	18% (p/v) PEG 8000	 Mal precipitado proteico

Test 7: Disminuyendo la concentración de proteína y/o de precipitante es posible moverse de la fase de esferulitas a la de nucleación. Por tanto pruebo con diferentes concentraciones de PEG 8000 (10, 9, 8 y 7 p/v), 0,2 M Acetato de zinc y 0,1M cacodilato sódico pH 6,5, con concentraciones de Pc inferiores a 10 mg ml⁻¹ (10, 8 y 6 mg ml⁻¹). El único resultado fueron gotas con proteína precipitada.

Tabla TMS 6. Composiciones de las soluciones precipitantes usadas en el test 6 de cristalización de Pho-P49G/G50P. Concentración de Pc igual a 10 mg ml⁻¹

Sal	Buffer	Precipitante	Gota
0,2 M Cloruro de magnesio	0,1 M cacodilato sódico 0,1 M pH 6,5	15% (p/v) PEG 8000	 Buen precipitado proteico, pero en gran cantidad
0,2 M Acetato de zinc dihidrato	0,1 M cacodilato sódico 0,1 M pH 6,5	10% (p/v) PEG 8000	 Mal precipitado proteico
0,2 M Acetato de zinc dihidrato	0,1 M cacodilato sódico 0,1 M pH 6,5		 Buen precipitado proteico

Test 8: Concentración de Pc a 6 mg ml^{-1} , $0,2 \text{ M}$ Acetato de zinc y $0,1 \text{ M}$ cacodilato sódico pH 6,5. Concentraciones decrecientes de PEG 8000 (6, 4, 3, 2, 1 p/v). A una concentración de 4 y 5 (p/v). de PEG 8000 se observaron unos posibles cristales muy pequeños.



Una tesis no se termina, se abandona