



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea



ZTF-FCT  
Zientzia eta Teknologia Fakultatea  
Facultad de Ciencia y Tecnología



---

FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

---

# TRABAJO FIN DE GRADO

## Bioquímica y Biología Molecular

---

### Análisis de moléculas únicas de proteína con nanoporos

Efectos de mutaciones puntuales en la estabilidad

**Alumno:** *Pablo Martín Baniandrés*  
**Fecha:** Junio 2016

**Director/a**  
*Dr. David Rodríguez Larrea*

**Curso Académico**  
*2015/16*

## Índice

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Materiales y Métodos.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Generación de mutantes.....</b>	<b>5</b>
<b>2.2 Producción y purificación de TRX.....</b>	<b>6</b>
<b>2.3 Estudios de estabilidad: Fluorescencia.....</b>	<b>7</b>
<b>2.4 Estudios de estabilidad: Calorimetría diferencial de barrido         (DSC).....</b>	<b>7</b>
<b>2.5 Marcaje de proteínas.....</b>	<b>7</b>
<b>2.6 Estudios de estabilidad: Single-molecule.....</b>	<b>8</b>
<b>3. Resultados y discusión.....</b>	<b>9</b>
<b>3.1 Estudios de estabilidad: Cinéticas de desplegamiento en urea         seguido por fluorescencia.....</b>	<b>9</b>
<b>3.2 Estudios de estabilidad: Calorimetría diferencial de barrido         (DSC).....</b>	<b>10</b>
<b>3.3 Estudios de estabilidad: Nanoporos.....</b>	<b>12</b>
<b>4. Conclusiones.....</b>	<b>14</b>
<b>5. Bibliografía.....</b>	<b>15</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

Las proteínas son polímeros lineales de L-aminoácidos unidos covalentemente a través de un enlace amida, denominado enlace peptídico. Estructuralmente encontramos varios niveles de organización: secuencia aminoacídica, estructura secundaria (principalmente hélices y láminas beta), motivos estructurales y dominios globulares (estructura terciaria) y estructura cuaternaria (formación de oligómeros de cadenas polipeptídicas independientes) (Blundell y Srinivasan, 1996). Las proteínas presentan una estrecha relación entre estructura y función a nivel molecular y llevan a cabo una muy extensa variedad de funciones. La estructura nativa tridimensional (3D), esta codificada por su secuencia de aminoácidos (Dill y MacCallum, 2012).

La síntesis de proteínas se lleva a cabo por traducción a secuencia aminoacídica de la información genética. Un codón de ARNm codifica para un aminoácido, y así estos se van añadiendo secuencialmente a una cadena polipeptídica, denominada cadena naciente. Cómo esta cadena polipeptídica va saliendo del ribosoma y adquiere la conformación tridimensional que dota a la proteína de función sigue siendo objeto de intenso estudio (Chrzanowska et al., 2011).

En organismos eucariotas, existen dos vías principales que pueden seguir las proteínas en su degradación. La ruta ubiquitina-proteosoma es la principal para la degradación selectiva de proteínas. Utiliza la ubiquitina, un polipéptido de 76 aminoácidos altamente conservado, para marcarlas. Las proteínas ubiquitinizadas o poliubiquitinizadas son a continuación reconocidas y degradadas por estructuras llamadas proteosomas. Tanto la fijación de ubiquitina como la degradación son procesos que requieren de energía en forma de ATP. La otra ruta principal de degradación es la proteólisis lisosomal. En esta vía, los lisosomas, orgánulos vesiculares con un variado contenido en enzimas digestivas y proteasas, digieren proteínas internalizadas mediante distintas vías de endocitosis más o menos selectividad (Vilchez et al., 2014) (Hochstrasser, 1996). Sin embargo, existe otra ruta de degradación vía proteosoma que no requiere marcaje con ubiquitina. Esta vía resulta fundamental en la homeostasis (mantenimiento de los niveles de proteína), sin embargo nuestro conocimiento sobre esta vía es reducido dada la dificultad experimental para estudiarla.

Tanto el plegamiento como el mantenimiento de proteínas en su conformación nativa y funcional 3D son susceptibles de error (Wolff et al., 2014). Además, las proteínas están continuamente expuestas a moléculas altamente reactivas y condiciones que favorecen su

desnaturalización. Las proteínas mal plegadas pueden convertirse en moléculas extremadamente tóxicas principalmente por su tendencia a formar agregados intracelulares (Goldberg, 2003). Es por esto que en la célula existen múltiples procesos que aseguran el buen estado y comportamiento del proteoma, tales como puntos de control de calidad, repuesta al estrés, sistemas de comunicación que se activan durante la duración del estrés así como maquinarias de degradación. El último mecanismo que utilizan las células para evitar estas especies potencialmente tóxicas es la destrucción selectiva de polipéptidos mal plegados o dañados. Cuando la aparición de proteínas mal plegadas supera la capacidad de recuperación y degradación de la célula, estos polipéptidos a menudo forman agregados intracelulares, relacionados con una amplia variedad de enfermedades.

Por otro lado, las proteínas están siendo continuamente degradadas a aminoácidos y reemplazadas por proteínas de nueva síntesis dentro de las células (homeostasis). Este proceso es de particular importancia a la hora de permitir a las células responder a condiciones de estrés, tales como el choque térmico o el estrés oxidativo, así como a señales provenientes del exterior celular (Hochstrasser, 1996). Se puede decir que las proteínas se encuentran en continua regeneración y vigilancia por el sistema proteolítico.

Existen distintos factores que afectan a la tasa de degradación de las proteínas. A grandes rasgos, la velocidad de degradación depende de dos factores principales: i) la afinidad entre sustrato y proteasoma y ii) la energía que requiere la desnaturalización previa a que la proteína sea degradada (para ser degradadas por el proteasoma, las proteínas deben ser desplegadas). Otros factores también pueden afectar, incluyendo la velocidad catalítica de la hidrólisis del enlace peptídico, la disponibilidad de ATP y uniones alostéricas al proteosoma (Cordova et al., 2014).

La desnaturalización previa a la degradación se lleva a cabo por proteínas de la familia AAA+, no se sabe con total certeza como las características físicas de los sustratos nativos afectan a la cinética de degradación. No obstante, estudios recientes sugieren que ClpXP, una forma de proteasoma bacteriano, degrada proteínas siguiendo una cinética que depende de la estabilidad estructural del estado nativo. Así, se ha postulado que el tiempo de vida de una proteína depende de la estabilidad del sustrato en la región que el proteasoma usa para iniciar el proceso de desnaturalización. No obstante, la tasa de degradación no muestra siempre una clara correlación con la estabilidad de las proteínas. Se ha observado que las proteínas AAA+ son capaces de desplegar con mayor facilidad alfa-hélices, que pueden ser desplegadas escalonadamente, en comparación con hojas beta, que requerirían de la ruptura de múltiples

puentes de hidrogeno simultáneamente (Cordova et al., 2014). Qué es la estabilidad, cómo se mide y cómo se relaciona con la degradación de proteínas es el objeto del siguiente trabajo.

*A priori* se puede hablar de dos tipos de estabilidad: Por un lado la estabilidad termodinámica, que es la diferencia de energía entre el estado desplegado, en equilibrio, con la proteína nativa. En el caso más simple, se explica con un modelo de equilibrio entre dos estados, el nativo (N) y el desnaturalizado (U) ( $N \rightleftharpoons U$ ). Este equilibrio se caracteriza por la constante K, donde  $K = [U]/[N]$ , y se relaciona con la variación de energía libre a través de la ecuación  $\Delta G = -RT \cdot \ln(K)$ , donde R es la constante de los gases y T la temperatura absoluta. Por otro lado está la estabilidad cinética, que puede ser entendida como la velocidad con la que una proteína se despliega. Está relacionada la barrera de energía libre que separa al estado nativo del desplegado. Se puede explicar aplicando la teoría del estado de transición, y se relaciona con la barrera de energía libre a través de la ecuación  $k = A \cdot \exp(-\Delta G^\ddagger / RT)$ . Normalmente la termodinámica favorece el estado plegado en condiciones fisiológicas. Sin embargo, en ocasiones el estado desplegado es termodinámicamente más estable, y entonces la proteína mantiene el estado nativo gracias a que es estable cinéticamente (es decir, tarda una escala de tiempo fisiológicamente relevante en desplegarse). Para ello, es necesaria una barrera de energía libre suficientemente elevada que separe el estado nativo del desplegado. La estabilización cinética es, por tanto, requerida en muchos casos, ya que las proteínas a menudo trabajan en condiciones (medio extracelular extremo o intracelular altamente poblado) en las que el estado desnaturalizado es irreversible (Sanchez-Ruiz, 2010).

Por otro lado, existe un tipo de estabilidad menos estudiado y que viene tomando un mayor protagonismo en los últimos años, la estabilidad mecánica. Este tipo de estabilidad se refiere a la capacidad de la proteína para permanecer plegada cuando se aplican fuerzas de extensión entre dos puntos de la misma. Estudios de los últimos años parecen indicar que este tipo de estabilidad se encuentra estrechamente relacionado con el tipo de estructura secundaria y su orientación relativa a los puntos de extensión (su topología), de forma que la resistencia a la extensión mecánica puede ser elevada o baja dependiendo de la ubicación de los puntos desde los que se ejerce la fuerza (Brockwell, 2007).

Los distintos tipos de estabilidad proteica se pueden medir haciendo uso de diferentes técnicas en las que se induce el desplegamiento/plegamiento con temperatura y/o agentes desnaturalizantes. La calorimetría diferencial de barrido (DSC), es una técnica que mide la cantidad de calor absorbido cuando una muestra es calentada. Para una proteína, mide la absorción de calor asociado con la desnaturalización de una muestra de proteína cuando se

calienta a un ritmo y presión constantes (exceso de capacidad calorífica a presión constante -  $C_p$ ) (Johnson, 2013). La transición entre el estado nativo y el desplegado aparece como un pronunciado pico endotérmico cuyo máximo define la temperatura de transición ( $T_m$ ). En los casos en los que la proteína muestra reversibilidad en la desnaturalización, los datos se pueden ajustar a modelos termodinámicos y obtener parámetros como entalpía,  $\Delta C_p$  (diferencia de capacidad calorífica entre los estados nativo y desplegado) y  $T_m$  (temperatura a la cual  $K = 1$ ,  $\Delta G=0$ ) (Bruylants et al., 2015).

El desplegamiento/plegamiento de proteínas también se puede monitorizar mediante técnicas fluorimétricas, obteniendo información termodinámica y cinética de la transición (dependiendo del experimento). Para ello se mide la variación en intensidad de fluorescencia modificando temperatura o concentración de un agente desnaturalizante como la urea. Los fluoróforos pueden ser intrínsecos (residuos de triptófano y tirosina, coenzimas) o bien sondas extrínsecas (fluoresceína, pireno, etc) (Eftink, 1994). La cinética de desplegamiento proteico puede ser monitorizado mediante el aumento de la intensidad de fluorescencia como función del tiempo ( $\lambda_{em}=360$  nm ,  $\lambda_{ex}= 278$  nm) cuando la proteína se expone a altas concentraciones de urea. Así, se puede obtener información de la cinética de desplegamiento (es decir, de su estabilidad cinética).

Otra forma de estudiar la estabilidad proteica, es mediante pinzas ópticas o microscopía de fuerza atómica, que permiten aplicar fuerzas a moléculas individuales y detectar los cambios de distancia entre los dos puntos en los que se aplica la fuerza. Estas respuestas reflejan transiciones conformacionales. Las pinzas ópticas modernas tienen una resolución y rango dinámico extremadamente elevado midiendo fuerzas (0.02-250 pN), distancias (0.2 nm- 50 micrometros), y tiempos (0.1 ms – 3000 s) (Zhang et al, 2013). Constituyen una herramienta ideal para caracterizar la respuesta mecánica de macromoléculas como ADN, ARN y proteínas.

Nuevas estrategias permiten estudiar la estabilidad de las proteínas a través de la tecnología de nanoporos. Esta técnica mide la corriente iónica que pasa a través de un único poro de 1-2 nanómetros inserto en una membrana cuando se aplica una diferencia de potencial (voltaje). Si un analito se introduce en el nanoporo, produce el bloqueo de la corriente iónica. El análisis de la magnitud del bloqueo, su duración, y otros parámetros de la señal (ruido, espectro de frecuencias,...) revela información acerca de la identidad del analito (Wu et al., 2014). Dada su sensibilidad, se utiliza para secuenciar ADN, dado que cada base que atraviesa el poro produce un bloqueo diferente. Aplicada a proteínas, el voltaje aplicado tira de un

extremo de la proteína, y como la proteína tiene un diámetro mayor que el del poro, la proteína es forzada a desplegarse (Bayley et al., 2012). Este hecho no es trivial, puesto que imita el proceso de desplegamiento en la degradación proteica mediada por proteasoma. Esta metodología por tanto permite observar la cinética de desplegamiento y translocación de proteínas a través de nanoporos, en sistemas modelo cercanos a los nanoporos biológicos que permiten el transporte de macromoléculas a través de membranas o la degradación proteica (Rodríguez-Larrea and Bayley, 2014).

La velocidad de degradación de una proteína puede depender de su estabilidad, sin embargo las medidas de estabilidad tradicionales no correlacionan con la degradación. La tecnología de molécula única de nanoporos ofrece un sistema modelo potencialmente idóneo para estudiar una estabilidad que sí correlacione con la degradación. Para comprobarlo, se pretende estudiar la estabilidad mecánica de una batería de proteínas mutantes de tiorredoxina (TRX) cuando son forzadas a desplegarse en su paso a través de nanoporos. Se compararan los resultados con los de un ensayo de degradación de las mismas proteínas mutantes por el sistema proteasomal ClpXP (en el desarrollo posterior de este proyecto). Así mismo, se caracterizaran las estabilidades termodinámica y cinética de cada proteína mutante usando métodos más tradicionales (DSC y desnaturalización inducida por urea).

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. GENERACIÓN DE MUTANTES**

Para la obtención de la librería de mutantes de TRX se empleó el kit comercial de Quikchange Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies) mediado por PCR. Para la obtención de los 13 mutantes (K100T, K100G, K100M, K100E, K100V, K100S, K100I, K100Y, K100A, K100N, K100P, K100D, K100R) se preparó una PCR como sigue: 5 µl del buffer de reacción 10X, 0.5 µl de ADN molde: plásmido pET30A con el gen que codifica para TRX V5-C109 y resistencia a kanamicina, 1.2 µl de una mezcla de cebadores degenerados (el codón para el residuo 100 presenta las combinaciones para los 20 posibles aa), 1µl de la mezcla de dNTPs y 41.3 µl de ddH<sub>2</sub>O (agua destilada ultrapura), llevando el volumen de reacción hasta los 49 µl. A continuación se añadió 1µl de PfuUltra HF ADN polimerasa (2.5 U/µl) y se estableció un protocolo de PCR con los siguientes parámetros: Ciclo 1: 95°C 30s, ciclos 2-16: 95°C 30s

+ 55°C 1min + 68°C 6min. Los mutantes (K100H, K100Q, K100L) se obtuvieron en reacciones independientes en las que se emplearon cebadores codificando H, Q y L para el residuo 100, respectivamente, siguiendo el mismo protocolo de reacción que el descrito anteriormente para los otros 13 mutantes. Los productos de PCR se incubaron durante una hora a 37 °C con 1µl del enzima de restricción Dpn I. A continuación se transformaron por electroporación bacterias *E. coli* BL21(DE3) con el producto de digestión y se crecieron en placas de medio LB-agar conteniendo 30 µg/ml de Kanamicina y se incubaron a 37 °C overnight. 60 colonias se crecieron en preinóculos de 3 mL de medio LB, 30 µg/ml de kanamicina. A continuación se realizó una extracción de ADN plasmídico con el kit Nucleospin®Plasmid (NoLid, MACHEREY-NAGEL) y el ADN resultante se verificó por secuenciación Sanger, obteniendo así los primeros 13 mutantes. Para los otros 3 mutantes, se realizaron 3 transformaciones en *E.coli* BL21(DE3) se sembraron en placa y de cada una se extrajo el ADN de 3 colonias, que se verificó por secuenciación Sanger.

## **2.2 PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE TRX**

Glicerol (al 25% v:v) de los preinóculos positivos de BL21(DE3) se inocularon en 500 ml de medio LB conteniendo 30 µg/µl de kanamicina a 37 °C overnight. Una vez el cultivo estaba saturado se centrifugó el medio a 6000xg durante 20 minutos a 4°C y el precipitado de células se resuspendió en 500 ml de medio LB fresco conteniendo 30 µg/µl de kanamicina. Tras una hora de incubación a 37 °C se indujo la expresión del gen mutado inserto en pET30A con isopropil 1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG) con una concentración final de 1 mM. Los cultivos se incubaron durante 4 horas más a 37 °C para después volver a centrifugar el medio a 6000xg durante 20 minutos a 4°C. El precipitado de células se resuspendió en 10 mL de tampón de purificación [Tris-HCl 30 mM, EDTA 1 mM, pH 8.3]. La suspensión de células se ultrasonicó con los siguientes parámetros: 20 ciclos de 60 segundos (20 segundos funcionando seguido de 40 segundos apagado) rodeadas de hielo en todo momento. Para separar las proteínas de los restos celulares se centrifugaron las muestras a 4 °C y 6000xg durante 20'. Se desechó el precipitado y al sobrenadante se añadieron en agitación a 4 °C y gota a gota, 2.5 mL de una disolución de sulfato de estreptomicina 10 % w/v en tampón de purificación. Tras 1 hora de incubación, se centrifugó a 12000xg durante 20' a 4 °C. Se desechó el precipitado y el sobrenadante se cargó en una columna Superdex 75 previamente equilibrada en tampón de purificación. Las fracciones correspondientes al peso molecular de TRX (aprox. 12.000) se cargaron en una columna de intercambio iónico Mono Q HFF previamente equilibrada en tampón de purificación. La proteína TRX mutante se eluyó en un gradiente 0-1 M NaCl en tampón de purificación. Las fracciones que contenían TRX mutantes

se verificaron por SDS-PAGE, su concentración se determinó por el máximo de absorbancia a 280 nm usando el coeficiente de extinción molar calculado para la secuencia y se alicuotaron y guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **2.3. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD: FLUORESCENCIA**

Las medidas de estabilidad cinética de las proteínas TRX mutantes se llevaron a cabo mediante un ensayo de desnaturalización inducido por urea medido por fluorescencia. Para ello se preparó una disolución de Urea 10 M en el tampón [Hepes 10 mM, KCl 150 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, TCEP (tris(2- carboxietil)fosfina) (Sigma Aldrich) 0.1 mM,  $\text{pH}=7.2$ ]. 50  $\mu\text{L}$  17  $\mu\text{M}$  de proteína TRX mutante y 1450  $\mu\text{L}$  urea a distintas concentraciones (preparada por dilución en el mismo tampón) se mezclaron en una cubeta de fluorescencia de 1.5 mL. Seguidamente, se introdujo la cubeta en un fluorímetro Fluorolog Jobin Yvon (Horiba) y se siguió la intensidad de fluorescencia, ( $\lambda_{\text{ex}} = 278$  nm y  $\lambda_{\text{em}} = 360$  nm), durante un tiempo de 300 s y con agitación continua en las cubetas. Para cada mutante, se realizaron cinéticas de desnaturalización a 5 concentraciones de urea (determinada a posteriori a través del índice de refracción). Los datos se ajustaron a una cinética de primer orden en MatLab para obtener el valor de la constante cinética de desnaturalización ( $k_u$ ).

### **2.4. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD: DSC**

Las medidas de estabilidad termodinámica de TRX mutantes se llevaron a cabo en un calorímetro diferencial de barrido VP-DSC (MicroCal). Las proteínas se prepararon medio tampón [Hepes 10 mM, KCl 150 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, TCEP (tris(2- carboxietil)fosfina) (Sigma Aldrich) 0.1 mM,  $\text{pH}=7.2$ ] a concentraciones de 0.5 mg/ml. El rango de temperatura fijado para el barrido fue de  $15^{\circ}\text{C}$ - $110^{\circ}\text{C}$ , con un aumento gradual de  $1.5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ . Los termogramas se ajustaron a un modelo reversible de dos estados en Matlab para obtener las temperaturas de desnaturalización ( $T_m$ ) y entalpías de desnaturalización de cada TRX mutante.

### **2.5 MARCAJE DE PROTEÍNAS**

Para ser analizadas con nanoporos las proteínas deben estar marcadas en el extremo C-terminal con un polímero cargado negativamente. El marcaje se llevó a cabo con un polímero poliacrílico terminado en DDMAT de Sigma Aldrich. 10 mg del mismo se disolvieron en 1 mL de tampón Hepes 10 mM  $\text{pH}= 7.2$ , se añadieron 0.3  $\mu\text{L}$  de hexilamina para liberar el grupo protector DDMAT, dejando un grupo tiol libre, y una disolución de 2.5 mg de DTP (ditiopirimidil) con nombre comercial Aldrithiol®-2 (Sigma Aldrich) en 300  $\mu\text{L}$  de

acetronitrilo, para activar este grupo tiol con un grupo pirimidil. La mezcla de reacción se incubó durante una hora a temperatura ambiente. El polímero activado se purificó en una columna PD-10 pre-packed column (GE HEALTHCARE), previamente equilibrada en tampón de purificación [Tris 30mM, EDTA 1mM, pH=8.3]. Al mismo tiempo una alícuota de proteína previamente reducida se mezcló con el polímero activado y se incubó a temperatura ambiente durante 5 horas. Tras la incubación, la reacción se cargó en una columna de intercambio iónico previamente equilibrada en tampón y la TRX marcada en su extremo C-terminal (una cisteína) se separó de la no marcada con un gradiente 0-2 M NaCl en tampón de purificación. El marcaje se verificó por SDS-PAGE y las muestras se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 2.6 ESTUDIOS DE ESTABILIDAD: SINGLE-MOLECULE

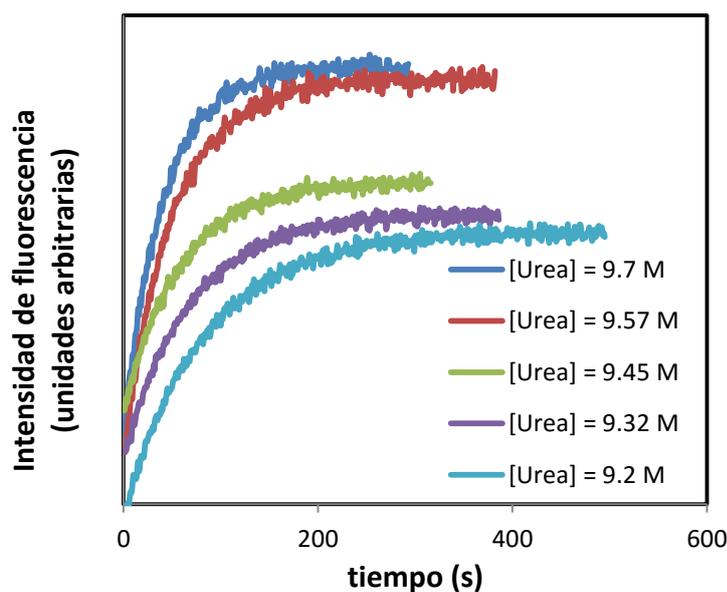
Para la generación de poros de alfa-hemolisina, los monómeros se expresaron en *E.coli* y se heptamerizaron mediante una incubación con membranas de glóbulos rojos de sangre de conejo. Para la preparación del sistema experimental se hizo manualmente una bicapa de 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (Avanti Polar Lipids) a lo largo de una apertura de un diámetro de 100  $\mu\text{m}$  en un film de teflón (Goodfellow), que separaba dos compartimentos de 1 mL (denominados cis y trans) fabricados en una cámara de Delrin (un material polimérico muy aislante de la electricidad). Para ello se añadió con un capilar de vidrio, 1 gota de una disolución de hexadecano en pentano al 1% lo más cerca posible de la apertura del film a ambos lados del mismo. Se esperaron unos minutos a que se evaporase el pentano y se añadió 1 mL de tampón [Hepes 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, KCl 2 M, pH=7.2] a cada una de los compartimentos de la cámara. La cámara se conectó por medio de dos electrodos de Ag/AgCl a un amplificador (Axopatch 200B, Axon Instruments) y se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de una disolución de 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (Avanti Polar Lipids) en pentano a cada compartimento 5 mg/mL. Se esperaron unos minutos a que se evaporase el pentano y mediante el pipeteo arriba y abajo se creó la bicapa lipídica a lo largo de la apertura del film. A continuación se añadió 1  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -hemolisina 0.01 mg/mL en tampón [Hepes 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, KCl 150 mM, pH=7.2] al compartimento cis y tras la inserción del primer poro en la bicapa, el compartimento cis fue perfundido con una pipeta repetidas veces con tampón fresco [Hepes 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, KCl 2 M, pH=7.2] para eliminar el exceso de  $\alpha$ -hemolisina y así evitar nuevas inserciones. A continuación, ese mismo compartimento fue de nuevo perfundido con tampón fresco [Hepes 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, KCl 150 mM, pH=7.2] para llevar a cabo las medidas experimentales (en condiciones asimétricas de concentración de KCl). Estas medidas se realizaron a  $22^{\circ}\text{C} \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ . Se añadieron distintos volúmenes de las muestras de proteína mutante marcada en su extremo C-terminal al compartimento cis. La

señal que producían las proteínas a su paso por el nanoporo detectada por el amplificador (Axopatch 200B, Axon Instruments) se filtró a 5 kHz y los datos fueron recogidos a 20 kHz con un digitalizador Digidata 1440A (Axon instruments). Los datos experimentales fueron analizados con el software pClamp (Molecular Devices).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD: CINÉTICAS DE DESPLEGAMIENTO EN UREA SEGUIDO POR FLUORESCENCIA.

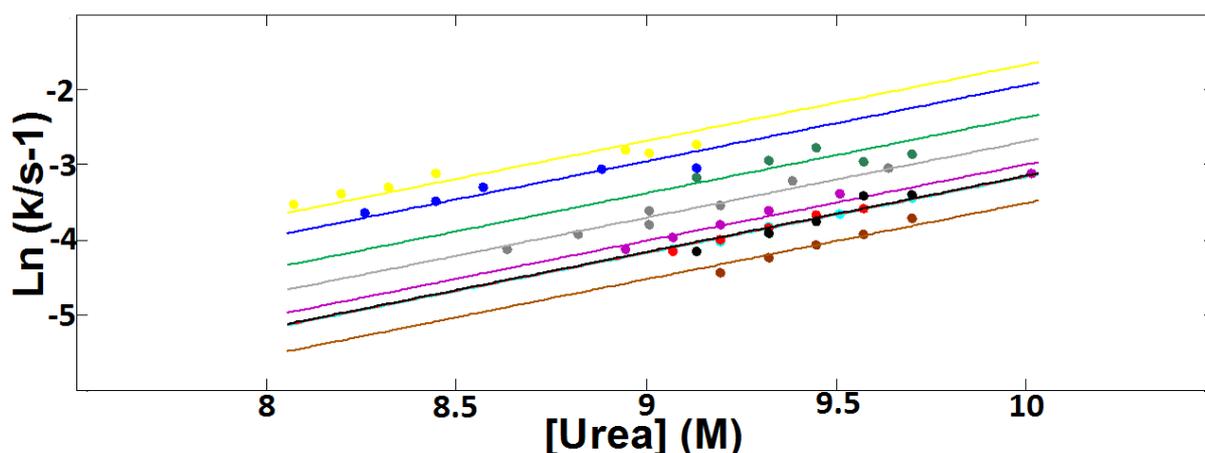
Los ensayos de desnaturalización inducidos por urea reflejan la velocidad a la que se desnaturaliza el estado nativo. Estas cinéticas correspondían a cinéticas de primer orden (**Figura 1**). Se realizaron ensayos de desnaturalización a distintas concentraciones de urea para obtener la dependencia de la constante cinética de desplegamiento con la concentración de desnaturalizante.



**Figura 1.** Representación de las cinéticas de desplegamiento del mutante K100I a las distintas concentraciones de urea indicadas. Se representa el aumento de la intensidad de emisión de fluorescencia a  $\lambda_{em} = 360$  nm a lo largo del tiempo ( $\lambda_{ex} = 280$  nm). Las medidas se detuvieron cuando la intensidad de fluorescencia llegó a su máximo.

La representación para cada mutante del logaritmo neperiano de las constantes de desplegamiento frente a la concentración de urea muestra un aumento lineal del  $\ln(k_u)$  a medida que aumenta la concentración de urea (**Figura 2**). Esta relación lineal determina un aumento exponencial de la  $k_u$  con el aumento de la concentración de urea, dicho de otro

modo, la urea tiene un efecto lineal sobre la energía libre de activación del proceso de desnaturalización. Además, se observa un considerable grado de paralelismo entre las rectas de cada mutante, lo cual sugiere que las mutaciones no producen cambios en la exposición al solvente en el estado nativo ni en el estado de transición. K100I y WT parecen ser los mutantes más estables a la desnaturalización por urea, es decir, los que presentan una mayor estabilidad cinética. La mayor parte de las mutaciones eran desestabilizantes, ello se debe a que la estabilidad es uno de los factores que más determinan la evolución de proteínas y por ello en cada posición de la secuencia solemos encontrar aminoácidos que optimizan la estabilidad.

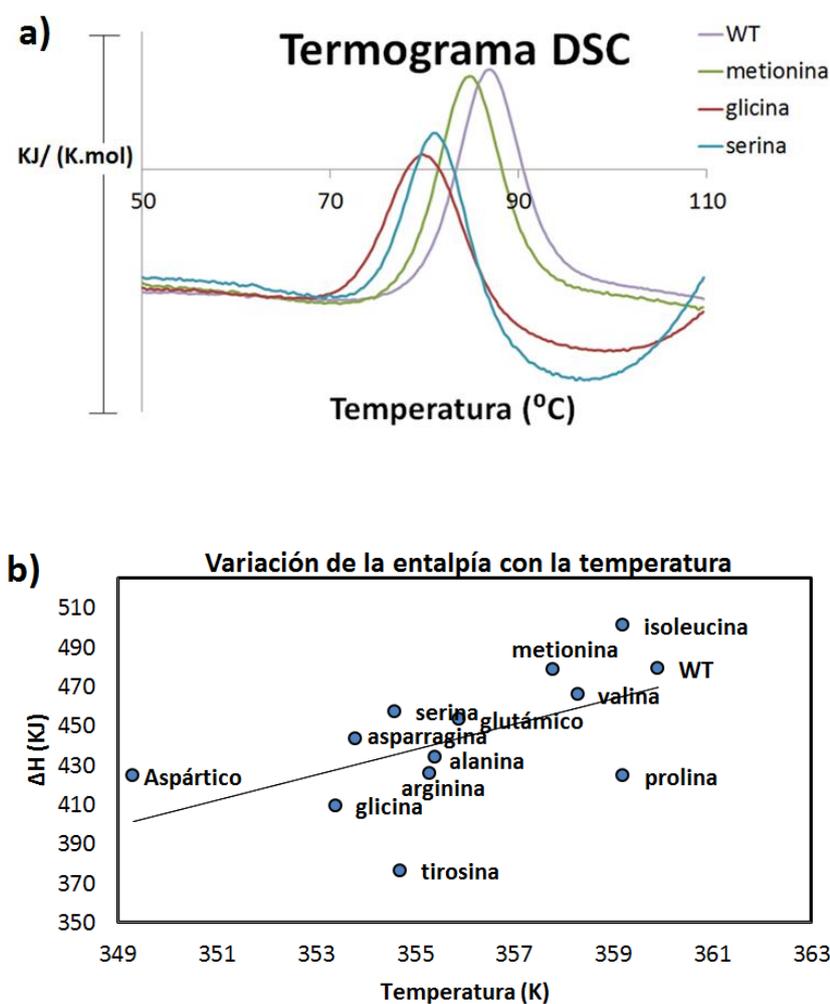


**Figura 2.** Representación del logaritmo neperiano de las constantes de desplegamiento ( $k_u$ ) frente a la concentración de urea. Cada línea unida por puntos de un color representa cada uno de los mutantes: K100S, K100A, K100T, K100Y, K100M, K100I, en amarillo, azul, verde, gris, rosa y marrón, respectivamente. Solapados en una misma línea aparecen K100R, K100P y WT, en azul claro, rojo y negro, respectivamente.

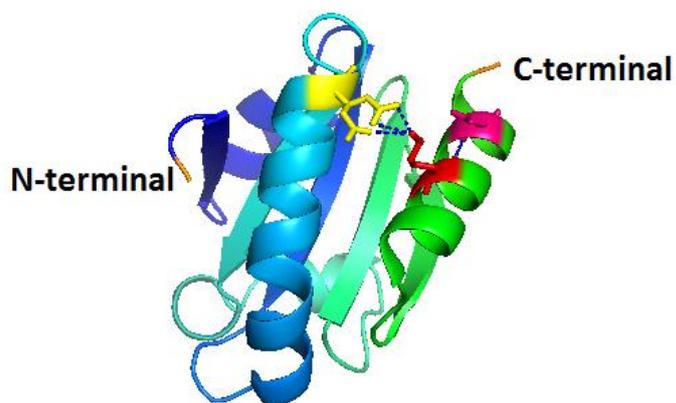
### 3.2 ESTUDIOS DE ESTABILIDAD: CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

Las medidas de calorimetría diferencial de barrido generaron unos termogramas que muestran una clara transición entre el estado nativo y el desnaturalizado, que se puede observar como un pico (**Figura 3a**). La reversibilidad de esta transición se comprobó para cada mutante realizando un segundo barrido sobre la misma muestra. TRX es un modelo típico de estudio de transiciones de dos estados, y los datos para todos los mutantes se ajustaron correctamente a este modelo. Además, la correlación entre entalpía y  $T_m$  suministra un valor de cambio de capacidad calorífica semejante al ya descrito por la bibliografía, lo que permite utilizar la  $T_m$  como un indicador de la estabilidad termodinámica (**Figura 3b**). Los mutantes K100G o K100D presentan las temperaturas de desnaturalización más bajas, algo esperable dado que la

glicina suele desestabilizar alpha-helices (el residuo 100 se encuentra en una alpha-helice) y en el caso del aspartico porque supone una inversión de carga en un entorno optimizado para que exista una carga positiva (**Figura 4**). Por el contrario, mutantes como K100R y K100I muestran valores de  $T_m$  más cercanos a la de WT, hecho que puede explicar la carga positiva de la arginina y la similitud de la cadena hidrocarbonada de la lisina con la cadena lateral de la isoleucina. WT por su parte es la proteína termodinámicamente estable.



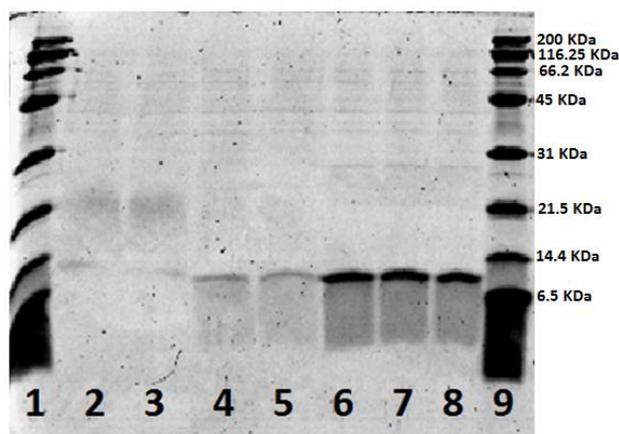
**Figura 3.a)** Termogramas de los mutantes K100D, K100T y K100V. El máximo de cada pico se corresponde con la temperatura de desnaturalización de cada uno de ellos. Se observa el desplazamiento de la  $T_m$  para los mutantes K100M, K100G, K100S y WT. **b)** Temperaturas de desnaturalización frente a las entalpías de desnaturalización para los distintos mutantes.



**Figura 4.** Representación tridimensional de la estructura de la tiorredoxina de E.Coli. En rojo, rosa y amarillo los residuos K100, D104 y E48 respectivamente, que muestran interacciones iónicas a través de sus cadenas laterales.

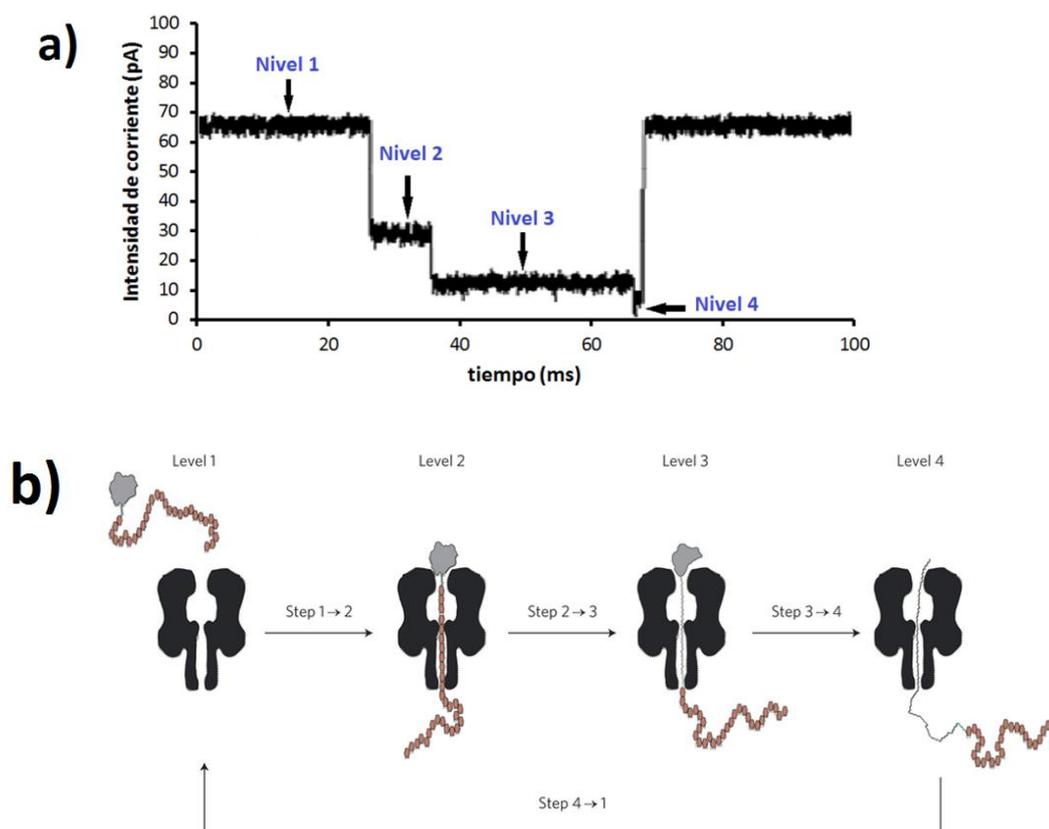
### 3.3 ESTUDIOS DE ESTABILIDAD: NANOPOROS

Para los experimentos en nanoporos se marcaron los mutantes de TRX con un polímero poliacrílico (cargado negativamente) en el extremo C-terminal. Las proteínas marcadas se purificaron por intercambio iónico y se verificaron por SDS-PAGE (**Figura 5**). Las muestras se añadieron al compartimento cis de una cámara en la cual previamente se habían separado los compartimentos cis y trans con una membrana lipídica, y en la cual se había insertado un único nanoporo. El potencial eléctrico que se aplica entre los dos compartimentos de la cámara, atrae al polímero poliacrílico hacia el poro, genera una fuerza en la región C-terminal de la proteína y tira de ella provocando su desplegamiento.



**Figura 5.** SDS-PAGE de proteína marcada con polímero. En las calle 1 y 9, el marcador molecular, en las 2 y 3 proteína marcada, y en las 4 y 5 proteína marcada expuesta al agente reductor ditiotreitól, que rompe el enlace disulfuro entre proteína y polímero. Las calles 6 y 7 son proteína sin marcar.

Este proceso genera una señal eléctrica típica con distintos niveles que reflejan los distintos pasos: primero el polímero enhebra el poro, segundo se desnaturaliza la región C-terminal de la proteína generando un intermediario, tercero este intermediario se desnaturaliza y finalmente la proteína desplegada atraviesa completamente el poro (**Figura 6**). Este modelo molecular ya ha sido descrito anteriormente (Rodríguez-Larrea and Bayley, 2013).



**Figura 6.** a) Señal de corriente eléctrica generada por el desplegamiento y translocación de una molécula de proteína. Se indican los distintos niveles de corriente eléctrica. b) Modelo molecular que explica los distintos niveles de corriente eléctrica observados en a). Se muestra la proteína de color gris y el polímero poliacrílico cargado negativamente en color marrón.

La duración del nivel 2 es un reflejo de la estabilidad cinética de la proteína (es decir, de su estabilidad mecánica contra este mecanismo de desnaturalización). Este es el tiempo que permanece el polímero tirando de la proteína antes de que esta comience a desplegarse y entre en el poro. Las proteínas que presenten una estabilidad mecánica elevada, generaran eventos con mayor duración del nivel 2, mientras que para proteínas poco estables, la duración de este nivel es menor. A partir de la distribución de estos tiempos del nivel 2 (**Figura 6**), se puede obtener las constantes de desplegamiento en el nanoporo medidas a 50 mV (**Tabla 1**). El mutante K100S es el más inestable de los tres medidos, con una  $k_{u,50mV}$  de  $954.9 \text{ s}^{-1}$ , WT es el más estable, con una  $k_{u,50mV}$  de  $91.19 \text{ s}^{-1}$  y el mutante K100T muestra una estabilidad intermedia, con una  $k_{u,50mV}$  de  $457.8 \text{ s}^{-1}$ . Estos resultados parecen indicar que el efecto

desestabilizante que provoca la serina es mayor que el de la treonina. La presencia de un grupo metilo menos en la cadena lateral de la serina, en comparación con la treonina, puede explicar este hecho. La cadena lateral de la lisina está constituida por un esqueleto carbonado de cuatro carbonos unidos de forma lineal, una estructura que se asemeja más a la cadena lateral del aminoácido treonina (formada por dos carbonos unidos a un grupo hidroxilo) que a la del aminoácido serina (un único carbono unido a un grupo hidroxilo).

Mutantes (k100-->)	Tm (K)	Ku 9M (s-1)	Ku 50mV (s-1)
Alanina	355.4	0.052	
Arginina	355.3	0.015	
Aspartico	349.3		
Glicina	353.4		
Isoleucina	359.2	0.011	
Metionina	357.8	0.018	
Tirosina	354.7	0.025	
Treonina		0.034	457.8
Glutamico	355.9		
Valina	358.3		
Serina	354.6	0.069	954.9
Asparragina	353.8		
Prolina	359.2	0.016	
WT	359.9	0.016	91.19

**Tabla 1:** Resumen de los parámetros de estabilidad termodinámica, cinética y mecánica de los distintos mutantes. Para cada mutante se indica la temperatura de transición (Tm), constante de desplegamiento a una concentración 9 M de urea ( $k_{u,9M}$ ) y constante de desplegamiento en el nanoporo a 50 mV ( $k_{u,50mV}$ ).

#### 4. CONCLUSIONES: RELACIÓN ENTRE LOS DISTINTOS PARÁMETROS DE ESTABILIDAD

La tabla 1 muestra los distintos indicadores de estabilidad: Tm para estabilidad termodinámica,  $k_u$  a 9 M urea para estabilidad cinética y  $k_u$  a 50 mV para la estabilidad en el nanoporo. Si bien es necesario obtener más resultados y el proyecto está en curso, se pueden observar varias conclusiones.

1.- Correlación entre estabilidad termodinámica y estabilidad cinética global (con desplegamiento inducido con urea). La existencia de esta correlación era esperable puesto que ya ha sido descrita en la bibliografía científica (Sanchez-Ruiz, 2010). Se debe, esencialmente, a que el estado de transición para el desplegamiento (que determina la velocidad a la cual

ocurre la reacción de desplegamiento), estructuralmente comparte características del estado nativo y del estado desplegado. Por tanto, los efectos energéticos en la estabilidad termodinámica (que mide la diferencia de energía entre los estados nativo y desplegado) producidos por las mutaciones tienen un impacto similar en la estabilidad cinética.

2.- Correlación entre las anteriores estabildades y la estabilidad cinética medida con el nanoporo. Si bien quedan muchos mutantes por analizar, se puede observar que el WT es más estable tanto termodinamicamente como cinéticamente.

Nuestros resultados preliminares sugieren que cuando las mutaciones se localizan cerca del punto desde el cual se tira en la desnaturalización co-translocacional, los efectos en la estabilidad son similares tanto si hablamos de estabilidad termodinámica, como de estabilidad cinética global, como de estabilidad mecánica vectorial (la que se mide cuando se tira desde un punto de la proteína a través de un poro).

Este trabajo tendrá continuidad estudiando las estabildades de mutaciones, esta vez, localizadas en la zona N-terminal de la proteína. Además, tanto los mutantes en el C-terminal como en el N-terminal serán sujetos a ensayos de degradación para ver como las distintas estabildades se relacionan con la degradación.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

Blundell, T. L., & Srinivasan, N. (1996). Symmetry, stability, and dynamics of multidomain and multicomponent protein systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(25), 14243-14248.

Brockwell, D. J. (2007). Probing the mechanical stability of proteins using the atomic force microscope. *Biochemical Society Transactions*, 35(6), 1564-1568.

Bruylants, G., Wouters, J., & Michaux, C. (2005). Differential scanning calorimetry in life science: thermodynamics, stability, molecular recognition and application in drug design. *Current medicinal chemistry*, 12(17), 2011-2020.

Chrzanowska-Lightowlers, Z. M., Pajak, A., & Lightowlers, R. N. (2011). Termination of protein synthesis in mammalian mitochondria. *Journal of biological Chemistry*, 286(40), 34479-34485.

Cordova, J. C., Olivares, A. O., Shin, Y., Stinson, B. M., Calmat, S., Schmitz, K. R., ... & Sauer, R. T. (2014). Stochastic but highly coordinated protein unfolding and translocation by the ClpXP proteolytic machine. *Cell*, 158(3), 647-658.

Dill, K. A., & MacCallum, J. L. (2012). The protein-folding problem, 50 years on. *Science*, 338(6110), 1042-1046.

Eftink, M. R. (1994). The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. *Biophysical journal*, 66(2 Pt 1), 482.

Goldberg, A. L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*, 426(6968), 895-899.

Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annual review of genetics*, 30(1), 405-439.

Johnson, C. M. (2013). Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability. *Archives of biochemistry and biophysics*, 531(1), 100-109.

Rodriguez-Larrea, D., & Bayley, H. (2013). Multistep protein unfolding during nanopore translocation. *Nature nanotechnology*, 8(4), 288-295.

Rodriguez-Larrea, D., & Bayley, H. (2014). Protein co-translocational unfolding depends on the direction of pulling. *Nature communications*, 5.

Rotem, D., Jayasinghe, L., Salichou, M., & Bayley, H. (2012). Protein detection by nanopores equipped with aptamers. *Journal of the American Chemical Society*, 134(5), 2781-2787.

Sanchez-Ruiz, J. M. (2010). Protein kinetic stability. *Biophysical chemistry*, 148(1), 1-15.

Vilchez, D., Saez, I., & Dillin, A. (2014). The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases. *Nature communications*, 5.

Wolff, S., Weissman, J. S., & Dillin, A. (2014). Differential scales of protein quality control. *Cell*, 157(1), 52-64.

Wu, D., Bi, S., Zhang, L., & Yang, J. (2014). Single-molecule study of proteins by biological nanopore sensors. *Sensors*, 14(10), 18211-18222.

Zhang, X., Ma, L., & Zhang, Y. (2013). High-resolution optical tweezers for single-molecule manipulation. *Yale J Biol Med*, 86(3), 367-383.