

## Resum

Les proteïnes HMG (*High Mobility Group*) són un grup de proteïnes cromosòmiques no histones que van ser anomenades així degut a la seva mobilitat electroforètica. Aquest conjunt de proteïnes està dividit en tres grans subfamílies: les HMGA, les HMGB i les HMGN.

Les proteïnes HMGA poden modificar la conformació espacial del DNA, regulant (positivament o negativament) l'expressió de nombrosos gens i influint en molts processos cel·lulars normals com ara el creixement, proliferació, diferenciació i mort cel·lular, i la reparació del DNA. També estan relacionades amb diferents processos patològics, entre ells l'obesitat, la diabetis, l'arteriosclerosi i el càncer. S'ha observat com, en molts tipus de càncers, hi ha una sobre-expressió d'aquestes proteïnes.

Se sap que la interacció HMGA-DNA es dona a través d'uns motius d'unió al DNA anomenats "*AT-hooks*", els quals s'uneixen a regions riques en adenines (A) i timines (T) del DNA. En les proteïnes HMGA es troben tres motius *AT-hook*.

Per a comprendre millor el mecanisme d'acció d'aquestes proteïnes, és important conèixer l'estructura tridimensional que formen els complexos DNA-proteïna. Amb aquesta finalitat es persegueix l'obtenció de co-cristalls de la proteïna HMGA1b(1-90) amb oligonucleòtids sintètics rics en seqüències ATs.

En primer lloc, s'ha expressat la proteïna HMGA1b(1-90) a partir d'un cultiu bacterià d'*Escherichia coli*. Seguidament, s'ha purificat aquesta proteïna fins l'alt grau de puresa requerit utilitzant cromatografia de bescanvi iònic seguida de cromatografia de gel-filtració. Posteriorment, s'han realitzat assajos cristal·logràfics per a obtenir els co-cristalls necessaris per a poder resoldre, mitjançant difracció de raigs X, l'estructura tridimensional del complex oligonucleòtid-proteïna. Els dos oligonucleòtids sintètics emprats en aquest projecte són l' $A_2TA_2T_2AT_2$  i el  $G_3A_3T_3C_3$ . En una última etapa del projecte, s'han realitzat també assajos cristal·logràfics amb un pèptid sintètic que es correspon amb el tercer "*AT-hook*" de la proteïna d'estudi i l'oligonucleòtid  $A_2TA_2T_2AT_2$ .





# Sumari

<b>RESUM</b>	<b>1</b>
<b>SUMARI</b>	<b>3</b>
<b>1. GLOSSARI</b>	<b>5</b>
<b>2. PREFACI</b>	<b>7</b>
2.1. Origen del projecte .....	7
<b>3. INTRODUCCIÓ</b>	<b>9</b>
3.1. Objectius del projecte.....	9
3.2. Abast del projecte .....	9
<b>4. LES PROTEÏNES HMGA I EL DNA</b>	<b>11</b>
4.1. Les proteïnes HMGA.....	11
4.1.1. Les proteïnes HMG .....	11
4.1.2. Les proteïnes HMGA.....	13
4.2. El DNA.....	18
4.2.1. Estructura i funció del DNA .....	18
4.2.2. Les seqüències AT .....	21
<b>5. MATERIALS I MÈTODES</b>	<b>23</b>
5.1. Preparació de les mostres d'oligonucleòtids .....	23
5.2. Preparació de les mostres de pèptid .....	24
5.3. Obtenció de la proteïna.....	25
5.3.1. Transformació, inducció i expressió en un cultiu.....	
bacterià d' <i>Escherichia coli</i> .....	28
5.3.2. Tractament del sediment bacterià .....	30
5.4. Purificació cromatogràfica de la proteïna.....	31
5.4.1. Cromatografia de bescanvi iònic .....	31
5.4.2. Cromatografia de gel filtració .....	34
5.4.3. Anàlisi electroforètica en gels de poliacrilamida .....	35
5.4.4. Diàlisi .....	42
5.4.5. Concentració de les fraccions .....	43
5.4.6. Determinació de la concentració de la proteïna .....	45
5.5. Assajos cristal·logràfics.....	46
5.5.1. Fonaments de la cristal·lització .....	46
5.5.2. Condicions per a la cristal·lització .....	48



5.5.3. Metodologies de cristal·lització.....	49
5.6. Difracció de raigs X.....	52
5.6.1. Conceptes previs.....	53
5.6.2. Difracció de raigs X .....	55
5.6.3. Anàlisi dels resultats.....	57
<b>6. RESULTATS</b> .....	<b>59</b>
6.1. Preparació de les mostres d'oligonucleòtid i pèptid .....	59
6.2. Obtenció de la proteïna HMGA1b(1-90).....	61
6.3. Purificació cromatogràfica de la proteïna .....	64
6.3.1. Cromatografia de bescanvi catiònic .....	64
6.3.2. Cromatografia de gel-filtració .....	70
6.4. Concentració final de la proteïna.....	75
6.5. Assajos cristal·logràfics .....	78
6.5.1. Oligonucleòtid A <sub>2</sub> T <sub>2</sub> T <sub>2</sub> A <sub>2</sub> amb proteïna HMGA1b(1-90) .....	78
6.5.2. Oligonucleòtid G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> amb proteïna HMGA1b(1-90) .....	80
6.5.3. Oligonucleòtid A <sub>2</sub> T <sub>2</sub> T <sub>2</sub> A <sub>2</sub> amb el pèptid RKPRGRPCK.....	81
6.6. Anàlisi dels resultats de difracció .....	84
<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>91</b>
<b>AGRAÏMENTS</b> .....	<b>93</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>95</b>
Referències bibliogràfiques (per ordre d'aparició al text).....	95
Bibliografia complementària .....	98
<b>ANNEX A: MATERIALS I MÈTODES</b> .....	<b>101</b>
A.1 Obtenció de cèl·lules competents.....	101
A.2 Inducció amb IPTG .....	103
A.3 Medis de cultiu .....	103
A.4 Tampons Natrix HR2-116 i tampons adaptats .....	104
A.5 La unitat cristal·lina .....	106
<b>ANNEX B: RESULTATS</b> .....	<b>109</b>
B.1 Assajos cristal·logràfics.....	109
<b>ANNEX C: ESTUDI ECONÒMIC DEL PROJECTE</b> .....	<b>119</b>
<b>ANNEX D: ESTUDI DE L'IMPACTE AMBIENTAL</b> .....	<b>125</b>



# 1. GLOSSARI

**A:** adenina.

**Ac. :** acetat.

**Amp:** antibiòtic ampicil·lina.

**Amp<sup>r</sup>:** gen que atorga resistència a l'ampicil·lina.

**AT-hook:** domini d'unió al DNA del grup de proteïnes HMG.

**C:** citosina.

**CM:** carboximetil cel·lulosa.

**C-terminal:** extrem carboxi terminal d'una proteïna (o un pèptid).

**DNA:** àcid desoxiribonucleic.

**DO:** densitat òptica.

**Eq.:** equació

**Fig.:** figura.

**Fr.:** fracció.

**G:** guanina.

**HEPES:** tampó N-[2-hidroxietil]piperazina-N'[2-àcid etansulfònic].

**HMG:** *High Mobility Group*.

**IDP** (intrinsically disordered proteins): proteïnes intrínsecament desordenades.

**IP:** iso-Propanol

**IPTG:** isopropil- $\beta$ -tiogalactopiranosid.

**LB:** medi de cultiu Luria Bertani.

**MES:** tampó àcid 2-morfolinoetanosulfònic.



**MP** (mostra de partida): mostra que s'insereix a la columna cromatogràfica.

**MPD**: 2-metil-2,4 –pentanodiol.

**MWCO** (*molecular weight cut off*): Indica el límit de massa molecular màxima que pot retenir una membrana.

**NaCac**: tampó cacodilat sòdic (dimetil-arsenat sòdic).

**ON**: over night.

**p.**: pàgina.

**pb**: parells de bases.

**PEG**: polietilenglicol.

**PSA**: persulfat d'amoni.

**Rpm**: revolucions per minut.

**SDS**: dodecil sulfat de sodi.

**SF**: separació de fases

**T**: Timina.

**TCA**: àcid tricloroacètic.

**TEMED**: N,N,N',N'-tetrametilen-diamina.

**Tris**: tampó tris(hidroximetil)aminometà.

**Tritó X-100**: èter octilfenòlic del decaetilenglicol.

**Tween**: polisorbat.

**UV**: ultraviolat/da.

**v.**: veure.



## 2. PREFACI

### 2.1 Origen del projecte

Durant l'estudi de les proteïnes nuclears, es va detectar que existia un grup minoritari de proteïnes que no eren histones. Aquest col·lectiu es va classificar en dos subgrups: les proteïnes de baixa mobilitat electroforètica i les proteïnes d'alta mobilitat electroforètica. Les més estudiades són aquestes últimes, i formen la família de proteïnes anomenades HMG (*High Mobility Group*). Són proteïnes bàsiques capaces d'interactuar amb el DNA i regular o intervenir en molts processos cel·lulars normals i patològics (com ara el càncer) (v. apartat 4.1.1).

Aquestes proteïnes, però, no tenen una estructura coneguda, sinó que es troben de forma intrínsecament desordenada (IDP), i només adquireixen una certa estructura en interactuar amb el DNA en zones riques en ATs. Tot i així, encara no es coneixen en detall les interaccions que s'hi estableixen.

Per aquest motiu, és de gran interès conèixer l'estructura d'aquesta proteïna i com interacciona amb el DNA, per tal de contribuir en la lluita de malalties com ara el càncer.







## 3. INTRODUCCIÓ

### 3.1 Objectius del projecte

L'objectiu últim d'aquest projecte és l'obtenció de cristalls dels complexos formats per la proteïna HMGA1b(1-90), o bé un pèptid sintètic corresponent al domini d'unió al DNA de la proteïna (tercer *AT-hook*) (v. apartat 4.1), amb oligonucleòtids rics en seqüències ATs. Aquests cristalls hauran de ser d'una qualitat suficient com per a permetre posteriorment la resolució de l'estructura dels complexos formats.

### 3.2 Abast del projecte

Aquest projecte comprèn les etapes següents:

- Expressió del mutant HMGA1b(1-90) en un cultiu d'*Escherichia coli* mitjançant la tècnica del DNA recombinant.
- Purificació de la proteïna mitjançant cromatografia de bescanvi iònic i, en una segona etapa, cromatografia de gel-filtració.
- Realització dels assajos cristal·logràfics amb la proteïna i diferents oligonucleòtids rics en ATs, buscant les condicions més favorables per a què es formin cristalls del complex. La tècnica cristal·logràfica emprada és la de difusió de vapor en gota penjada.
- Anàlogament, realització dels assajos cristal·logràfics amb el pèptid sintètic corresponent al tercer *AT-hook* de la proteïna d'interès i un oligonucleòtid ric en ATs.





## 4. LES PROTEÏNES HMGA I EL DNA

### 4.1 Les proteïnes HMGA

#### 4.1.1 Les proteïnes HMG

Una proteïna és una macromolècula formada per diferents aminoàcids units entre ells amb un enllaç peptídic. Les proteïnes poden presentar diferents nivells estructurals. L'estructura primària és la seqüència o ordre dels aminoàcids a la cadena polipeptídica, la secundària és una estructura local de tipus regular mantinguda per ponts d'hidrogen, la terciària és un plegament general de la cadena i la quaternària es dona només quan diverses subunitats s'uneixen formant un complex, essent l'estructura quaternària la disposició espacial del conjunt.

Les proteïnes tenen diverses funcions importants dins de l'organisme, com ara suport mecànic, catàlisi enzimàtica, transport, protecció immune, regulació, etc.

Les proteïnes HMG formen un grup de proteïnes bàsiques nuclears que van ser anomenades així per la seva elevada mobilitat en gels àcids de poliacrilamida. Tenen una massa molecular inferior a 30 kDa i un elevat nombre d'aminoàcids carregats positivament [1]. Aquest col·lectiu de proteïnes posseeix propietats bioquímiques i biofísiques similars, i presenten una llarga cua àcida terminal [2].

El grup de les HMG està dividit en tres grans famílies: les HMGA, les HMGB i les HMGN (v. taula 4.1). Les 3 famílies es diferencien entre sí pel motiu d'unió al DNA, pels substrats d'unió més favorables, pels canvis que indueixen en aquests substrats i pel subconjunt de processos cel·lulars que influeixen [2], [3].



Família HMGA	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nomenclatura antiga: HMG-I/Y.</li> <li>• Motiu d'unió al DNA: <i>AT-hooks</i>.</li> <li>• Membres: HMGA1a, HMGA1b, HMGA1c, HMG</li> <li>• N° d'aminoàcids: aprox. 100 -180.</li> <li>• Funcions: actua com un factor estructural de transcripció que regula l'expressió de nombrosos gens.</li> <li>• Unió al DNA: s'uneix al solc menor del DNA en regions riques en ATs (v. apartat 4.2.1).</li> </ul>	
Família HMGB	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nomenclatura antiga: HMG-1/2.</li> <li>• Motiu d'unió al DNA: dominis <i>HMG-box</i>.</li> <li>• Membres: HMGB1, HMGB2, HMGB3.</li> <li>• N° d'aminoàcids: aprox. 200.</li> <li>• Funcions: afecta a processos cel·lulars i extracel·lulars. Promou la transcripció de molts gens.</li> <li>• Unió al DNA: s'uneix al solc menor del DNA amb una especificitat de seqüència limitada o nul·la.</li> </ul>	
Família HMGN	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nomenclatura antiga: HMG 14/17</li> <li>• Motiu d'unió al DNA: <i>nucleosomal binding domain</i>.</li> <li>• Membres: HMGN1, HMGN2, MHGN3a, HMGN3b, HMGN4.</li> <li>• N° d'aminoàcids: aprox. 75-100.</li> <li>• Funcions: desplega la cromatina, així millora l'accessibilitat dels factors de transcripció en la unió amb la cromatina.</li> <li>• Unió al DNA: s'uneix al cromosoma entre les voltes del DNA i les histones.</li> </ul>	

Taula 4.1: Les diferents famílies de proteïnes HMG.



### 4.1.2 Les proteïnes HMGA

La família HMGA està formada per quatre proteïnes, HMGA1a, HMGA1b, HMGA1c i HMGA2, que estan codificades per dos gens específics: el que dona lloc a les A1 i el que dona lloc a l'HMGA2 (v. figura 4.1). Les tres proteïnes HMGA1 s'obtenen per *splicing* alternatiu d'un mateix gen [4], [5].

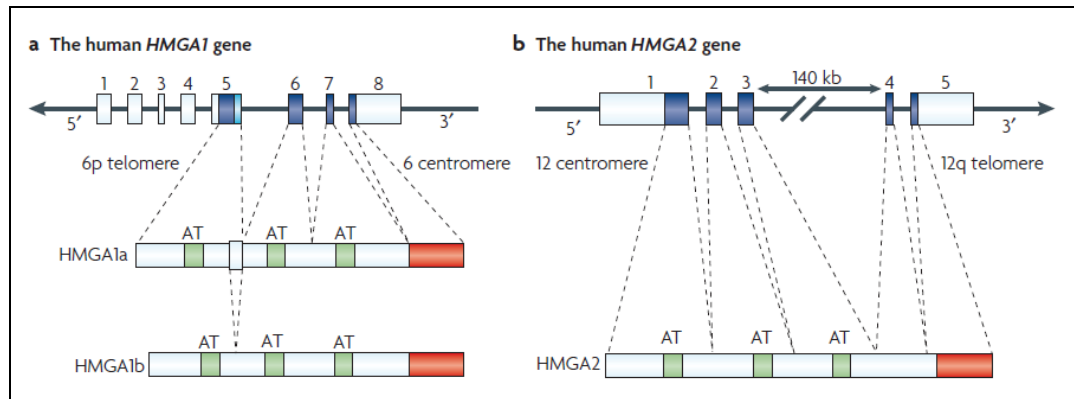


Fig. 4.1: Els dos gens que donen lloc a les proteïnes HMGA [5]

### Estructura

Les proteïnes HMGA tenen estructures primàries molt semblants, contenen tres *AT-hooks* amb la seqüència PRGRP<sup>1</sup> flanquejats per residus bàsics, a excepció de l'HMGA1c que només en té dos (v. figura 4.2). Amb aquests *AT-hooks*, les proteïnes HMGA són capaces de reconèixer i d'unir-se a seqüències riques en ATs al solc menor del DNA (v. apartat 4.2.1) [1], [6].

En aquest projecte s'ha treballat amb un mutant de la proteïna HMGA1b al qual s'han eliminat els aminoàcids corresponents a la cua àcida terminal de la proteïna.

<sup>1</sup> A l'*AT-hook* 1 el primer aminoàcid no és "P", sinó "G"



```

HMGA1a 1 MSESSSKSSQPLASKQEKDGTE---KRGRGRPRKQPPVSPGTALVGSQKEPS-EVPTPKRFRG 59
HMGA1b 1 MSESSSKSSQPLASKQEKDGTE---KRGRGRPRKQPP*****KEPS-EVPTPKRFRG 48
HMGA1c 1 MSESSSKSSQPLASKQEKDGTE---KRGRGRPRKQPPVSPGTALVGSQKEPS-EVPTPKRFRG 59
HMGA2 1 MSARGEGAGQPSTSAQQQPAAPAPQKRGRGRPRKQQQ-----EPTGE-PSPKFRG 50

HMGA1a 60 RPKGSKNKGAAK---TRKTTTTPG-RKERGRPKKLEK-----EEEEGIS-QESSEEEQ 107
HMGA1b 49 RPKGSKNKGAAK---TRKTTTTPG-RKERGRPKKLEK-----EEEEGIS-QESSEEEQ 96
HMGA1c 60 RPKGSKKNWRRRKRASRRSPRRSSDFCVPPAPHRSSFLGLDSFAPLPPPPPLPOAHHH 121
HMGA2 51 RPKGSKNKSPSKAAQ-KKAEAT-GEKREGRPRKWPQQVVQKKPAQ EETEETSSQESAED- 109

HMGA1c 122 HRLWPPPPSSTCALTTTLHSTPAAAGLPWAEWGAVFPPWQFPAPPAHPRIHTCPPGQ 179
    
```

Fig.4.2: Seqüències aminoacídiques de les proteïnes HMGA humanes [6]. Els tres dominis AT-hook es representen en negreta i tenen càrrega positiva (es ressaltava la zona invariable R-G-R-P). La regió àcida C-terminal apareix ressaltada en vermell. Els asteriscs indiquen la deleció d'11 aminoàcids que presenta l'HMGA1b respecte l'HMGA1a (només es diferencien en aquests 11 aminoàcids).

Un tret característic de les proteïnes HMGA és que només assumeixen un cert tipus d'estructura quan s'uneixen al DNA o algun substrat. Si estan lliures en dissolució es troben com a "random coils" i es consideren intrínsecament desordenades (IDP). Es creu que aquesta flexibilitat intrínseca, juntament amb la transició de molècula desordenada a estructura ordenada quan s'uneix a un substrat, és el que permet que les proteïnes HMGA puguin participar en una àmplia varietat de processos biològics. Les proteïnes HMGA poden tòrcer, estirar, desenrotllar i enrotllar substrats de DNA, entre altres [2].

### Funció

Les proteïnes HMGA estan implicades en la remodelació de la cromatina i la transcripció de molts gens. Per tant, intervien en diversos processos biològics normals com ara el creixement, la proliferació, la diferenciació i l'apoptosis (mort cel·lular) [4].

Es pot dir que les proteïnes HMGA tenen tres mecanismes per a interactuar amb el DNA [5], [7] (v. figura 4.3).

- Les proteïnes HMGA poden interaccionar directament amb el DNA, ja sigui modificant la seva conformació i, consegüentment, facilitant la unió a un grup de factors de transcripció, o bé interaccionant alhora amb els factors de transcripció i el DNA, formant així complexos multiproteics units al DNA (v. figura 4.3 c1).
- Les proteïnes HMGA poden interaccionar amb factors de transcripció que tenen baixa afinitat pel DNA modificant la seva conformació i així permetent la seva unió amb el DNA (v. figura 4.3 c2).



- Les proteïnes HMGA són capaces de permetre la transcripció de la cromatina ja que desplacen a les histones H1 i es descompacta el DNA (v. figura 4.3 c3).

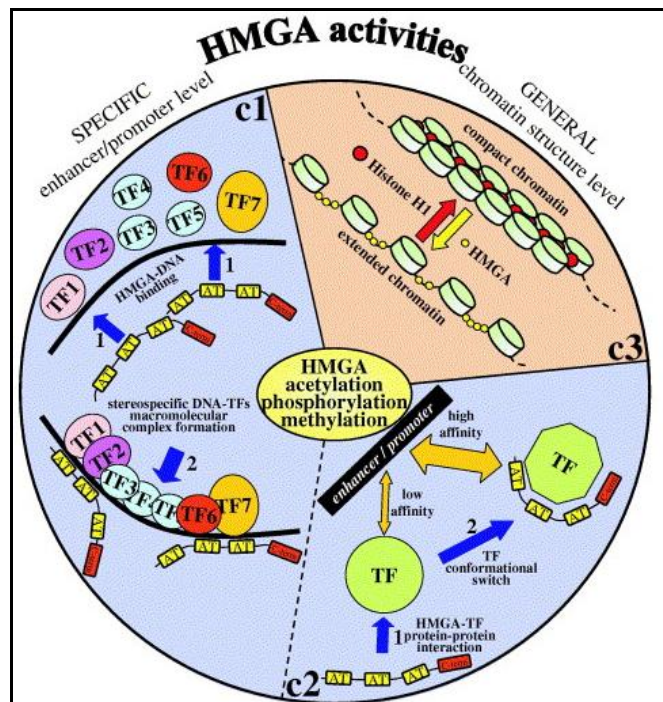


Fig. 4.3: Esquema de les tres vies d'actuació de les proteïnes HMGA [7].

### Interacció amb el DNA

Mitjançant estudis d'RMN s'ha trobat que el fragment aminoacídic RGR (arginina-glicina-arginina) s'adapta perfectament al solc estret del DNA en seqüències riques en AT (v. figura 4.4) [8], [9].

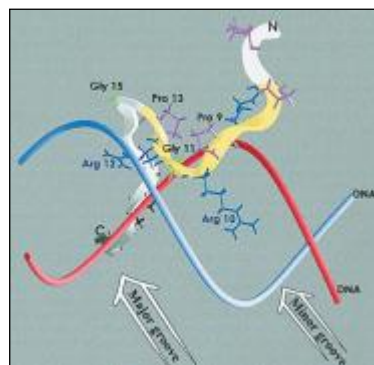
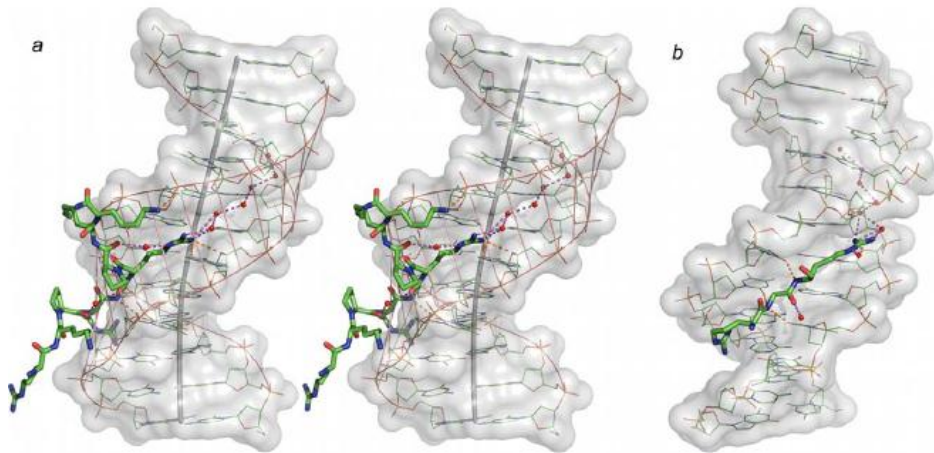


Fig. 4.4: Model de la interacció d'un AT-hook amb el DNA [10]. Les cadenes blava i vermella representen l'esquelet del DNA i la cinta representa l'esquelet polipeptídic de la proteïna, en groc el domini AT-hook. S'observa com la seqüència Arg10-Gly11-Arg12 es posiciona al solc estret.



Durant la redacció d'aquest projecte, membres de l'equip MACROM han aconseguit resoldre l'estructura cristal·logràfica del tercer *AT-hook* de la proteïna HMGA1 amb l'oligonucleòtid d(CGAATTAATTCG)<sub>2</sub>. L'estructura trobada mostra com l'*AT-hook* forma enllaços per pont d'hidrogen entre els grups N-H de la cadena principal del pèptid i les timines del solc menor, el DNA es flexiona i s'eixampla el solc menor (v. figura 4.5) [11].



*Fig. 4.5: Estructura d'un complex DNA/AT-hook. A) Imatge estereogràfica: el DNA apareix com a un objecte gris semitransparent. Els enllaços virtuals entre fosfats estan indicats en color vermell. Aquests mostren com s'eixampla el solc menor del DNA a la zona on s'inserta l'AT-hook. B) En aquesta vista només s'observa la regió central elongada de l'AT-hook (Arg-Gly-Arg). Es poden observar els ponts d'hidrogen entre els grups NH de la cadena de pèptid i l'oxigen de la timina [11].*

Fins ara, però, la zona intermèdia entre dos *AT-hooks* no ha estat caracteritzada, tot i que juga un paper decisiu en la interacció.

### **Les proteïnes HMGA i el càncer**

Les proteïnes HMGA tenen una elevada capacitat de reconèixer i alterar la cromatina i l'estructura del DNA. Per tant, és d'esperar que les cèl·lules que expressen alts nivells d'aquestes proteïnes (com ara, les cèl·lules tumorals) tinguin una notable alteració en l'estructura de la cromatina.

El nivell d'expressió de l'HMGA és molt alt durant l'embriogènesi (desenvolupament embrionari) i les ràpides proliferacions cel·lulars, però disminueix notòriament fins a arribar a ser pràcticament indetectable a les cèl·lules adultes i als teixits diferenciats que no es divideixen [12].





Una sobreexpressió d'aquestes proteïnes en cèl·lules "normals" resulta tòxica i les indueix a l'apoptosi (mort cel·lular programada). En canvi, una sobreexpressió en certes cèl·lules "pre-disposades" sovint té efectes antiapoptòtics i, freqüentment, les indueix a transformacions cancerígenes [2]. El rol que tenen aquestes proteïnes està basat en la seva capacitat de regular (tant positivament com negativament) l'expressió de gens que tenen un paper important en el control de la proliferació cel·lular i la invasió [12].

Existeix una correlació entre l'increment de la concentració de proteïna a les cèl·lules neoplàsiques transformades i el grau de malignitat o potencial metastàtic de les mateixes [13], [14]. Alguns estudis han proposat introduir la detecció del nivell de concentració de la proteïna HMGA al procediment rutinari de les anàlisi tumorals [5].

Hi ha diferents factors que regulen l'expressió dels gens HMGA. S'han trobat diferents senyals de transducció i una varietat de factors de transcripció que participen en el control de l'expressió *in vivo* de la proteïna HMGA [15]. Mitjançant l'estudi d'aquests mecanismes es pretén regular la sobreexpressió de la proteïna.

Aconseguir reprimir l'expressió de l'HMGA pot ser una eina excel·lent pel tractament del càncer. A més, com la sobreexpressió d'aquestes proteïnes es dona en molts tipus de càncer, aquesta teràpia podria tenir un ampli espectre d'aplicacions [5], [12].

A l'hora de començar aquest projecte, es va considerar que seria molt interessant poder conèixer l'estructura tridimensional de la proteïna HMGA associada al DNA, per tal de col·laborar a l'estudi de les seves funcions i del seu rol en certes malalties.



## 4.2 EI DNA

### 4.2.1 Estructura i funció del DNA

El DNA és un polímer lineal constituït per quatre classes diferents de nucleòtids. Un nucleòtid és una molècula formada per una base nitrogenada (purina o pirimidina), una pentosa (en el cas del DNA és la 2-desoxiribosa) i un grup fosfat. Els quatre tipus de nucleòtids presents al DNA (adenina, citosina, guanina i timina) es mostren a la figura següent:

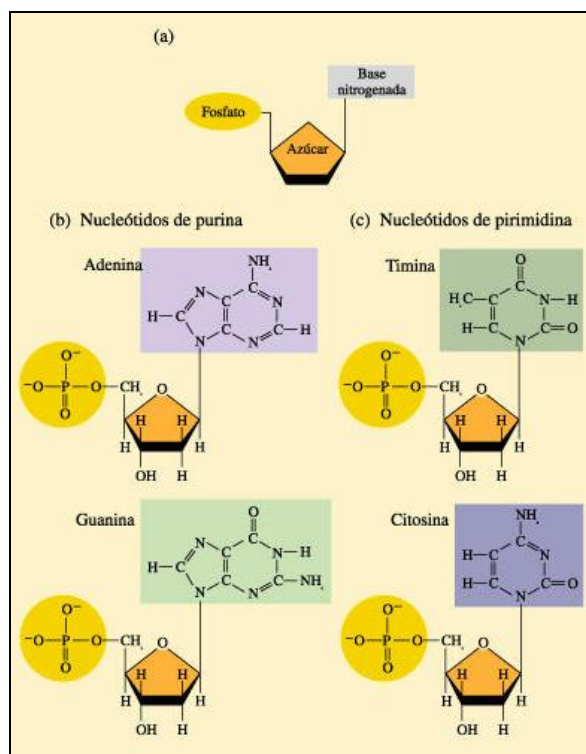


Fig.4.6: Nucleòtids presents a la molècula de DNA. (a) Es pot observar els tres constituents bàsics dels nucleòtids: la pentosa, el grup fosfat i les bases nitrogenades. (b) Nucleòtids de purina.

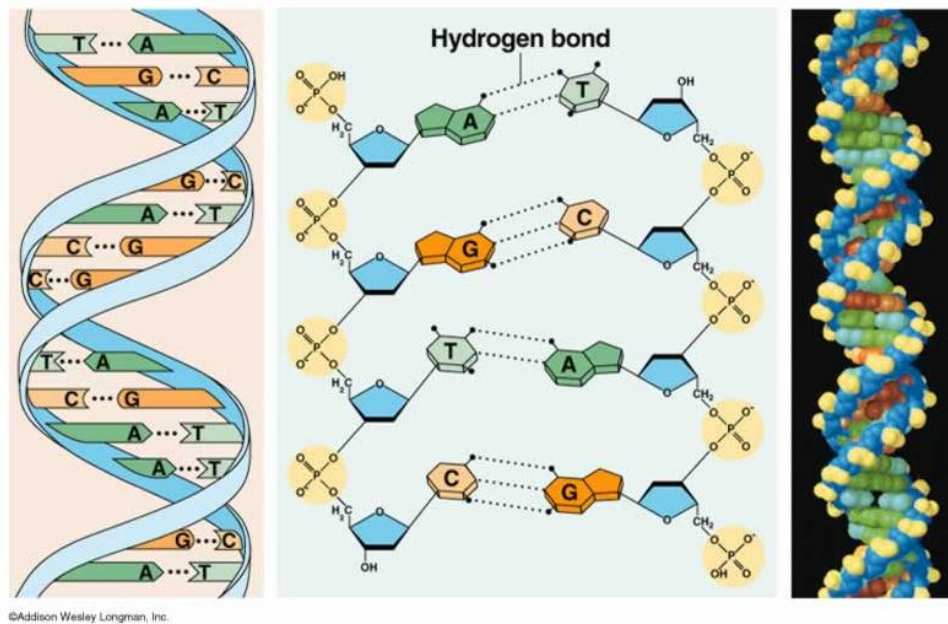
(c) Nucleòtids de pirimidina. Figura extreta de:  
<http://www.ecociencia.cl/articulos/adnoproteinas.htm>

La repetició dels enllaços sucre-fosfat entre diferents nucleòtids conforma l'esquelet fix d'una cadena de DNA, i d'aquest esquelet sobresurten les bases nitrogenades. Tots els sucres d'una cadena estan orientats de la mateixa manera, per tant, es pot distingir fàcilment els dos extrems de la cadena, anomenats 3' i 5'. L'extrem 3' està hidroxilat i el 5' està fosforilat (v. figura 4.7).



Les molècules de DNA consten, però, de dues cadenes (v. figura 4.7). L'any 1953, James Watson, Francis Crick i Rosalin Franklin van deduir l'organització d'aquestes cadenes i van proposar una estructura tridimensional per a les molècules de DNA: una doble hèlix dextrògira composta de dues cadenes, on l'esquelet de sucre-fosfat queda a l'exterior i les bases nitrogenades queden a l'interior formant parells de bases (pb).

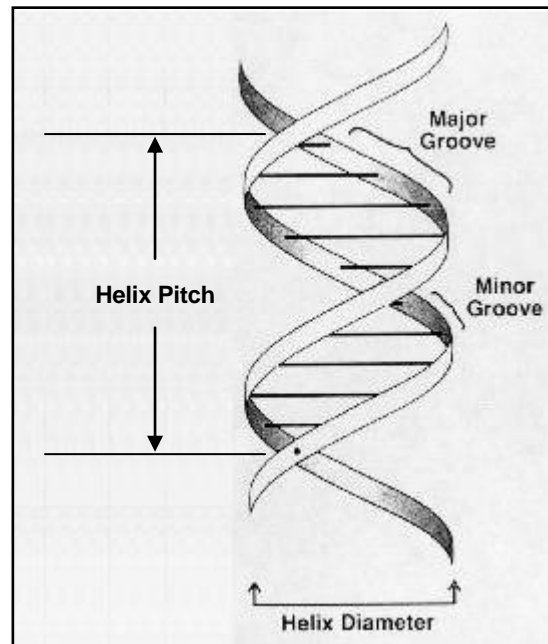
Les dues cadenes són antiparal·leles i complementàries: sempre quedaran enfrontades una base purínica amb una pirimidínica. Concretament l'adenina s'aparella amb la timina (A-T) mitjançant dos enllaços per ponts d'hidrogen, i la guanina amb la citosina (G-C), mitjançant tres enllaços per pont d'hidrogen (v. figura 4.7).



*Fig. 4.7: La doble hèlix del DNA. L'esquelet de sucre-fosfat es representa en blau clar. També s'observen els parells de bases de Watson-Crick. L'adenina s'aparella amb la timina i la citosina amb la guanina. Les línies discontinues representen els enllaços per ponts d'hidrogen.*

L'estructura del DNA es pot descriure mitjançant uns paràmetres que defineixen la doble hèlix. Alguns d'aquests són: el número de residus per volta (pb necessaris per tal que l'hèlix giri 360°), el pas d'hèlix (longitud d'una volta de DNA), el diàmetre de l'hèlix i l'aparició de dos solcs, el major i el menor, de mides i característiques diferents. Aquests dos solcs són rellevants a l'hora d'interaccionar amb altres molècules (v. figura 4.8).





*Fig 4.8: Paràmetres bàsics de la doble hèlix: Pas de volta d'hèlix i diàmetre de l'hèlix. També es pot observar el solc major i el solc menor (Sinden, 1994).*

En l'estructura descrita per Watson i Crick, l'anomenada forma B del DNA, aquests paràmetres característics són:

- Número de residus per volta: 10.
- Pas d'hèlix: 3,4 nm.
- Diàmetre de l'hèlix: 2,0 nm.

Tot i que l'estructura del DNA més comuna és la forma B, existeixen altres formes, com ara la forma A, la forma C, la forma D i la forma Z. Entre elles es diferencien pels paràmetres de la doble hèlix (v. taula 4.2).



Forma	Pas d'hèlix (nm)	pb per volta
A	2,82	11
B	3,38	10
C	3,10	8,5-9.7
D	2.43	8
Z	4,35	-12

Taula 4.2. Alguns paràmetres característics de les diferents formes del DNA.

La funció bàsica del DNA és codificar i transmetre la informació genètica. La seqüència de bases nitrogenades al llarg de les cadenes de DNA constitueix la informació genètica. Aquesta informació pot ser traduïda per sintetitzar les proteïnes que duen a terme la major part de l'activitat cel·lular. Durant la replicació cel·lular, se separen les dues cadenes de DNA i a partir de cada cadena "mare" s'origina, per complementarietat de les bases nitrogenades, una cadena "filla". Així es transmet de generació en generació la informació continguda en el material genètic.

#### 4.2.2 Les seqüències AT

Aquest treball s'ha centrat en intentar trobar la interacció d'un mutant de la proteïna humana HMGA1b al qual s'ha extret la cua acídica terminal (v. apartat 6.2) amb oligonucleòtids amb seqüències riques en A i T.

Una gran part del DNA dels organismes pluricel·lulars no és codificador. Això implica que una gran part del genoma està format per seqüències que no són traduïdes a proteïnes. Són regions amb funció desconeguda i s'ha trobat que tenen un abundant contingut de seqüències AT [16]. L'elevat contingut en seqüències AT en les regions no codificants de molts organismes ha suggerit que aquestes seqüències juguen un rol estructural en la funció del genoma.

També s'ha descobert que al genoma de molts organismes inferiors hi ha una elevada quantitat de seqüències AT. Per exemple, el genoma de l'ameba *Dictyostelium discoideum* posseeix un contingut d'ATs del 78%. [17].



Per aquests motius hi ha un gran interès en l'estudi del polimorfisme que presenten les seqüències riques en ATs [18], [19]. S'ha trobat que algunes formes del DNA, com ara la forma D, es donen en seqüències riques en ATs.

Alguns membres del grup MACROM han trobat que oligonucleòtids amb seqüències alternants d'ATs poden adoptar l'aparellament Hoogsteen [20]. En el parell de bases del tipus Hoogsteen l'adenina gira 180° al voltant de l'enllaç glicosídic; així els ponts d'hidrogen que es formen entre l'adenina i la timina són diferents de l'aparellament Watson-Crick.



## 5. MATERIALS I MÈTODES

Per a comprendre millor el mecanisme d'acció de les proteïnes HMGA cal conèixer l'estructura tridimensional que formen els complexos d'aquestes proteïnes amb el DNA. Amb aquesta finalitat, s'han realitzat diferents assajos cristal·logràfics per tal d'obtenir cristalls dels esmentats complexos. D'altra banda, també s'han realitzat assajos amb un pèptid sintètic, que té una seqüència afí a la proteïna emprada.

En aquest projecte, la proteïna d'estudi ha estat la HMGA1b(1-90), un mutant de la proteïna HMGA1b, on s'ha eliminat la cua àcida terminal, però es conserven els tres *AT-hooks*. Aquest mutant de proteïna s'ha expressat en un cultiu bacterià d'*Escherichia coli* mitjançant la tècnica del DNA recombinant (v. apartat 5.3). Posteriorment s'ha purificat fins a un alt grau de puresa (v. apartat 5.4) per tal de portar a terme els assajos cristal·logràfics (v. apartat 5.5). D'altra banda, tant els oligonucleòtids com el pèptid emprats als assajos cristal·logràfics s'han comprat ja sintetitzats, però cal una preparació prèvia dels mateixos. Als apartats 5.1 i 5.2 s'explica el tractament que han de rebre les mostres d'oligonucleòtids i pèptid, respectivament, per tal de poder-los fer servir per a cristal·lografia.

### 5.1 Preparació de les mostres d'oligonucleòtids

Els oligonucleòtids que s'utilitzen són subministrats per l'Institut Pasteur i arriben liofilitzats i amb un grau de puresa que oscil·la entre el 95 i el 98%. Per a poder realitzar els assajos cristal·logràfics cal dissoldre'ls en aigua estèril i calcular la concentració de les mostres amb espectrometria UV. Per tal de calcular la concentració, primerament s'efectua l'espectre d'absorció d'una dilució de la mostra d'interès des de 190 nm fins a 350 nm. Posteriorment, es realitza una lectura puntual a 260 nm, que és on es dona la màxima absorbància de l'enllaç dels nucleòtids. Amb el valor d'aquesta lectura puntual, i mitjançant la llei de Lambert-Beer, es pot calcular la concentració de la mostra:

$$A = \varepsilon \cdot C \cdot l \quad (\text{Eq. 5.1})$$

Sent:

A: absorbància.

$\varepsilon$  (ml/mg·cm): coeficient d'extinció a la longitud d'ona considerada (260 nm en aquest cas).

l : longitud del pas òptic de la cubeta que conté la mostra (1 cm).

C: concentració de la mostra (mg/ml).



El coeficient d'extinció a 260nm d'un oligonucleòtid qualsevol  $DpEpFpGp...KpL$  es pot calcular utilitzant l'equació de Cantor et al. (1970) [21]:

$$\varepsilon_{260} = \varepsilon_{DpEpFpGp...KpL} = 2(\varepsilon_{DpE} + \varepsilon_{EpF} + \varepsilon_{EpG} + \dots + \varepsilon_{KpL}) - \varepsilon_E - \varepsilon_F - \varepsilon_G \dots - \varepsilon_K \quad (\text{Eq. 5.2})$$

A la taula 5.1 es mostren els coeficients d'extinció de cada nucleòtid, així com els dels possibles enllaços entre nucleòtids.

DNA	$\varepsilon_{260}$	DNA	$\varepsilon_{260}$
pdA	15,4	dCpdG	9,0
pdC	7,4	dCpdT	7,6
pdG	11,5	dGpdA	12,6
pdT	8,7	dGpdC	8,8
dApdA	13,7	dGpdG	10,8
dApdC	10,6	dGpdT	10,0
dApdG	12,5	dTpdA	11,7
dApdT	11,4	dTpdC	8,1
dCpdA	10,6	dTpdG	9,5
dCpdC	7,3	dTpdT	8,4

Taula 5.1: Coeficients d'extinció aplicats a l'equació de Cantor et al. [23].

Una última consideració a tenir en compte a l'hora de calcular el factor d'extinció és que els valors de la taula són per a cadena simple. És per això que la concentració calculada s'haurà de dividir entre 2 per poder saber la concentració del dúplex de DNA.

## 5.2 Preparació de les mostres de pèptid

Les mostres de pèptids també es reben liofilitzades i amb una puresa superior al 97%, tant del Departament de Química Orgànica de la UB (tenen una unitat de síntesi de pèptids), com d'alguna casa comercial, com ara Thermo Fisher. El proveïdor indica tant la quantitat exacta de la mostra com la massa molecular del pèptid en qüestió. Caldrà dissoldre la mostra en aigua estèril, tenint en compte les dades facilitades pel proveïdor per aconseguir la concentració desitjada. Les mostres es conserven a  $-80^{\circ}\text{C}$ .





### 5.3 Obtenció de la proteïna

De manera esquemàtica, el procediment seguit per a obtenir la proteïna és:

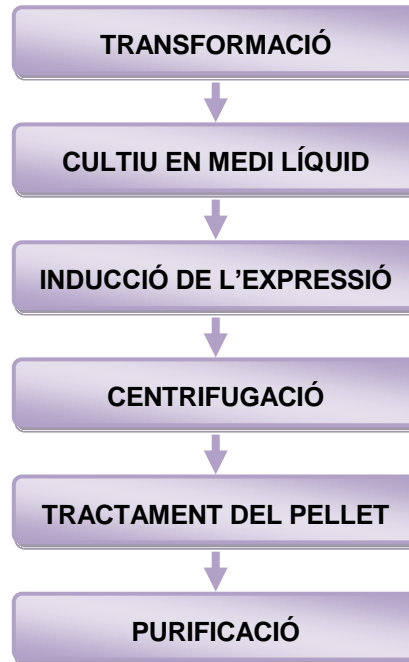


Fig. 5.1: Esquema del procediment seguit per a preparar les mostres de proteïna HMGA1b(1-90).

Tal com s'ha dit, la proteïna de treball és l'HMGA1b(1-90). Aquesta proteïna és un mutant de la proteïna HMGA1b humana, a la qual s'ha eliminat la cua àcida terminal.

Per a obtenir la proteïna s'ha emprat la tècnica del DNA recombinant, mitjançant la qual s'introdueix un plasmidi o vector d'expressió dins d'una cèl·lula hoste. Aquest vector és una molècula de DNA circular i petita, estable i fàcil de manipular i aïllar que conté el gen de la proteïna d'interès que es vol sintetitzar. També conté alguns marcadors de selecció, com ara resistència a antibiòtics per tal de poder seleccionar les cèl·lules que han incorporat el plasmidi (cèl·lules transformades). La replicació d'aquest plasmidi és independent del cromosoma bacterià.

El plasmidi utilitzat conté el gen de la proteïna HMGA1b(1-90), així com un gen que confereix resistència a l'antibiòtic ampicil·lina (gen Amp<sup>r</sup>). A la figura 5.2 es mostra un esquema d'aquest vector.



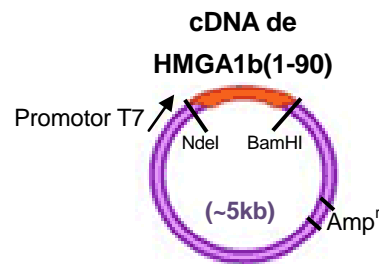


Fig. 5.2: Esquema del plasmidi que conté el gen necessari de l'HMGA1b(1-90). El plasmidi conté també el gen Amp<sup>r</sup> que conferirà al bacteri resistència a l'antibiòtic ampicil·lina.

Seguint l'esquema que apareix a la figura 5.1, el primer pas és la transformació de la cèl·lula hoste, és a dir, introduir el plasmidi mencionat en una cèl·lula hoste competent (v. annex A.1: obtenció cèl·lules competents). Aquesta ha de tenir la paret cel·lular permeabilitzada per permetre l'entrada del plasmidi, una elevada velocitat de creixement amb pocs nutrients i també ha de ser capaç d'incorporar i mantenir estable el material genètic introduït al llarg de les diferents generacions. A més, és necessari que expressi de forma correcta la proteïna d'interès.

Les cèl·lules hoste més comunes són: el bacteri *Escherichia coli*, algunes espècies de *Bacillus* i el llevat *Sacharomyces cerevisiae*. La proteïna HMGA1b(1-90) ha estat expressada en la soca Rosetta (DE3) pLysS d'*Escherichia coli*.

La transformació no es portarà a terme a totes les cèl·lules hoste, donat que no és un procés 100% efectiu. El gen que confereix resistència a l'ampicil·lina permet diferenciar entre aquelles cèl·lules que no hagin incorporat el plasmidi i aquelles que sí s'han transformat. Fent créixer les cèl·lules en un medi de cultiu amb ampicil·lina s'aconseguirà que es multipliquin només aquelles que realment hagin incorporat el vector, gràcies al gen Amp<sup>r</sup> (v. figura 5.3).



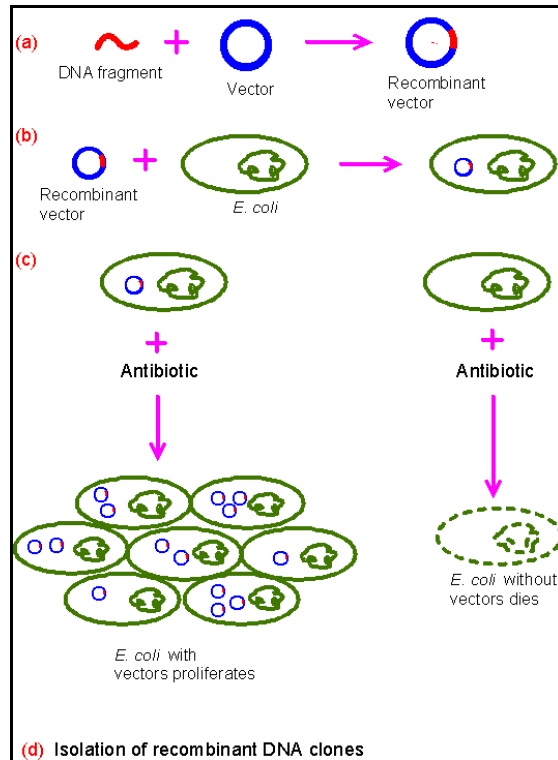


Fig. 5.3: Esquema del procés de transformació i selecció dels bacteris transformats.

Figura extreta de: <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch9A.htm>

Després de la transformació i del cultiu en medi líquid amb ampicil·lina, es porta a terme la inducció de l'expressió de la proteïna a la cèl·lula hoste. Per a aconseguir-ho s'utilitza IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactòsid) (v. figura 5.4), que és un anàleg sintètic de la lactosa no metabolitzable. Aquest inductor, mitjançant el bloqueig d'un factor repressor, permet que s'iniciï la síntesi de la proteïna recombinant. Per a més informació, veure l'annex A.2.

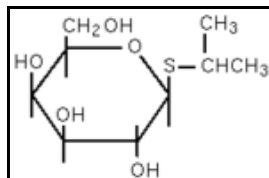


Fig. 5.4: Estructura de l'IPTG

A continuació, s'explica amb més detall el procediment seguit per a l'obtenció de la proteïna d'interès.



### 5.3.1 Transformació, inducció i expressió en un cultiu bacterià d'*Escherichia coli*

Atenció: el procediment detallat a continuació s'ha de portar a terme en condicions d'asèpsia: a prop de la flama i amb material estèril.

#### **Transformació**

1. Sobre 100 µl de cèl·lules competents de la soca Rosetta(DE3)pLysS d'*Escherichia coli* afegir 1 µl de la dissolució de DNA plasmídic (aproximadament 0,1 µg/µl). Fer també un control només amb cèl·lules competents (100 µl).
2. Deixar entre 10 i 20 min en gel.
3. Xoc tèrmic: 5 min a 37°C al bany.
4. Deixar 2 min en gel.

*Observació: amb aquestes variacions de temperatura tan brusques s'aconsegueix facilitar l'entrada del plasmidi a les cèl·lules competents.*

5. Afegir 1 ml de medi LB sense antibiòtics.
6. Incubar 1 hora a 37°C al bany.
7. Centrifugar durant 2 min a 4000 rpm a la micròfuga. Els bacteris queden al fons.
8. Eliminar sobrenadant fins deixar aproximadament 100 µl.
9. Resuspendre els bacteris i sembrar-los sobre una placa d'agar contenint LB + Amp (50 µg/ml). És el cultiu en medi sòlid.
10. Deixar O.N. a 37°C a l'estufa.
11. Al dia següent, observar com han crescut colònies de bacteris a la placa de les cèl·lules transformades mentre que a la placa control no, ja que les cèl·lules no transformades no són resistents a l'ampicil·lina.

*Observació: si haguessin crescut colònies al control, s'hauria de repetir l'experiment, per què no es podria assegurar que les colònies de la placa de transformació fossin les que interessin.*



**Cultiu en medi líquid**

1. Picar una colònia de bacteris transformats sobre un tub amb 3 ml LB +Amp (50 µg/ml).
2. Incubar a 37°C i agitació (250 rpm) durant unes 6 hores (fins observar terbolesa al tub).
3. Abocar el cultiu sobre 50 ml LB+ Amp (50 µg/ml).
4. Incubar a 37°C i agitació (250 rpm) ON.

**Inducció de l'expressió**

Pas previ: atemperar el medi LB (posar al bany a 37°C).

1. Inocular suficient volum del cultiu anterior en 1 litre de LB + Amp (50 µg/ml) per a assolir una  $DO_{600} = 0,1 - 0,2$ .
2. Incubar a 37°C i agitació (250 rpm) fins  $DO_{600} = 0,6 - 0,7$ .
3. Inducció amb IPTG 1 mM.
4. Incubar a 37°C i agitació (250 rpm) durant 3 hores.
5. Centrifugar a 4000 rpm durant 10 min a 4°C en un rotor SLA 3000.
6. Eliminar el sobrenadant.
7. Guardar el sediment (bacteris) a -80°C fins al seu processat.

Un cop començada la inducció s'agafaran alíquotes a temps 0 h, 1'5 h i 3 h per a mesurar l'absorbància i fer controls electroforètics del procés en gels SDS-acrilamida, tal com es veurà a l'apartat 5.4.3. Cada cop se segueix el procediment següent:

- a) Separar 1 ml per a mesurar la  $DO_{600}$ .
- b) D'aquest volum, apartar una alíquota de 125 µl.
  - i) Centrifugar els 125 µl a 4000 rpm durant 5 min (micròfuga).
  - ii) Eliminar el sobrenadant.
  - iii) Resuspendre el sediment en 30 µl de tampó de mostres per a electroforesi.
- c) Guardar-ho tot a -20°C fins al desenvolupament de l'electroforesi.

*Observació: els medis de cultiu LB utilitzats en aquest protocol són els que es recullen a l'annex A.3.*



### 5.3.2 Tractament del sediment bacterià

A continuació, s'ha de tractar el sediment obtingut per a aconseguir la proteïna expressada a l'interior dels bacteris. El procediment seguit s'ha adaptat de [22]. Per a 1 litre de cultiu:

1. Resuspendre el sediment en 100 ml de  $\text{HClO}_4$  al 5% / Tritó X-100 0,5% fred. Es fa pipetejant contínuament fins a obtenir una bona dispersió.
2. Deixar 30 min en gel com a mínim, invertint de tant en tant.
3. Centrifugar a 10.000 rpm durant 10 min a  $4^\circ\text{C}$  (rotor SLA 3000, Sorvall).
4. Descartar el sediment.
5. Afegir àcid tricloroacètic (TCA) al sobrenadant fins a una concentració final del 25% (33,3 ml). D'aquesta manera es fa precipitar la proteïna (s'observa una solució amb grumolls blancs).
6. Deixar en gel d'una hora fins a O.N., invertint de tant en tant.
7. Centrifugar a 10.000 rpm durant 15 min a  $4^\circ\text{C}$  (rotor GSA, Sorvall).
8. Descartar sobrenadant. El sediment de proteïna precipitada por ser fluid, per tant, s'ha d'anar amb compte a l'hora de decantar.
9. Resuspendre en 60 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ .
10. Afegir TCA fins a una concentració final del 25% (20 ml).
11. Deixar 30 min en gel, invertint de tant en tant.
12. Centrifugar a 10.000 rpm durant 10 min a  $4^\circ\text{C}$  (rotos GSA, Sorvall).
13. Descartar el sobrenadant.
14. Rentar el sediment amb 60 ml d'acetona acidificada amb 10 mM HCl fred per eliminar les restes de TCA. Es barreja amb una vareta de vidre.
15. Centrifugar a 10.000 rpm durant 10 min a  $4^\circ\text{C}$  (rotor SS34, Sorvall).
16. Descartar sobrenadant amb molt de compte. Millor fer-ho just en acabar de centrifugar i amb l'ajut d'una pipeta Pasteur.
17. Rentar el sediment amb 60 ml d'acetona freda ( $-20^\circ\text{C}$ ), amb l'ajut d'una vareta de vidre.
18. Centrifugar a 10.000 rpm durant 10 min (rotor SS34, Sorvall).
19. Descartar el sobrenadant amb compte.
20. Rentar sediment amb 60 ml d'acetona freda ( $-20^\circ\text{C}$ ).



*D'aquesta mostra s'agafa una alíquota per al control electroforètic, just abans del pas 21.*

- a) Es pipetegen 300 µl de la mostra i s'aboquen a un eppendorf.*
- b) Es centrifuga a 13.000 rpm durant 5 min a la micròfuga.*
- c) Es descarta el sobrenadant.*
- d) S'asseca al buit el sediment.*

21. Centrifugar a 10.000 rpm durant 10 min (rotor SS34, Sorvall).

22. Descartar sobrenadant amb compte.

23. Assecar al buit el sediment.

24. El sediment es pot guardar en sec o bé redissoldre'l en el volum i tampó adient per a la seva purificació. Conservar a -20°C.

## **5.4 Purificació cromatogràfica de la proteïna**

Amb el procediment anterior s'ha aconseguit obtenir la proteïna, tot i que en aquest punt encara conté impureses d'altres proteïnes d'origen bacterià. Per a poder realitzar els assajos cristal·logràfics, la proteïna ha de ser el més pura possible. Amb aquesta finalitat, s'han executat dos tipus de cromatografies: primer una cromatografia de bescanvi iònic i, tot seguit, una de gel-filtració.

### **5.4.1 Cromatografia de bescanvi iònic**

La cromatografia és una tècnica mitjançant la qual es pot separar una barreja de components dissolts en una fase mòbil que es desplacen amb diferents velocitats a través d'una fase estacionària, la qual pot ser sòlida o líquida.

En el cas de la cromatografia de bescanvi iònic la matriu que exerceix de fase estacionària pot ser un polímer sintètic (resina) o un polímer natural. Aquest suport conté grups carregats que interaccionen electrostàticament amb els ions de càrrega oposada de la fase mòbil.

Si és una cromatografia de bescanvi aniònic, la matriu té grups funcionals carregats positivament que interaccionen amb els contraions (anions en aquest cas) de la fase mòbil. D'altra banda, si és una cromatografia de bescanvi catiònic, la matriu té grups funcionals carregats negativament i interacciona amb els cations de la fase mòbil (v. figura 5.5).



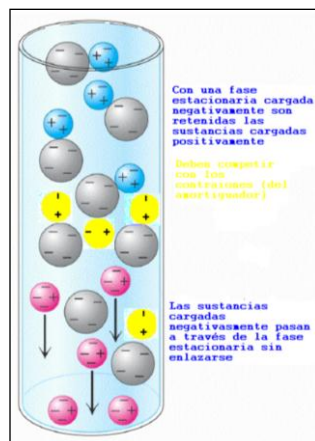


Fig. 5.5: Esquema de la cromatografia de bescanvi iònic.

Figura extreta de: <http://www.docstoc.com/docs/3248423/CROMATOLOGRAF%C3%8DA-DE-INTERCAMBIO-I%C3%93NICO>.

La proteïna HMGA1b(1-90) és una proteïna amb càrrega neta positiva, per tant, s'ha utilitzat la cromatografia de bescanvi catiònic. S'ha utilitzat la matriu de carboximetil cel·lulosa CM-52 (Whatman). L'equip utilitzat és el BioLogic LP (Biorad) amb el col·lector de fraccions FC 204 (Gilson).

Com a pas previ a la cromatografia cal empaquetar la matriu dins d'una columna de vidre, generalment, seguint les instruccions de la casa comercial. La columna ha de tenir a l'extrem inferior un filtre permeable que sigui capaç de retenir la matriu però deixar que flueixi la fase mòbil. Aquesta darrera serà impulsada a través de la fase estacionària mitjançant una bomba peristàltica que assegura un flux constant.

La cromatografia consta de les etapes següents:

1. **Equilibrat de la fase estacionària.** En aquesta etapa els grups amb càrrega de la matriu estan units als contraions (cations en el cas d'estudi).
2. **Introducció de la mostra a la fase estacionària i rentat.** La mostra s'ha de preparar prèviament en el tampó d'equilibrat de la columna. Cal centrifugar la mostra abans d'introduir-la per evitar carregar possibles restes de material insoluble que podrien obstruir la columna. Durant aquesta etapa la proteïna d'interès, que té càrrega neta positiva, desplaçarà els contraions presents a la fase estacionària i s'unirà a la matriu. Altres proteïnes carregades positivament també poden unir-se a la matriu, mentre que les que tenen càrrega neta negativa seran eluïdes durant el rentat.
3. **Eluïció de les proteïnes unides a la matriu (recuperació de la proteïna).** Hi ha dues estratègies possibles per a aconseguir-ho: per canvis de pH o per força iònica.





Tot i així, la més utilitzada és la darrera. Si es fan passar diferents solucions amb concentracions creixents del contraió, s'aniran eluint primer les proteïnes menys carregades i, finalment, les més carregades (que seran les que quedin més fortament unides a la matriu).

En acabar la cromatografia cal re-equilibrar la columna passant, com a mínim, 10 volums del tampó d'equilibrat per cada volum de matriu empaquetada a la columna, per tal de poder reutilitzar-la.

El contraió que competeix amb la proteïna HMGA1b(1-90) és el sodi. Els tampons utilitzats són:

- Dissolució d'equilibrat: 50 mM NaCl, 25 mM Tris, pH=7.
- Solucions d'elució: concentracions creixents de NaCl (des de 50 mM fins a 1 M). Aquestes es poden aconseguir de dues formes diferents: gradualment (gradient continu) o bé de forma esglaonada (gradient isocràtic). En aquest treball s'han utilitzat ambdues estratègies, la primera per aconseguir separar soluts que tendeixen a sortir en un interval de concentracions d'eluent propera, mentre que el gradient isocràtic és útil per a separar altres contaminants.

Un cop s'ha introduït la mostra a la columna, es recull el volum eluït en fraccions utilitzant un col·lector de fraccions automàtic, el qual es programa per a què cada fracció contingui un volum determinat.

Posteriorment, es llegeix l'absorbància de les fraccions recollides a tres longituds d'ona diferents:

- 220 nm (on absorbeix l'enllaç peptídic entre els aminoàcids de les proteïnes).
- 260 nm (on absorbeixen els àcids nucleics. Serveix per controlar si hi ha o no contaminació per part d'àcids nucleics).
- 276 nm (on absorbeixen les proteïnes que presenten aminoàcids amb grups aromàtics).

Per últim, les fraccions que presenten pics d'absorbància a 220 nm s'analitzen electroforèticament (v. apartat 5.4.3). D'aquestes, només les que presentin la proteïna d'interès seran reunides i dialitzades al moment (v. apartat 5.4.4) o bé conservades a -20°C fins al seu ús.



### 5.4.2 Cromatografia de gel filtració

La cromatografia de gel filtració o d'exclusió molecular s'ha utilitzat per a repurificar les fraccions riques en HMGA1b(1-90) obtingudes amb la cromatografia de bescanvi iònic, un cop dialitzades i concentrades (v. apartats 5.4.4 i 5.4.5).

Aquesta tècnica permet la separació de les molècules en funció de la seva massa molecular. En aquest cas, la matriu que exerceix de fase estacionària és un gel compost per esferes poroses. Les molècules amb una mida inferior al porus de les esferes poden entrar dins els porus amb una certa facilitat i, per tant, es retarda la seva elució. D'altra banda, les molècules majors que els porus de les esferes, en no poder penetrar-hi, elueixen més ràpidament. Així s'aconsegueix separar les molècules segons la seva massa molecular, recuperant primer les més grans i, en última instància, les més petites.

La figura següent mostra un esquema del que succeeix durant una cromatografia de gel filtració.

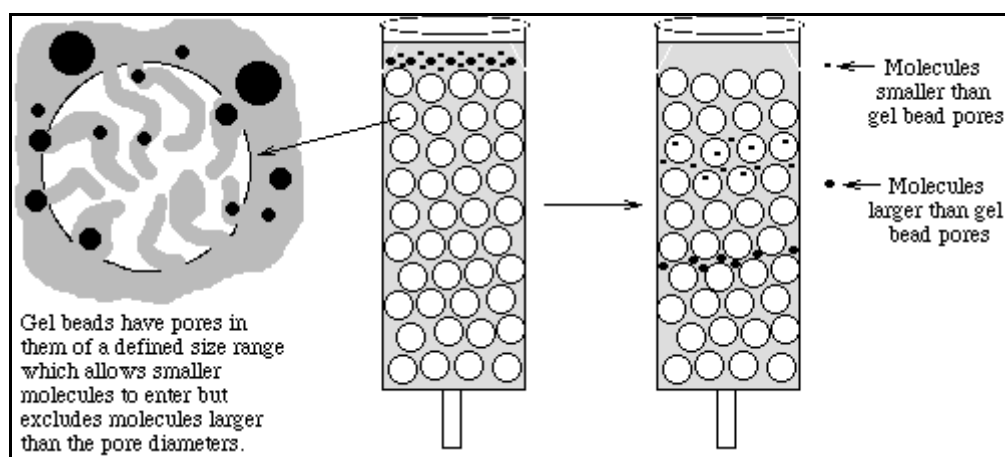


Fig. 5.6: Esquema de la cromatografia de gel filtració.

Figura extreta de: <http://www.sci.sdsu.edu/TFrey/Chem365/Proteins/ProteinsChem365.html>

La mida dels porus de cada gel determina el rang de fraccionament de la fase estacionària. La columna utilitzada per a purificar la proteïna HMGA1b(1-90) és la Superdex 75 10/300 GE de Healthcare amb un rang per separar proteïnes de 3.000 - 70.000 Da. L'equip utilitzat és l'AKTA Purifier 10 GE de Healthcare.

Les etapes de la cromatografia de gel filtració són similars a les de la cromatografia de bescanvi iònic. La diferència fonamental en aquestes etapes és que només és necessària una única dissolució, que s'utilitza tant per l'equilibrat de la columna com per a l'elució.



Durant el desenvolupament de la columna, el propi equip fa lectures d'absorbància a 220, 260 i 280 nm de cada fracció recollida.

Igual que anteriorment, es farà una anàlisi electroforètica de les fraccions que presentin un pic a 220 nm, i es conservaran les que tinguin una fracció més pura de proteïna HMGA1b(1-90).

### 5.4.3 Anàlisi electroforètica en gels de poliacrilamida

L'electroforesi és una tècnica que permet separar molècules carregades, com per exemple proteïnes o àcids nucleics, en ser sotmeses a un camp elèctric. La velocitat de migració ( $v$ ) dependrà de la força del camp elèctric ( $E$ ), la càrrega neta de la substància ( $z$ ) i d'un factor de fricció ( $f$ ), que es relacionen amb l'expressió següent:

$$v = \frac{E \cdot z}{f} \quad (\text{Eq. 5.3})$$

En aquest cas, les proteïnes es faran desplaçar a través d'un gel de poliacrilamida. El camp elèctric és generat mitjançant una font de tensió que produeix una diferència de potencial entre dos elèctrodes (càtode i ànode) situats en costats oposats d'una cubeta electroforètica. Les mostres es carreguen a la part superior del gel. La figura 5.7 mostra un exemple de muntatge típic d'electroforesi.

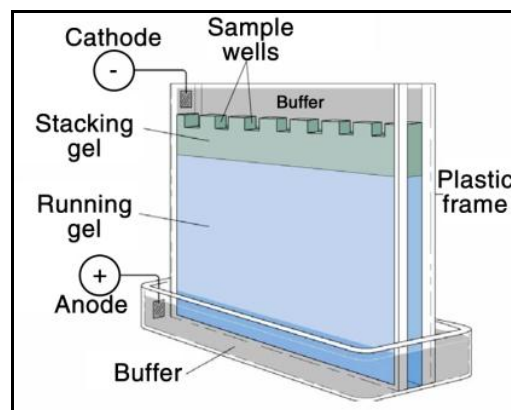


Fig. 5.7: Muntatge per a l'anàlisi electroforètica.

Figura extreta de: [http://www.sapd.es/revista/article.php?file=vol33\\_n3/03](http://www.sapd.es/revista/article.php?file=vol33_n3/03)



El gel de poliacrilamida és una malla entrecreuada de llargues cadenes de monòmers d'acrilamida amb N,N'-metilen-bisacrilamida. A major concentració d'acrilamida, més dens resulta l'entramat i aquest ofereix més resistència al pas de molècules, per tant, migraran amb més dificultat.

Els radicals lliures d'oxigen, degut a l'acció dels ions persulfat, formen radicals lliures del monòmer. Aquest fet provoca l'inici de la polimerització. S'utilitzen algunes amines terciàries, com ara el N,N,N',N'-tetrametilen-diamina (TEMED), com a catalitzadors d'aquesta reacció ja que poden induir la formació de radicals lliures de persulfat. D'altra banda, alts nivells d'oxigen poden inhibir la reacció de polimerització, per tant, s'ha d'aconseguir una solució desgasificada per aconseguir una correcta polimerització.

*Observació: Els monòmers d'acrilamida són neurotòxics per absorció cutània i/o inhalació, tant en pols com en dissolució. Quan el gel ha polimeritzat, disminueix considerablement la toxicitat, tot i així s'ha de vigilar perquè poden quedar restes de monòmer.*

#### 5.4.3.1 Electroforesi en gels de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

Aquest tipus d'electroforesi és el que més s'ha emprat en aquest projecte. S'ha utilitzat el sistema discontinu de tampons introduït per Laemmli (1970) [23]. Els gels SDS-PAGE tenen dues parts:

- La part empiladora (*stacking*). Aquesta part té un baix percentatge d'acrilamida, per tant, no hi ha tanta resistència al pas de les molècules. Mentre recorren aquesta primera part, s'organitzen per tamany en la part empiladora.
- La part separadora (*resolving o running*). Té un percentatge major d'acrilamida, per tant hi ha més resistència al pas de les molècules. És la fase en la que realment es dona la separació entre les molècules amb diferent massa molecular.

El dodecil sulfat de sodi (SDS) és un detergent aniònic capaç de desnaturalitzar les proteïnes. Les revesteix i els hi confereix càrrega neta negativa. Cada dos aminoàcids d'una proteïna s'uneixen a una molècula de SDS, és a dir, hi ha 1,4 g d'SDS per cada gram de proteïna, aproximadament. Aquesta unió és crítica per a aconseguir una bona migració electroforètica, per tant, a l'hora de preparar les mostres s'afegeix un excés de SDS i s'escalfen a 100°C (el calor facilita la desnaturalització de les proteïnes). També s'afegeix SDS al tampó de mostres i al tampó de la cubeta, tal com es veurà.

Un cop desnaturalitzades i carregades negativament degut a l'acció de l'SDS, totes les molècules tenen una mateixa densitat de càrrega. Per tant, al gel migraran cap al pol



positiu (que es col·loca a la part inferior) amb una velocitat inversament proporcional a la seva mida.

### ***Muntatge i preparació del gel***

El primer que cal fer és preparar el gel, que es polimeritza en un motlle. El motlle està format per dos vidres, entre els quals hi ha col·locats uns separadors que determinaran el gruix del gel (els més usats són de 0,75 mm o bé 1,5 mm). Per a evitar pèrdues, es segella el conjunt amb una goma (tot excepte la part superior).

Quan està preparat el motlle, i s'ha comprovat que no hi ha pèrdues, es va preparant el gel (v. solucions a la taula 5.2). Es comença preparant la part inferior del gel. Quan ja està feta la barreja s'aboca ràpidament entre els vidres fins el nivell desitjat. Ràpidament, s'addiciona una fina capa d'isopropanol que té dues funcions: d'una banda evita el contacte de la barreja amb l'oxigen (que tal com s'ha comentat abans pot inhibir la reacció) i d'altra banda s'aconsegueix que quedi una interfase plana. Un cop s'ha polimeritzat, es retira l'isopropanol, es neteja amb aigua i s'asseca amb paper de filtre.

Tot seguit, es pot preparar la part superior i abocar-la al motlle. Un cop abocada, posarem a la part superior una pinta amb igual gruix que els separadors. Les dents d'aquesta pinta determinaran el número de mostres que es podran carregar al gel. Quan ja hagi polimeritzat, s'haurà de retirar la pinta per a poder carregar les mostres.

Un cop s'ha acabat el gel, es col·loca a la cubeta electroforètica, a la que s'ha afegit prèviament el tampó d'electroforesi (v. taula 5.3).

En aquest punt es poden carregar les mostres preparades i desenvolupar l'electroforesi. Habitualment, es porta a terme amb un voltatge constant entre 100-130 V.

### ***Preparació de la mostra***

Les mostres de proteïna es preparen barrejant-les amb el tampó de mostres (v. taula 5.4). Aquest tampó conté, entre altres, un colorant que serveix per a poder visualitzar la migració. Se li afegeix també un agent reductor per a desfer enllaços per ponts de disulfur, i glicerol per a donar densitat a la barreja.

Tal com s'ha comentat, per tal de facilitar la unió de l'SDS amb les proteïnes cal bullir la mostra, entre 3 i 6 min, abans de carregar-la al gel.



La quantitat de proteïna carregada, per poder-la detectar, ha de ser de l'orde de 1-20 µg. S'ha d'injectar amb una xeringa Hamilton.

Quan el front de migració (la banda de colorant) es troba a 1 cm aproximadament del final, es pot finalitzar l'electroforesi.

### ***Detecció de les proteïnes***

Quan s'acaba l'electroforesi, se separa el gel del motlle i es tenyeix per a poder visualitzar les proteïnes. S'utilitza la tinció amb blau de Coomassie, isopropanol i àcid acètic que fixa les proteïnes al gel i permet la seva tinció.

A tal efecte, es submergeix el gel en la solució de colorant (taula 5.5) i es manté en agitació durant una hora aproximadament. Passat aquest temps, tot el gel està tenyit d'un blau intents per tant cal destenyir-lo per a eliminar l'excés de colorant. Se submergeix en una solució destenyidora (taula 5.5) i es deixa agitant durant tota una nit. Al dia següent s'observa un gel transparent amb tot un seguit de bandes blaves, que es corresponen amb les bandes de proteïna.

### ***Conservació dels gels***

Els gels es poden conservar si s'assequen bé. Per aconseguir-ho, s'humiteja una capa de paper de cel·lofana i es cobreix un vidre amb ella. Tot seguit, es col·loca el gel a sobre i es folra amb una altra capa de paper de cel·lofana humit, procurant que no quedin bombolles. Se subjecta amb unes pinces i es deixa assecar un parell de dies.

A continuació es troben les taules on s'especifica la composició de cadascuna de les parts dels gels SDS-PAGE, així com la dels diferents tampons mencionats.

- ***Gel de poliacrilamida-SDS:***
  - Solució A: acrilamida 30%, bisacrilamida 0,8%.
  - Solució B: 1,5 M Tris-HCl, pH= 8,8.
  - Solució C: 10% SDS.
  - Solució D: 0,5 M Tris-HCl, pH=6,8.



Reactiu	<b>Separador</b> (Acrilamida 15%, Bisacrilamida 0,4%, 0,375 M Tris, 0,1% SDS)	<b>Empilador</b> (Acrilamida 6%, Bisacrilamida 0,16%, 0,125 M Tris, 0,1% SDS)
Solució A	5 ml	0,6 ml
Solució B	2,5 ml	--
Solució C	100 µl	30 µl
Solució D	--	0,75 ml
H <sub>2</sub> O	2,3 ml	1,59 ml
TEMED	4,5 µl	3 µl
PSA 10%	75 µl	30 µl

Taula 5.2: Recepta dels gels de poliacrilamida-SDS, tant de la part inferior (separador) com de la part superior (empilador) per a un gel de 8 x 8,5 cm i 1,5 mm de gruix.

- **Tampó de cubeta per a electroforesi**

Reactiu	5x (1 litre)	Concentració 1x
Tris	30 g	0,01 M
Glicina	144 g	0,075 M
SDS	5 g	0,02 %

Taula 5.3: Composició del tampó de cubeta per a gels electroforètics d'acrilamida-SDS. Habitualment es prepara una solució 5x i es dilueix fins a obtenir la solució 1x utilitzada per a l'electroforesi.



- **Tampó de mostres**

Reactiu	4x (10 ml)	Concentració 1x
Tris 2 M pH=6,8	1,25 ml	62 mM
Glicerol	4 ml	10%
SDS	0,8 g	2%
2-mercaptoetanol	2 ml	5%
Blau de bromofenol	Punta d'espàtula	--

Taula 5.4: Composició del tampó de mostres per a electroforesi en gels de poliacrilamida-SDS.

- **Solució de tinció i solució destenyidora**

Reactius	Solució tenyidora		Solució destenyidora	
	Per 2 litres	Concentració	Per 2 litres	Concentració
Isopropanol	500 ml	25%	200 ml	10%
Àcid acètic	200 ml	10%	200 ml	10%
Blau de Coomassie G-250	5 g	0,25%	--	--

Taula 5.5: Composició de la solució de tinció i de la solució destenyidora per a gels de poliacrilamida-SDS.

#### 5.4.3.2 Electroforesi en gels de poliacrilamida – àcid acètic-urea (AU-PAGE)

Panyim i Chalkley (1969) [24] van desenvolupar aquest tipus d'electroforesi que s'utilitza habitualment per a separar proteïnes molt bàsiques. Es combina la urea amb medis àcids, on les proteïnes bàsiques se solubilitzen molt fàcilment. La urea interfereix amb les interaccions hidrofòbiques de les proteïnes, i, en funció de la concentració d'urea utilitzada, les desnatura totalment o parcialment.

Aquest tipus de gels només consten d'una part (v. taula 5.6) i la migració es dona en funció de la càrrega i la mida. El colorant de migració, en aquest cas, és el verd de metil (v. taula





5.7) i el tampó de cubeta és una solució al 5% d'àcid acètic. La solució de tinció i la solució destenyidora es mostren a la taula 5.8.

- **Gel de poliacrilamida-àcid acètic-urea:**

Reactiu	Gel (12 ml) (Acrilamida 15%, Bisacrilamida 0,1%, Àcid Acètic 5,37%, Urea 2,5 M)
Acrilamida 30%, Bisacrilamida 0,2%	6 ml
Àcid acètic 43%	1,5 ml
Urea 10 M	3 ml
H <sub>2</sub> O	1,43 ml
Tiourea	10,5 mg
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	67,5 µl

Taula 5.6: Recepta dels gels de poliacrilamida-àcid acètic-urea, gel petit (12 ml) 1,5 mm de gruix.

- **Tampó de mostres**

Reactiu	Concentració 1x
Urea	4 M
Àcid Acètic	2,5%
Glicerol	10%
β-mercaptoetanol	10 mM
Verd de metil	0,5%

Taula 5.7: Composició del tampó de mostres per a electroforesi en gels de poliacrilamida-àcid acètic-urea.



- **Solució de tinció i solució destenyidora:**

Reactius	Solució tenyidora	Solució destenyidora
Metanol	500 ml	1 l
Àcid acètic	100 ml	200 ml
H <sub>2</sub> O	500 ml	1 l
Blau de Coomassie G-250	2,75 g	--

Taula 5.8: Composició de la solució de tinció i de la solució destenyidora per a gels de poliacrilamida-àcid acètic-urea.

#### 5.4.4 Diàlisi

És una tècnica emprada per a modificar la dissolució en la qual es troba la proteïna, generalment s'usa per a dessalar les mostres.

El material necessari és una bossa de membrana semipermeable. El porus d'aquesta membrana és tal que permeti el pas de les sals cap a l'exterior de la bossa, però la proteïna quedi retinguda dins. Per tant, la massa molecular de la proteïna determina el porus de la membrana que s'ha d'utilitzar. En aquest treball s'ha utilitzat una membrana de la casa Spectra/Por® (Spectrum®) amb un límit de massa retinguda de 6-8.000 (MWCO, de *molecular weight cut off*).

Es tracta d'introduir les mostres en les bosses i submergir-les en un recipient que contingui la nova dissolució (v. figura 5.8) i amb agitació durant unes 4 o 5 hores (temps a partir del qual se suposa que s'ha arribat a l'equilibri). Passat aquest temps es canvia la dissolució del recipient per una altra de nova. Aquest procediment es repeteix dues o tres vegades més abans de donar per finalitzada la diàlisi. Per tal d'evitar la degradació de la proteïna, la diàlisi es porta a terme a 4°C.

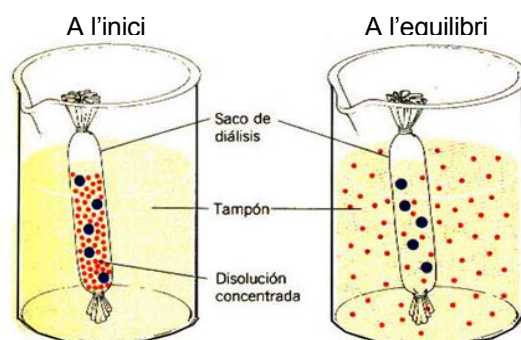


Fig. 5.8. Esquema del procediment de la diàlisi.

Figura extreta de: [http://www.tirsoferrol.org/ciencias/02\\_Agua%20y%20sales%20minerales.html](http://www.tirsoferrol.org/ciencias/02_Agua%20y%20sales%20minerales.html)



Per a fer el muntatge s'ha seguit el procediment següent:

- Es tallen les bosses d'una mida suficient, d'acord amb el volum de cada mostra proteica a dialitzar.
- Es submergeixen en aigua desionitzada durant uns 20 min per tal que s'hidratin.
- Passat aquest temps, s'agafa una de les bossetes i es neteja amb aigua milliQ per dins. Es posa una pinça especial de la casa Spectrum en un dels extrems, deixant un petit marge al final. S'omple la bosseta amb la mostra que li correspon, es tanca l'altre extrem amb una altra pinça, i s'introdueix en un recipient que contingui el tampó de diàlisi.
- Es repeteix el procediment amb la resta de mostres.
- Un cop preparat tot, es porta a 4°C, i s'inicia l'agitació.

El tampó de diàlisi emprat ha estat el tampó utilitzat en la cromatografia de gel-filtració.

#### 5.4.5 Concentració de les fraccions

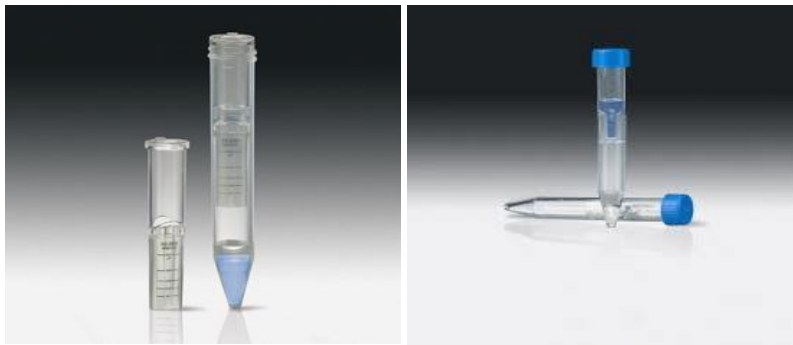
Les mostres de proteïna HMGA1b(1-90) pura no són prou concentrades com per a poder portar a terme els assajos cristal·logràfics. Per tant, abans de poder fer les gotes, cal concentrar-les. Les fraccions guardades de la cromatografia de bescanvi iònic, abans de ser repurificades amb la cromatografia de gel-filtració, també es concentren per a evitar la purificació d'un volum excessiu de mostres.

En funció dels diferents volums de mostra de partida i tenint en compte la massa molecular de la proteïna, s'han utilitzat diferents tipus de concentradors:

- Centriplus YM3: té capacitat per a carregar fins a 10 ml de mostra. MWCO: 3.000.
- Vivaspin 6: té capacitat per a carregar fins a 6 ml de mostra. MWCO: 3.000.
- Vivaspin 4: té capacitat per a carregar fins a 4 ml de mostra. MWCO: 5.000.

*Observació: la massa molecular de l'HMGA1b(1-90) és aproximadament 8.700 Da. Segons les instruccions del concentrador, el MWCO ha de ser com a màxim un 50% inferior a la massa molecular de l'espècie d'interès i, per tant, el més recomanable és utilitzar els de MWCO de 3.000 Da.*





*Fig. 5.9: VIVASPIN 4 (esquerra) i VIVASPIN 6 (dreta).*

*Figures extretes de <http://www.vivaproducts.com/centrifugal-filtration/vivaspin-4.html> i de <http://www.biomart.cn/infosupply/1053252.htm>*



*Fig. 5.10: Centriplus YM3 MWCO 3.000 Da.*

*Figura extreta de: [http://www.reiss-laborbedarf.de/?seite=shop&shop\\_unterseite=artikeldetail&navi\\_shop=215&artgr\\_nr=274&artikel\\_id=974039](http://www.reiss-laborbedarf.de/?seite=shop&shop_unterseite=artikeldetail&navi_shop=215&artgr_nr=274&artikel_id=974039)*

Aquests concentradors permeten la concentració i purificació de les mostres a través d'unes membranes mitjançant la centrifugació.

El primer que cal fer és hidratar la membrana del concentrador. Seguidament, s'hi introdueix la mostra per a centrifugar al reservori. La força centrífuga propulsa a través de la membrana el solvent i les molècules de baix pes molecular fins al vial de filtrats. La proteïna, en canvi, queda retinguda al reservori, ja que té una massa molecular superior al MWCO de les membranes dels concentradors. S'anirà reomplint el reservori de mostres i centrifugant fins a arribar al volum final desitjat, moment en el qual es recupera la mostra.

El procediment seguit és el que es detalla a continuació:

- Hidratar la membrana del concentrador: s'introdueix un volum del tampó en el qual es troba la mostra proteica al reservori de mostres del concentrador (4, 6 o 10 ml en funció de cada concentrador) i es centrifuga a la velocitat especificada pel proveïdor



durant el temps necessari per a que es filtri, com a mínim, una mica més de la meitat del volum inicial.

- Mentrestant, es centrifuguen les mostres a 7.500 rpm durant 10 min a 4°C.
- Un cop hidratada la membrana, es buida el concentrador, tant el reservori de mostres com el vial de filtrats.
- Ràpidament, s'omple el reservori de mostres amb la mostra a concentrar, prèviament centrifugada.
- Es centrifuga a una velocitat lleugerament inferior a la màxima especificada per a cada tipus de concentrador, fins que la major part de la mostra inicial ha passat al vial de filtrats.
- Es recupera el filtrat, es reomple el concentrador i es torna a centrifugar.
- Un cop s'arriba al volum final de mostra desitjat, es procedeix a recuperar la mostra concentrada. Aquest punt és diferent en funció del tipus de concentrador utilitzat:
  - Si el concentrador és el Centriplus: girar el concentrador i acoblar el tub recollidor de concentrat. Centrifugar a 2000 g durant 3 min (rotor HFA, Thermo Scientific). Aliquotar el volum recuperat.
  - Si el concentrador és el Vivaspin: pipetejar directament del reservori de mostres el volum restant, anant amb molta cura. Aliquotar el volum recuperat.

#### 5.4.6 Determinació de la concentració de la proteïna

Per a calcular la concentració de la proteïna, es mesura l'absorbància a 220 nm i també s'utilitza la llei de Lambert-Beer (v. apartat 5.1). En aquest cas, el factor d'extinció que s'utilitza és el de la proteïna HMGA1b ( $\epsilon_{220\text{nm}}=6,37 \text{ ml/mg}\cdot\text{cm}$ ) (Reeves i Nissen [22], p. 163). Aquest factor indica que, si es mesura l'absorbància a 220 nm d'una solució 1 mg/ml de la proteïna, el resultat obtingut seria 6,37.

Per a llegir les absorbàncies de les mostres ja concentrades, el primer que cal és fer el blanc amb 800  $\mu\text{l}$  del tampó al que es troben les proteïnes dissoltes. S'afegeix a aquest volum 1  $\mu\text{l}$  de la mostra concentrada, s'homogeneïtza bé i es llegeix l'absorbància. Tot seguit, s'afegeix un altre microlitre de mostra i es torna a llegir l'absorbància. Es calcula la concentració de les dues dilucions i es fa un promig.



## 5.5 Assajos cristal·logràfics

Tal com s'ha comentat, la proteïna HMGA1b(1-90) no presenta cap estructura definida quan es troba en dissolució, només adquireix un cert tipus d'estructura quan interacciona amb el DNA. Per tal de conèixer l'estructura tridimensional d'aquesta proteïna, s'hauran d'obtenir cristalls del complex que formen la proteïna amb oligonucleòtids rics en adenines i timines.

D'altra banda, també s'intentarà obtenir co-cristalls d'un pèptid sintètic (amb una seqüència corresponent a la del tercer *AT-hook* de la proteïna) amb un oligonucleòtid ric en adenines i timines.

### 5.5.1 Fonaments de la cristal·lització

Per a conèixer l'estructura tridimensional d'una molècula mitjançant la difracció de raigs X, cal obtenir-ne primer cristalls de suficient qualitat. En aquest cas, cristalls de proteïna (o pèptid) amb DNA. Cal doncs l'obtenció de proteïna abundant i molt pura per a poder realitzar els assajos cristal·logràfics.

Un cop obtinguts els primers cristalls, cal optimitzar-los. A continuació, amb la difracció de raigs X s'obté un diagrama de difracció que eventualment dóna lloc a un mapa de densitat electrònica. El posterior refinatge de les dades permetrà finalment la deducció de l'estructura tridimensional de la molècula o complex estudiats. És d'esperar que una anàlisi exhaustiva d'aquest model tridimensional permeti un enteniment de la funció de la proteïna estudiada. Així, s'espera poder estudiar les interaccions que es donen entre els *AT-hooks* de la proteïna HMGA1b(1-90) i les zones riques en A i T del DNA i esbrinar el perquè de l'afinitat entre aquests dos elements.

Un factor a tenir en compte és que els cristalls de qualsevol substància es produeixen a partir d'una solució sobresaturada, mitjançant l'addició ordenada de molècules de solut a un nucli inicial de cristal·lització. En el cas estudiat, s'aconsegueix una sobresaturació quan la quantitat de complex proteïna-DNA dissolt és major del que accepta la solució en el punt de saturació. Per tant, l'objectiu és l'obtenció d'una solució sobresaturada a la qual es generin uns quants nuclis de cristal·lització, que seran l'inici dels cristalls. Interessa que hi hagi pocs nuclis i que els cristalls que surtin siguin grans i ben ordenats.

D'altra banda, si la concentració del complex proteïna-DNA sobrepassa de forma excessiva el punt de saturació, la solució passa de ser metaestable a ser inestable. És especialment negatiu si es supera molt bruscament aquest límit, ja que es produeix la precipitació del



complex en forma d'agregats amorfs, no ordenats, inadequats pels estudis de difracció. Per aquest motiu, la sobresaturació s'ha d'aconseguir molt a poc a poc, superant lleugerament la frontera d'una solució metaestable cap a una solució inestable. Així doncs, l'objectiu és generar uns pocs nuclis de cristal·lització i que el solut en excés sigui segregat, de forma lenta i ordenada per a engrandir els cristalls naixents, evitant la producció de nous nuclis de cristal·lització o la precipitació desordenada en forma de masses amorfes (v. figura 5.11). L'estratègia més utilitzada per a aconseguir-ho consisteix en afegir a una solució concentrada del complex proteïna-DNA substàncies que disminueixin la seva solubilitat, generalment disminuint gradualment la quantitat de solvent.

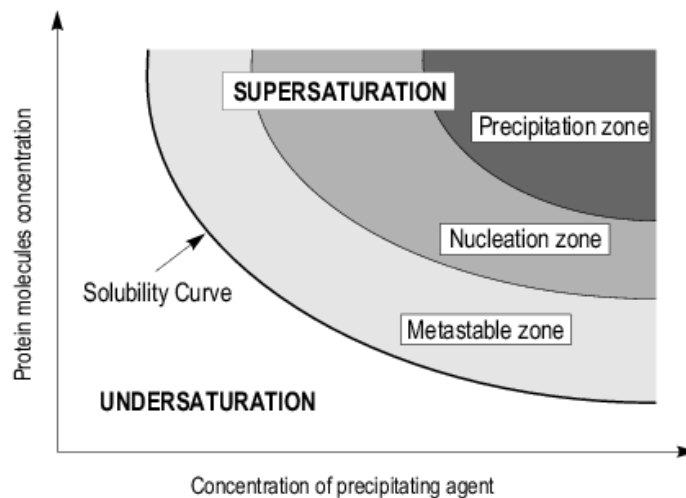


Fig. 5.11: Diagrama del procés de cristal·lització. S'observa la zona metaestable, la de nucleació i la de precipitació. S'ha d'aconseguir passar de la zona metaestable a la zona de nucleació lentament per a formar nuclis de cristal·lització. Figura extreta de:

[http://www.xray.bioc.cam.ac.uk/xray\\_resources/whitepapers/xtal-in-action/node3.html](http://www.xray.bioc.cam.ac.uk/xray_resources/whitepapers/xtal-in-action/node3.html)

Cal comentar que el procés de cristal·lització no és sempre senzill, molt sovint es necessita un elevat nombre d'assajos per tal d'obtenir un cristall suficientment bo com per a poder ser estudiat. També s'ha de tenir en compte que, per tal d'obtenir un bon cristall, és necessari un grau molt elevat de puresa i d'homogeneïtat de la mostra, ja que els cristalls són bàsicament repeticions d'unitats iguals. Aquesta uniformitat és difícil d'aconseguir, degut a què les proteïnes poden presentar diferents confòrmers coexistents a la mostra, alguns d'ells originats per alteracions durant el procés de purificació, i també poden presentar modificacions postraduccionals.



### 5.5.2 Condicions per a la cristal·lització

Per tal d'aconseguir un bon cristall, hi ha tot un seguit de consideracions que cal tenir en compte:

#### **Requisits de la proteïna i del complex proteïna-DNA**

- *Concentració elevada i gran quantitat de mostra.* Per arribar a la sobresaturació és necessari que tant l'oligonucleòtid com la proteïna de partida estiguin a una elevada concentració. En el cas de la proteïna, la mostra es concentra amb ultracentrifugació (v. apartat 5.4.5). S'aconsegueix que l'oligonucleòtid estigui força concentrat dissolent-lo en poc volum d'aigua. S'ha de partir d'una gran quantitat de mostra per a poder portar a terme els nombrosos assajos cristal·logràfics necessaris per a obtenir cristalls.
- *Puresa de la mostra.* Les impureses poden limitar la mida dels cristalls, dificultant el creixement dels mateixos, o introduir irregularitats que disminueixin la qualitat dels cristalls. És per això que les mostres han de ser tan pures com sigui possible. Per a determinar la puresa de les mostres proteïques s'utilitzen les anàlisis electroforètiques (v. apartat 5.4.3), mentre que la puresa de les mostres d'oligonucleòtids ve garantida pel proveïdor que els subministra (Institut Pasteur).
- *Homogeneïtat de la mostra.* També és un factor molt important. Les heterogeneïtats poden ser intrínseques de la mostra, o bé poden estar provocades durant la seva manipulació experimental. S'ha d'evitar sotmetre a les mostres de proteïna i de DNA a tractaments bruscos que podrien induir heterogeneïtats.
- *Estabilitat.* S'ha de garantir al màxim possible l'estabilitat tant de la proteïna com del DNA durant els assajos cristal·logràfics, per això es treballa a baixes temperatures i en condicions d'asèpsia sempre que es pugui. Més enfocat en la conservació del DNA, és recomanable que les mostres d'oligonucleòtids es trobin dissoltes en 25 mM del tampó cacodilat sòdic (NaCac), que dificulta la degradació de la mostra per part de bacteris i fongs (degut a la presència d'arsènic a la molècula, v. figura 5.12).

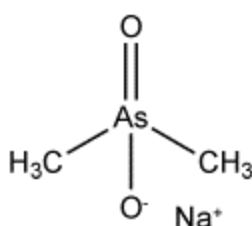


Fig. 5.12: Molècula del cacodilat sòdic.





### ***Factors que afecten a la solubilitat del complex***

Per arribar a la sobresaturació de la mostra s'ha d'anar augmentant paulatinament la concentració del complex proteïna-DNA mitjançant l'eliminació d'aigua i introduint canvis que disminueixin la seva solubilitat. Normalment, els factors que es manipulen a tal efecte són els següents:

- Eliminació d'aigua per evaporació.
- Canvis de pH.
- Canvis de temperatura.
- Baixa/alta força iònica.
- Precipitants polimèrics, com ara el polietilenglicol (PEG).
- Dissolvents orgànics:
  - No volàtils, com ara el metilpentanodiol (MPD).
  - Volàtils, com ara etanol, isopropanol...
- Lligands específics.

Per acabar, cal trobar una relació adequada de concentracions entre la proteïna HMGA1b(1-90), o el pèptid sintètic d'estudi, amb l'oligonucleòtid. Aquesta relació pot ser decisiva per a la unió entre la proteïna (o el pèptid) i l'oligonucleòtid.

### **5.5.3 Metodologies de cristal·lització**

Tot i que existeixen diversos mètodes de cristal·lització, com ara el sembrat, la microdiàlisi i les tècniques miniaturitzades que fan servir olis o silicona, la tècnica de cristal·lització més emprada és la difusió de vapor. Aquest mètode consisteix a preparar una petita gota (normalment 4 o 5  $\mu$ l) que conté la solució del complex proteïna-DNA i la solució de cristal·lització. Aquesta gota es manté dins d'una càmera hermètica formada per en un reservori que conté un volum molt major de precipitant (800-1000  $\mu$ l) a una determinada concentració, sense que la gota i la solució del reservori entrin en contacte. La pressió de vapor d'aigua és molt major a la gota que al reservori, per tant, la gota va perdent poc a poc aigua fins que s'igualen les concentracions de precipitant al reservori i a la gota.

Existeixen bàsicament dues modalitats d'aquesta tècnica: la gota penjada i la gota asseguda (v. figura 5.13).



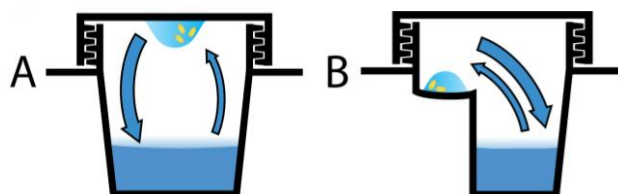


Fig. 5.13: Esquema de cristal·lització per difusió de vapor amb gota penjada (A) i amb gota assegurada (B). Figura extreta de: [http://www.ask.com/wiki/Laue\\_method](http://www.ask.com/wiki/Laue_method).

En aquest projecte s'ha utilitzat la tècnica de la gota penjada en càpsules ETS (Caubere, França) (v. figura 5.14). Consisteix a dipositar la gota (que conté el complex, el tampó i altres elements, si s'escau) sobre la tapa de la càpsula, mentre que a la part inferior de la càpsula (el pou) s'aboca la de solució precipitant. Tot seguit, s'inverteix la tapa de la càpsula per a tancar hermèticament la càpsula.



Fig. 5.14: Càpsula ETS.

Per aconseguir les condicions òptimes de cristal·lització és necessari fer un gran nombre d'experiments variant els factors de cristal·lització explicats a l'apartat 5.5.2. Perseguint aquest objectiu s'han dissenyat estratègies de mostreig amb les que s'explora tot l'espai de cristal·lització. Existeixen diferents empreses que comercialitzen aquestes matrius de recerca. Les que s'han utilitzat, generalment, són les matrius Jancarik i Kim [25], que han estat comercialitzades per la casa Hampton Research. Més concretament, s'han utilitzat alguns tampons Natrix-HR2-116 d'aquesta casa comercial (v. annex A.4), que contenen diferents condicions salines, precipitants polimèrics i solvents orgànics, també a diferents pHs.

La temperatura de treball s'ha mantingut a 4°C, ja que els parells de bases ATs tenen només dos ponts d'hidrogen, i es desestabilitzen fàcilment a temperatures superiors a 25 °C. El factor que s'ha modificat per a variar la solubilitat del complex proteïna-DNA (o bé pèptid-DNA) i així intentar obtenir cristalls és la concentració de precipitant del pou. En alguns casos, també s'ha modificat la concentració salina del pou (afegint NaCl).



La formació de cristalls es detecta mitjançant la microscòpia amb llum polaritzada. Les càpsules es van observant periòdicament (normalment dos cops per setmana), per detectar possibles canvis. Els cristalls que interessen per a la difracció amb raigs X són aquells que tenen alta birrefringència, són uniformes i amb els costats rectes i sense esquerdes.

Quan es forma un cristall prou bo per a poder ser difractat es congela. A tal efecte, s'agafa el cristall amb un *loop*, format per un llaç de niló molt fi, i es submergeix en nitrogen líquid. Aquest fil està unit a la cara interior de la tapa d'un vial (v. figura 5.15). Es conserva dins del vial ple de nitrogen líquid, inserit en una canya (que pot allotjar diferents vials) i tot plegat, dins d'un dipòsit amb nitrogen (anomenat *Dewar*) fins a la seva difracció.

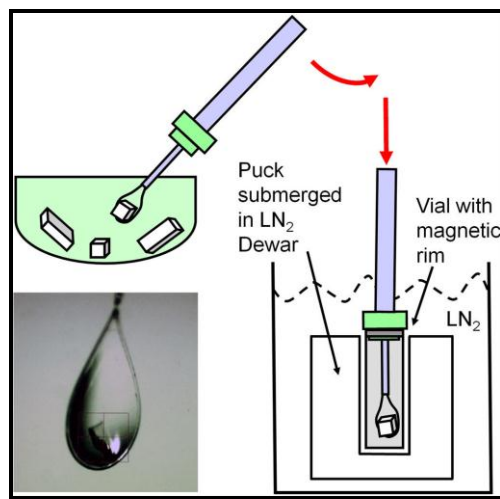


Fig. 5.15: Esquema del procés de congelació amb el detall d'un *loop*. Figura extreta de: <http://www.ruppweb.org/Garland/errata.htm>.



## 5.6 Difracció de raigs X

Els raigs X són una radiació electromagnètica amb una longitud d'ona entre 0,5 i 2 Å, longitud comparable a la distància interatòmica de les molècules estudiades.

La cristal·lografia de raigs X és una de les tècniques físiques més potents per a la resolució de problemes estructurals de la matèria sòlida ordenada. Un estudi estructural correctament realitzat és capaç de proporcionar una fotografia tridimensional a escala atòmica del material cristal·litzat. La figura 5.16 mostra un esquema del procés que s'ha de seguir.

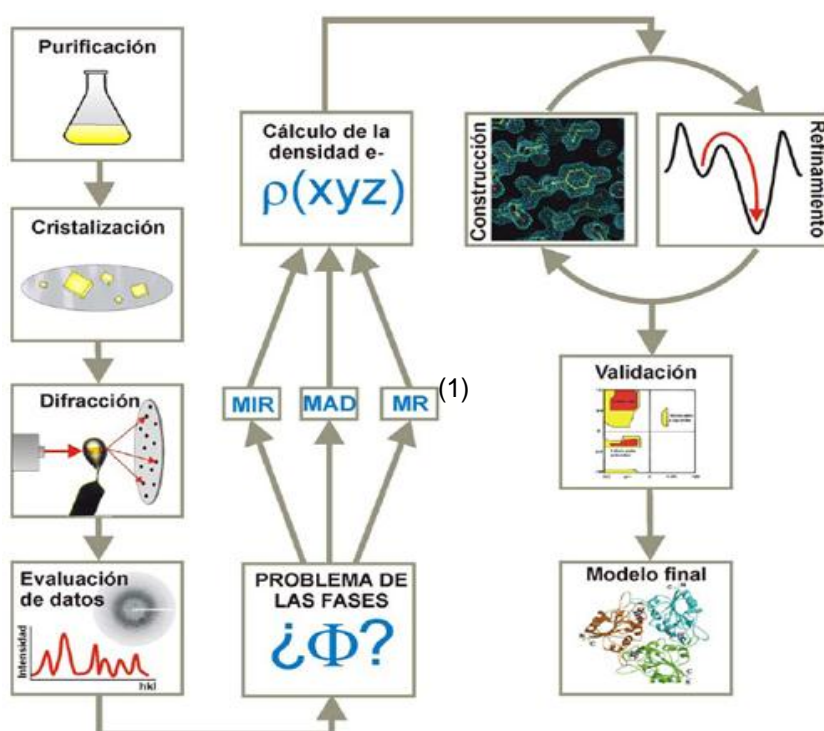


Fig. 5.16: Esquema del procés que cal seguir per a obtenir l'estructura tridimensional d'una molècula mitjançant cristal·lografia de raigs X. (1) MIR, MAD i MR són diferents mètodes per tal de resoldre el problema de les fases (v. apartat 5.6.3). Figura extreta de: <http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/index.html>.

A continuació es parlarà d'alguns conceptes importants, així com del procés de difracció amb raigs X i del tractament de les dades obtingudes.



### 5.6.1 Conceptes previs

L'estat cristal·lí de la matèria és el de major ordre. Els materials cristal·lins tenen una estructura interna ordenada com una xarxa tridimensional a la qual es repeteix, mitjançant operacions de translació, una unitat geomètrica simple. Hi ha tres elements que permeten definir correctament aquesta xarxa: la unitat asimètrica, la cel·la unitària i el grup espacial.

#### **Unitat asimètrica**

S'entén per unitat asimètrica (o motiu) al conjunt mínim de molècules (o àtoms o ions) que conforma la unitat fonamental de la xarxa, de tal forma que qualsevol altra part del cristall pot aconseguir-se a partir d'ella mitjançant operacions de simetria (v. figura 5.17).

#### **Cel·la unitària**

Es defineix com el paral·lelepípede més petit que conté totes les operacions de simetria del grup espacial. Queda caracteritzada per la longitud ( $a$ ,  $b$ ,  $c$ ) dels tres vectors paral·lels a les arestes del paral·lelepípede i pels angles que formen entre ells ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) (v. figura 5.17). Per a treballar amb cel·les es considera que el contingut de la cel·la unitària està concentrat en un punt o més anomenats punts reticulars, i, segons la posició d'aquests punts, es poden diferenciar 14 tipus de cel·les anomenades xarxa de Bravais (v. annex A.5).

#### **Grup espacial**

És el conjunt d'operacions de simetria que cal aplicar a la unitat asimètrica per a generar la cel·la unitària. A "*International Tables for X-Ray Crystallography*" [26] surten recollits els 230 tipus de grups espacials que existeixen. Tot i així, per a compostos orgànics, només hi ha 65 tipus perquè no tots els estereoisòmers tenen valor biològic.

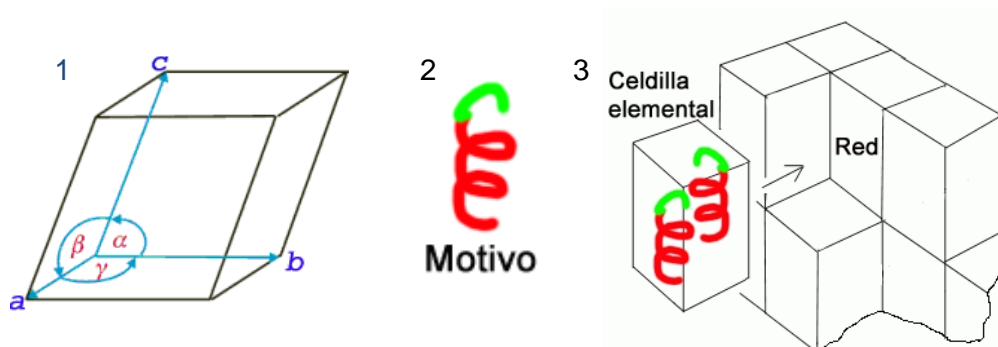


Fig. 5.17: Paràmetres que caracteritzen la cel·la unitària (1), dibuix d'una unitat asimètrica (2) i dibuix d'una cel·la unitària i la xarxa (3). Figura extreta de: <http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia>.



### Índexs de Miller

Des del punt de vista geomètric, a les xarxes cristal·lines es poden considerar línies o plans reticulars, que són els que passen a través dels punts reticulars. Els índexs de Miller són tres nombres enters ( $h, k, l$ ) que s'utilitzen per a identificar i caracteritzar aquests plans. Per definició, els índexs de Miller d'un pla són el valor invers de les interseccions del pla d'interès amb els tres eixos principals del sistema cristal·lí. Per tant, per a conèixer-los es determina, per a cada pla, en quin punt talla cada eix cristal·logràfic i després s'inverteix aquest valor i s'escriu entre parèntesi.

### Llei de Bragg

La difracció de raigs X es dona quan es fa incidir un raig sobre la mostra en una determinada direcció, a la qual els raigs dispersats pels àtoms es combinen i reforcen. Per a descriure la difracció, es poden utilitzar els models geomètrics proposats per Lawrence Bragg. Aquests models estableixen que, quan els raigs X interaccionen amb estructures cristal·lines, es comporten com una reflexió òptica que té lloc a uns plans virtuals (v. figura 5.18).

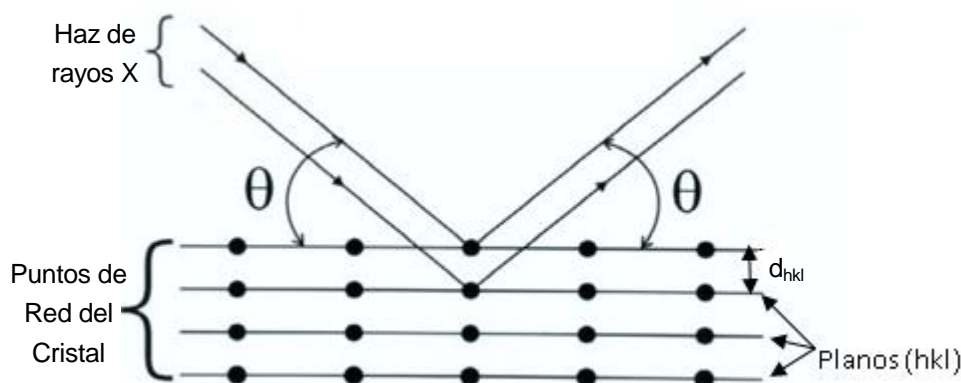


Fig. 5.18: Llei de Bragg. Figura extreta de:  
<http://www.smcr.fisica.unam.mx/8temasutiles/articulosutiles/origen1.htm>.

L'expressió de la llei de Bragg és:

$$\sin \theta = \frac{n \cdot \lambda}{2d_{hkl}} \quad (\text{Eq. 5.4})$$

on:  $n$ : ordre de difracció.

$\lambda$ : longitud d'ona del raig.

$d_{hkl}$ : distància entre plans de difracció.

$\theta$ : angle d'incidència de la radiació.



### **Espai recíproc i esfera d'Ewald**

Una manera de designar els plans  $hkl$  és mitjançant un vector normal al pla i de longitud  $1/d_{hkl}$ , anomenat vector de la xarxa recíproca. Els punts finals de tots els vectors possibles (és a dir, de totes les famílies de plans possibles) conformen l'anomenat espai recíproc, que resulta ser la transformada de Fourier de la xarxa cristal·lina original.

L'esfera d'Ewald (v. figura 5.19) proporciona una interpretació geomètrica del procés de difracció. És un espai que es correspon a l'espai recíproc i mostra quines són les reflexions que es veuen en una imatge de difracció en funció de l'angle  $\theta$  entre la mostra i el raig. Per a obtenir-la, es dibuixa una esfera de radi  $1/\lambda$ , que té al centre el cristall real (punt C), i s'escull arbitràriament l'origen de la cel·la recíproca ( $O^*$ ), orientada conseqüentment amb la cel·la original. Els raigs X travessen una sèrie de plànols d'índex  $hkl$  amb un cert angle  $\theta$ .

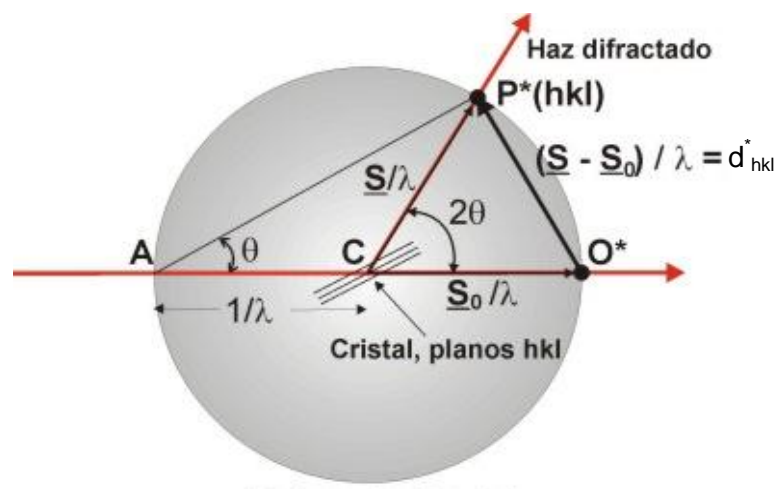


Fig. 5.19: Esfera d'Ewald. Figura extreta de: <http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia>.

### **5.6.2 Difracció de raigs X**

Per tal de conèixer l'estructura tridimensional del complex proteïna-DNA mitjançant assajos de difracció es fan servir els raigs X de l'ordre d'1 Å. Aquests s'aconsegueixen als laboratoris de cristal·lografia (en els tubs generadors de raigs X) o bé a les grans instal·lacions de sincrotró (com ara el ESRF: *European Synchrotron Radiation Facility*).

Es necessita que la radiació incident sigui monocromàtica, la qual interacciona amb la mostra cristal·lina mitjançant els electrons que la conformen. Els raigs X dispersats pels electrons interfereixen entre sí i, segons la natura dels cristalls, s'obtenen diferents difraccions. Als detectors es realitza el registre de les reflexions dels raigs difractats.



La mostra cristal·lina es col·loca en un goniòmetre. Aquest instrument permet situar el cristall en qualsevol orientació espacial per a poder recollir les reflexions de tots els plans possibles.

Durant el procés de difracció s'ha de refrigerar amb nitrogen fred, ja que el raig incident fa arribar a una temperatura prou elevada com per a poder degradar la mostra. A la figura 5.20 es pot observar una imatge que mostra totes les parts del *Image Plate Scanner*.

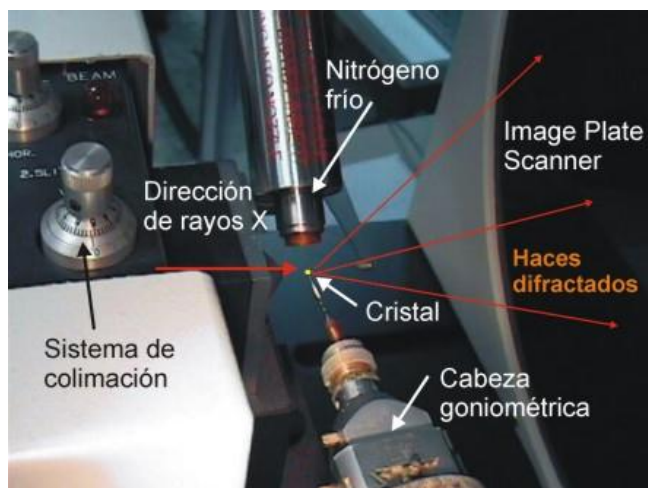


Fig. 5.20: Parts d'un Image Plate Scanner. Figura extreta de: <http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia>

En aquest cas, s'han utilitzat els serveis de la Plataforma Cristal·logràfica del Parc Científic, amb un generador de raigs X amb ànode rotatori de coure de longitud d'ona constant i igual a 1,5418 Å.

### **Procediment**

Es necessitarà tenir a mà el bidó de nitrogen on hi ha guardats els cristalls (*Dewar*), un recipient amb nitrogen líquid, unes pinces especials (criotró) per a manipular els *loops*, una vareta magnètica i un *loop* buit.

El primer que cal fer és portar a la sala experimental els cristalls que es troben conservats en nitrogen, juntament amb el material mencionat anteriorment. Un cop està tot preparat, es col·loca el *loop* buit al goniòmetre per tenir una referència d'on estarà el cristall (per comprovar que sempre està davant del raig).





Un cop centrat, arriba una part delicada: col·locar el cristall al goniòmetre. D'una banda, amb la vareta magnètica, cal subjectar la base del *loop* (el *cryo-pin*), mentre que es retira la tapa. Tot seguit s'agafa amb el criotrò i es col·loca amb molta cura al goniòmetre. Es manté refrigerat constantment pel raig de nitrogen fred. Tot seguit, cal reajustar el cristall i centrar el goniòmetre, per tal que el raig incideixi sobre el cristall en tots els possibles angles de gir.

A continuació, des de la cabina de control s'introdueixen els valors de les variables que es modifiquen, que són:

- Temps que dura la recollida.
- Número d'imatges que es recullen.
- L'angle d'oscil·lació o angle que gira el goniòmetre durant la captura de cada imatge.
- Angle total girat pel goniòmetre.
- La distància entre el cristall i el detector.
- La longitud d'ona del raig (en aquest cas és constant i igual a 1,5418 Å).

D'aquest procés s'obtenen un seguit de diagrames de difracció, corresponents cadascun a un gir determinat del goniòmetre.

### 5.6.3 Anàlisi dels resultats

El procés d'anàlisi dels diagrames de difracció consta de les següents fases:



Fig. 5.21: Esquema del procediment d'anàlisi dels resultats.

#### ***Indexat i escalat***

Un cop s'han recollit tots els diagrames de difracció, es comença treballant amb una de les imatges obtingudes.



L'índexat consisteix a, mitjançant el programa informàtic *Denzo* [27], arribar a conèixer tots els índexs de Miller d'aquesta imatge. A partir d'aquests valors, el programa pot trobar les direccions dels eixos i, per tant, la cel·la unitària i el grup espacial. A partir de les dades proporcionades, cal definir la cel·la que s'ajusti millor (cal comentar que en tots els passos s'obtenen uns valors estadístics que serveixen per avaluar les dades obtingudes). Un cop coneguts aquests índexs, es repeteix el procediment per a trobar els valors hkl de totes les imatges obtingudes.

A continuació, es fa l'escalat, amb el programa *Scalepack* [27]. L'escalat consisteix a posar en un únic fitxer totes les reflexions registrades a les diferents imatges i obtenir una mitjana de totes les intensitats, amb el seus valors d'hkl.

### **Resolució de l'estructura: el problema de les fases**

El següent pas és resoldre l'estructura. Això implica resoldre la funció de densitat electrònica:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \cdot \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)| \exp[-2\pi \cdot i \cdot (hx + ky + lz) + i \cdot \alpha(hkl)] \quad (\text{Eq. 5.5})$$

Amb l'índexat i l'escalat es coneixen els índexs de Miller (hkl). D'altra banda, amb les intensitats de les reflexions que s'observen als diagrames de difracció es pot conèixer el mòdul dels factors d'estructura ( $|F(hkl)|$ ), que són unes magnituds que equivalen a la resultant de la dispersió de tots els àtoms de la cel·la, per a cada punt de l'espai recíproc.

L'única incògnita de l'equació seria l'angle de fase  $\alpha(hkl)$  que dóna una idea de com estan col·locades les molècules. És per això que per a resoldre l'estructura, cal resoldre el problema de les fases.

Existeixen diferents mètodes per tal de resoldre el problema de les fases, tot i que els mètodes directes tenen aplicacions només per a molècules petites. Per tant, els aplicables a macromolècules, que és el cas d'estudi, tots són indirectes i cal anar provant diferents iteracions fins a trobar un resultat satisfactori. Arribats a aquest punt, mitjançant el Reemplaçament Molecular es troba la posició correcta de la macromolècula i es pot proposar un model que, després d'un posterior afinament de les dades (on s'ajusten millor les posicions dels àtoms, s'afegeixen, si cal, altres ions, precipitants...), portaria a l'obtenció dels mapes de densitat electrònica. Un cop s'han validat aquests mapes, verificant diferents paràmetres, s'acaba proposant l'estructura del complex.



## 6. RESULTATS

### 6.1 Preparació de les mostres d'oligonucleòtid i pèptid

En aquest projecte s'ha treballat amb dos oligonucleòtids diferents: l' $A_2TA_2T_2AT_2$  i el  $G_3A_3T_3C_3$ .

#### *Oligonucleòtid $A_2TA_2T_2AT_2$*

Les primeres gotes es van realitzar amb mostres ja dissoltes d'aquest oligonucleòtid. Tot i així, es va acabar aquest estoc de mostra i va ser necessari preparar més oligonucleòtid i calcular-ne la seva concentració tal com s'ha explicat a l'apartat 5.1.

Com a pas previ, es calcula el coeficient d'extinció molar  $\epsilon_{260nm}$  d'aquest oligonucleòtid a partir de l'equació de Cantor (Eq. 5.2):

$$\begin{aligned}\epsilon_{260} = \epsilon_{A_2TA_2T_2AT_2} &= 2 \cdot (2 \cdot \epsilon_{ApA} + 3 \cdot \epsilon_{ApT} + 2 \cdot \epsilon_{TpA} + 2 \cdot \epsilon_{TpT}) - 4 \cdot \epsilon_A - 4 \cdot \epsilon_T = \\ &= 2 \cdot (2 \cdot 13,7 + 3 \cdot 11,4 + 2 \cdot 11,7 + 2 \cdot 8,4) - 4 \cdot 15,4 - 4 \cdot 8,7 = 107,2 \text{ l/mmole} \cdot \text{cm}\end{aligned}$$

El punt de partida són uns 2 mg de l'oligonucleòtid en pols que es dissolen en 50  $\mu\text{l}$  d'aigua milliQ estèril. D'aquesta mostra, se'n fa una dilució 1:1000 per calcular la concentració: s'agafen 0,5  $\mu\text{l}$ , i es porta sobre 500  $\mu\text{l}$  d'aigua milliQ estèril. A continuació, s'efectua l'espectre d'absorció d'aquesta dilució entre 190 i 350 nm, i s'obté el gràfic següent:

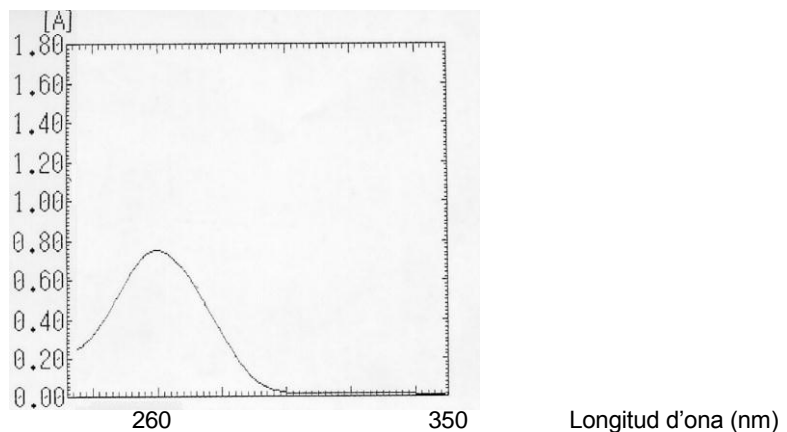


Figura 6.1: Absorbància de la mostra d'oligonucleòtid  $A_2TA_2T_2AT_2$ .

Per últim, es realitza una lectura puntual a 260 nm, que és on es dona el màxim d'absorció de l'enllaç dels nucleòtids, i s'obté  $A=0,742$ .



A partir d'aquest valor, coneixent el coeficient d'extinció molar  $\epsilon$ , mitjançant la llei de Lambert-Beer (Eq. 5.1), es pot calcular la concentració de l'oligonucleòtid:

$$[A_2TA_2T_2AT_2]_{\text{dilució 1:1000}} = \frac{A}{\epsilon \cdot l} = \frac{0,742}{(107,2 \text{ l/mmole} \cdot \text{cm}) \cdot 1 \text{ cm}} = 6,92 \cdot 10^{-3} \text{ mM}$$

Aleshores, la concentració de la mostra mare és:

$$[A_2TA_2T_2AT_2]_{\text{cadena simple}} = [A_2TA_2T_2AT_2]_{\text{dilució 1:1000}} \cdot \frac{500,5 \mu\text{l}}{0,5 \mu\text{l}} = 6,92 \cdot 10^{-3} \cdot \frac{500,5 \mu\text{l}}{0,5 \mu\text{l}} = 6,93 \text{ mM}$$

L'últim pas és calcular la concentració de l'oligonucleòtid de cadena doble:

$$[A_2TA_2T_2AT_2]_{\text{cadena doble}} = \frac{[A_2TA_2T_2AT_2]_{\text{cadena simple}}}{2} = \frac{6,93 \text{ mM}}{2} = 3,46 \text{ mM}$$

### Oligonucleòtid $G_3A_3T_3C_3$

En aquest cas, el factor d'extinció molar és (Eq. 5.2):

$$\begin{aligned} \epsilon_{G_3A_3T_3C_3} &= 2 \cdot (2 \cdot \epsilon_{GpG} + \epsilon_{GpA} + 2 \cdot \epsilon_{ApA} + \epsilon_{ApT} + 2 \cdot \epsilon_{TpT} + \epsilon_{TpC} + 2 \cdot \epsilon_{CpC}) - 3 \cdot \epsilon_A - 2 \cdot \epsilon_G - 3 \cdot \epsilon_T - 2 \cdot \epsilon_C = \\ &= 2 \cdot (2 \cdot 10,8 + 12,6 + 2 \cdot 13,7 + 11,4 + 2 \cdot 8,4 + 8,1 + 2 \cdot 7,3) - 3 \cdot 15,4 - 2 \cdot 11,5 - 3 \cdot 8,7 - 2 \cdot 7,4 \end{aligned}$$

$$\epsilon_{G_3A_3T_3C_3} = 114,9 \text{ l/mmole} \cdot \text{cm}$$

Es dissolen 1,5 mg d'oligonucleòtid en 40  $\mu\text{l}$  d'aigua milliQ estèril. D'aquí també es fa una dilució 1:1000, pipetejant 0,5  $\mu\text{l}$  de la mostra de partida sobre 500  $\mu\text{l}$  d'aigua milliQ estèril. A continuació es mostra l'espectre d'absorció de la mostra:

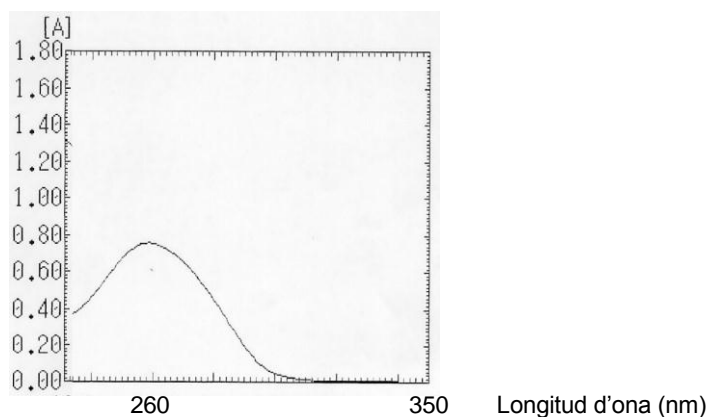


Figura 6.2: Absorbància de la mostra d'oligonucleòtid  $G_3A_3T_3C_3$ .



En fer la lectura puntual a 260 nm s'obté:  $A=0,757$ . Per tant, la concentració de la dilució (Eq. 5.1):

$$[G_3A_3T_3C_3]_{dilució\ 1:1000} = \frac{A}{\varepsilon \cdot l} = \frac{0,757}{(114,9\ l/mm\text{ol} \cdot cm) \cdot 1\text{cm}} = 6,59 \cdot 10^{-3}\text{ mM}$$

La concentració de la mostra mare és:

$$[G_3A_3T_3C_3]_{cadena\ simple} = [G_3A_3T_3C_3]_{dilució\ 1:1000} \cdot \frac{500,5\ \mu\text{l}}{0,5\ \mu\text{l}} = 6,59 \cdot 10^{-3} \cdot \frac{500,5\ \mu\text{l}}{0,5\ \mu\text{l}} = 6,60\text{ mM}$$

I, per últim, la concentració de l'oligonucleòtid de cadena doble és:

$$[G_3A_3T_3C_3]_{cadena\ doble} = \frac{[G_3A_3T_3C_3]_{cadena\ simple}}{2} = \frac{6,60\text{ mM}}{2} = 3,30\text{ mM}$$

### **Pèptid RKPRGRPCK**

El pèptid amb que s'ha treballat té la seqüència aminoacídica corresponent al tercer *AT-hook* de la proteïna HMGA1b(1-90), és a dir: RKPRGRPCK (figura 6.3). S'han utilitzat dos estocs de pèptids que ja estaven preparats prèviament. Un d'ells es trobava a una concentració de 2 mM i l'altre a 4 mM en aigua.

## **6.2 Obtenció de la proteïna HMGA1b(1-90)**

La proteïna amb la que s'ha treballat, l'HMGA1b(1-90), és un mutant de la proteïna humana HMGA1b al qual s'ha extret la cua acídica terminal (figura 6.3). S'ha treballat amb aquesta i no amb la sencera perquè és d'esperar que aquest mutant cristal·litzi amb més facilitat que la proteïna original al no presentar el tram d'aminoàcids de l'extrem carboxil terminal que dificultarien la formació de complexos amb el DNA.

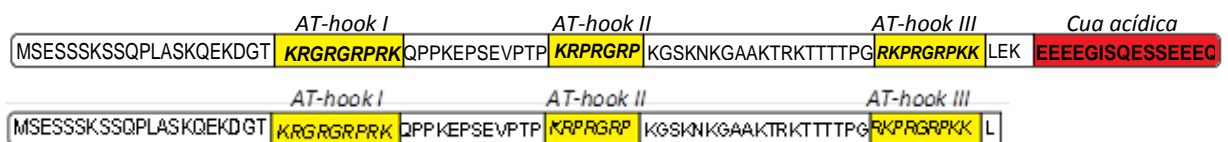


Fig. 6.3: Proteïna HMGA1b (part superior) i mutant HMGA1b(1-90) (part inferior). Es destaca en groc els tres *AT-hooks* de les proteïnes i en vermell la cua acídica terminal.



La proteïna s'ha obtingut en un cultiu bacterià d'*Escherichia coli*, mitjançant la tècnica del DNA recombinant (v. apartat 5.3.1).

El primer que s'ha fet és introduir el gen que codifica la proteïna HMGA1b(1-90) en un estoc de cèl·lules competents d'*Escherichia coli* soca Rosetta(DE3)pLysS (obtingudes segons el protocol de l'annex A.1), i s'han sembrat sobre una placa que conté el medi de cultiu LB amb ampicil·lina. S'ha observat com han crescut colònies de bacteris, i s'ha picat una colònia de cèl·lules transformades sobre un tub amb 3 ml de medi LB i ampicil·lina. Passades unes 6 h d'incubació amb agitació i a 37°C, s'ha abocat tot el contingut del tub sobre 50 ml de medi LB amb ampicil·lina fresc, i s'ha deixat incubant tota la nit, en les mateixes condicions.

A l'endemà, s'ha inoculat un volum suficient d'aquest cultiu sobre 1 litre de medi LB, aconseguint que la  $DO_{600}$  del conjunt es trobi entre 0,1 i 0,2. Més exactament, s'han afegit 22 ml del cultiu sobre 1 litre d'LB. Cal comentar que aquest procés s'ha fet per duplicat, per tal d'obtenir dos litres d'inducció i aconseguir més quantitat de proteïna. S'han anomenat (1) i (2) els dos erlenmeyers amb els cultius i s'han incubat a 37°C i amb agitació, controlant periòdicament el creixement del cultiu (mitjançant lectures amb l'espectrofotòmetre).

La inducció amb IPTG s'ha iniciat quan la  $DO_{600}$  ha arribat al voltant d'1, i s'ha deixat incubant durant tres hores més. Durant el període d'inducció s'han agafat 3 alíquotes (a temps 0 h, a temps 1,5 h i al final, a temps 3 h) que s'han utilitzat per comprovar les absorbàncies de les mostres i també per a una posterior anàlisi electroforètica (v. taula 6.1 i figura 6.4).

Tot seguit, s'han centrifugat els cultius i recuperat el pellet (sediment bacterià), ja que és on es troba la proteïna d'interès. L'últim pas és fer el tractament del pellet, que s'ha fet seguint el protocol de l'apartat 5.3.2. Amb aquest tractament, s'aconsegueix extreure la proteïna HMGA1b(1-90) de l'interior dels bacteris i eliminar part de les impureses bacterianes. L'extracte enriquit de proteïna que s'obté en acabar aquest processat també s'ha inclòs al gel electroforètic (v. figura 6.4).



Controls d'absorbància	Mostra (1)	Mostra (2)
Absorbància inicial DO <sub>600</sub>	0,087	0,092
Inici inducció (t=0h)	1,017	1,125
Post-inducció (t=1,5h)	1,786	1,856
Post-inducció (t=3h)	1,872	1,950

Taula 6.1: Absorbàncies de les mostres control.

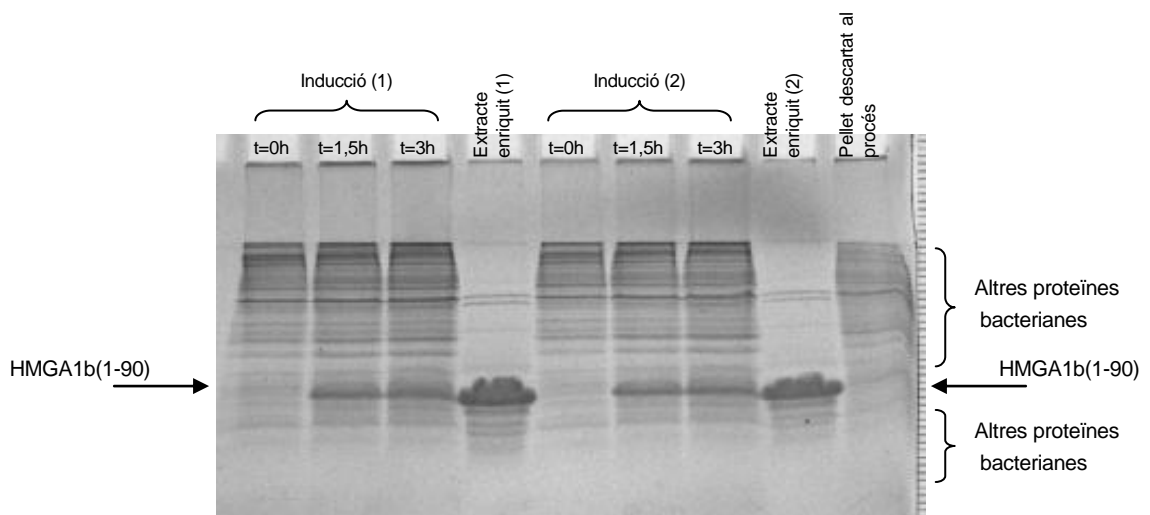


Fig. 6.4: Anàlisi electroforètica en gel de poliacrilamida-SDS del procés d'inducció i extracte enriquit d'aquestes mostres després del tractament del pellet. S'observa a l'últim carril el pellet que s'ha descartat en un dels passos del tractament del sediment bacterià (pas nº4 del protocol).

Tal com es pot observar tant en la mostra (1) com en la mostra (2) quan t=0h encara no s'ha començat a expressar la proteïna d'interès. També es pot veure que quan la inducció porta 1,5 h ja apareix la banda corresponent a la proteïna HMGA1b(1-90), i s'intensifica lleugerament al final de la inducció (t=3 h). D'altra banda, als carrils de l'extracte enriquit d'ambdues mostres apareix una banda molt intensa de proteïna HMGA1b(1-90) i s'observa que ja no hi ha bandes tan marcades de la resta de proteïnes. Per últim, al carril del pellet descartat s'observen nombroses bandes corresponent a diferents proteïnes bacterianes que s'han aconseguit eliminar durant aquest procés sense que hagi comportat pèrdues significatives de la proteïna d'interès.



## 6.3 Purificació cromatogràfica de la proteïna

Tal com s'ha comprovat, després de procedir amb el tractament del pellet s'han aconseguit eliminar moltes de les proteïnes bacterianes. Tot i així, la mostra encara no té l'elevada puresa requerida per a fer els assajos cristal·logràfics. Per això, es procedeix a fer la purificació cromatogràfica de les mostres de proteïna. Es comença amb una cromatografia de bescanvi catiònic, com a primer pas de la purificació, i tot seguit es realitza una cromatografia de gel filtració.

Cal fer una observació abans de continuar. Als assajos cristal·logràfics amb proteïna, s'ha treballat amb dos estocs ben diferenciats. El primer procedia d'una proteïna ja expressada prèviament, però quedava pendent de dur a terme la purificació cromatogràfica. El segon estoc de proteïna, en canvi, va ser expressat i purificat. Per a diferenciar-los, s'ha designat de la manera següent: estoc A (estoc de proteïna que només es va purificar) i estoc B (l'expressat i purificat), diferenciant la B1 (mostra (1) de la inducció) i B2 (mostra (2)).

### 6.3.1 Cromatografia de bescanvi catiònic

Per a la primera etapa de la purificació de la proteïna s'ha efectuat una cromatografia de bescanvi catiònic. La resina de la columna utilitzada és de carboximetilcel·lulosa. Concretament, s'ha fet servir una columna amb un volum empaquetat de 40 ml de la resina CM-52, de la marca Whatman. S'han utilitzat tampons de NaCl/Tris a pH=7, amb concentracions creixents de NaCl per a l'elució de la proteïna, seguint l'esquema que s'indica a la figura 6.5.

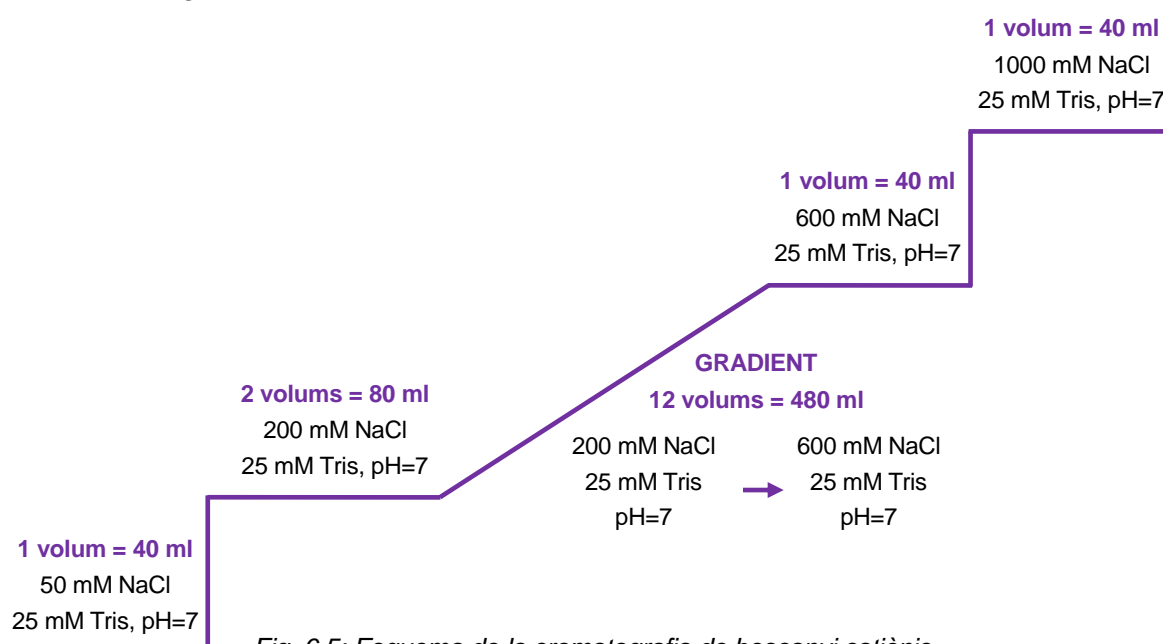


Fig. 6.5: Esquema de la cromatografia de bescanvi catiònic.





S'ha fet circular els tampons a través de la columna amb un flux constant d'1 ml/min. Les mostres s'han recollit en fraccions de 4 ml. S'ha mesurat l'absorbància d'aquestes mostres a 220, 260 i 276 nm. Aquelles mostres que presenten un pic a 220 nm s'han analitzat electroforèticament.

És important que, abans d'introduir la mostra a la columna, es centrifugui per a sedimentar possibles impureses o material insoluble que podria obturar la columna. Tant el sobrenedant, que serà la mostra de partida (MP) per a la columna, com la fracció no dissolta (ND) s'analitzen també electroforèticament.

### a) **Mostra A**

A la figura 35 es mostra el cromatograma i els gels electroforètics corresponents a la mostra A. Els diferents carrils electroforètics s'han designat segons el número de la fracció corresponent del cromatograma.

Es pot observar que el carril ND contenia moltes impureses que s'han extret amb la centrifugació prèvia. Igualment, s'observa que s'han eliminat força proteïnes contaminants durant els rentats amb 50 mM i 200 mM de NaCl, així com a les fraccions corresponents al principi del gradient.

S'observa que al cromatograma apareix un pic principal d'absorbàncies a 220 nm quan la concentració de NaCl es troba entre 350 mM i 400 mM. Com mostren les electroforesis, aquest pic correspon a l'elució de la proteïna d'interès, l'HMGA1b(1-90).

Les mostres més pures són de la fracció 87 a la 92, tot i que també apareix molta quantitat de proteïna de la fracció 93 a la 100 (v. figura 6.6). Però, a aquestes darreres fraccions (93-100) s'observa que hi ha traces d'una banda de major mobilitat electroforètica sota la banda principal de proteïna. Tenint en compte això, s'agrupen les fraccions tal com es mostra a la taula 6.2.

Fraccions conservades columna CM-52 Mostra A	
• Fraccions 87-88.	• Fraccions 93-97.
• Fraccions 89-92.	• Fraccions 98-100.

Taula 6.2: Fraccions conservades de la columna CM-52 de la mostra A per a continuar amb la purificació.



Abans de ser purificades amb la cromatografia de gel-filtració, aquestes fraccions es dialitzen amb el tampó 10 mM Tris, pH=7,5. Degut a la mida de la proteïna (8700 Da), s'utilitzen unes membranes de la marca Spectra/por amb un MWCO de 3500 Da (per evitar que es perdi la proteïna).

També caldrà concentrar la proteïna. Amb aquesta finalitat, s'han utilitzat els concentradors Vivaspin 4 de MWCO 5000 (v. apartat 5.4.5).

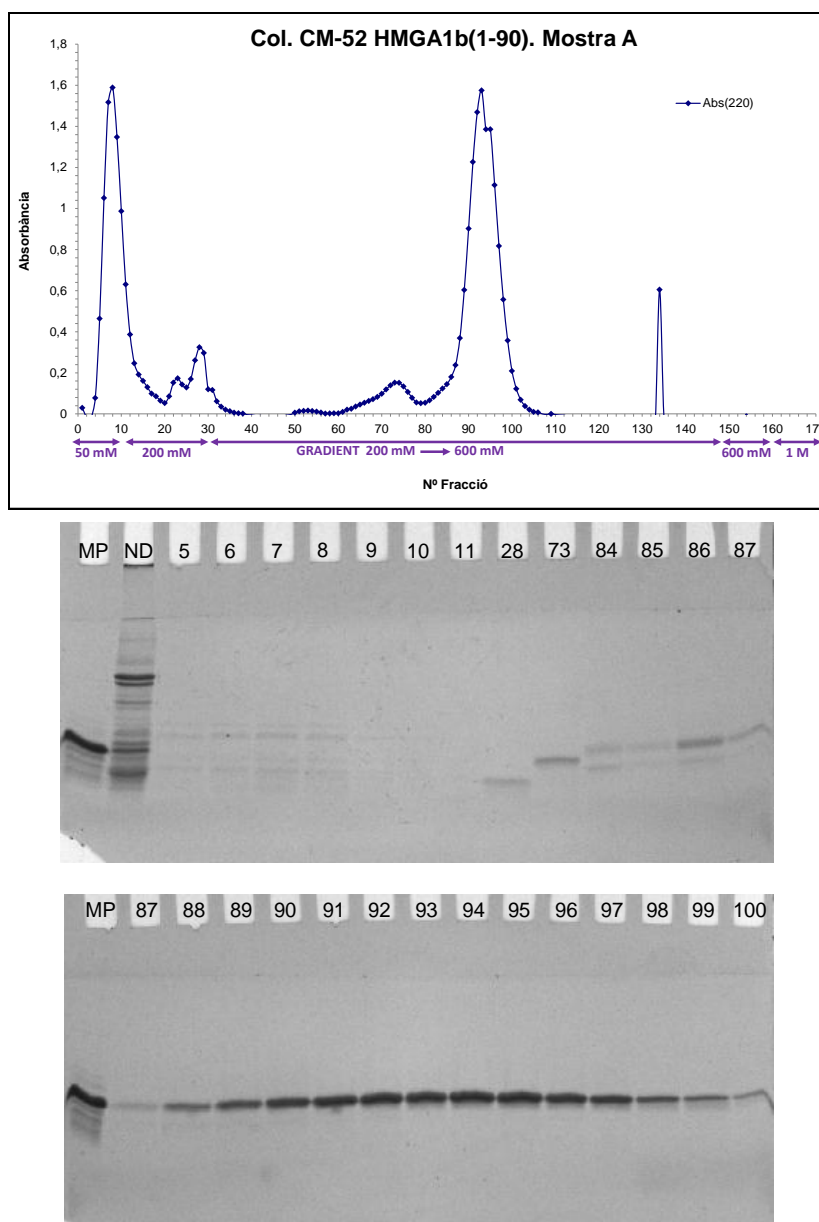


Fig. 6.6. Cromatograma de la columna CM-52 de la mostra A i gels electroforètics d'acrilamida-SDS. MP, mostra de partida; ND, no dissolt; la numeració de la resta de carrils es correspon amb la de les fraccions recollides a la columna (v. més detalls al text).



**b) Mostra B**

A la figura 6.7 es mostra els cromatogrames i les anàlisis electroforètiques corresponents a les mostres B1 i B2, respectivament. Els resultats són molt similars als del cas anterior i, per simplicitat, en aquest cas es mostra només l'electroforesi corresponent al pic d'elució de la proteïna.

S'observa que les fraccions analitzades de les mostres B1 i B2 presenten força concentració de proteïna. En aquest cas, es conserven totes les fraccions que apareixen als gels de la figura 6.7, agrupades inicialment tal com s'observa a la taula 6.3, tot i que després es van reagrupar en funció de la seva puresa i concentració.

Aquestes fraccions també seran dialitzades amb membranes de la marca Spectra/por amb un MWCO de 3500 Da. En aquest cas, el tampó utilitzat per a la diàlisi és 100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH=7,5 que, tal com es veurà, serà el tampó utilitzat a la columna FPLC.

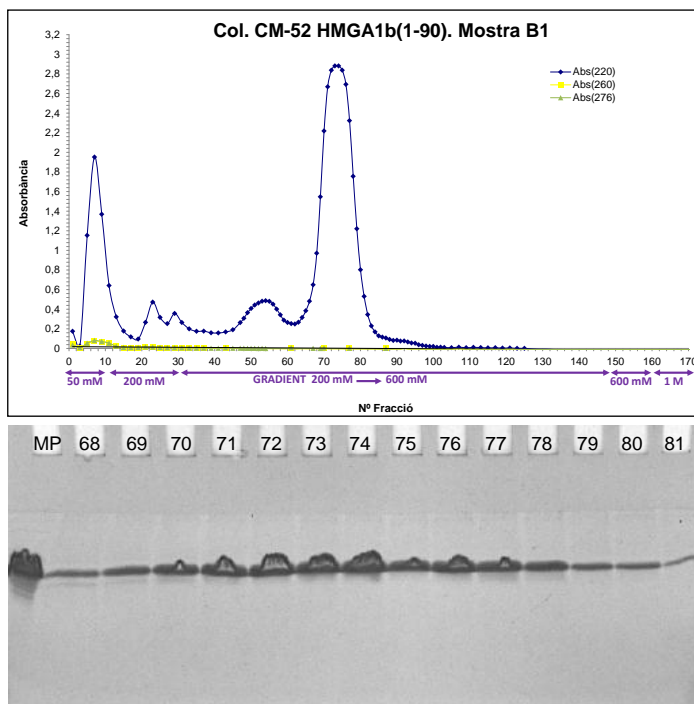
Tot seguit, s'han de concentrar per a evitar treballar amb volums excessius al segon pas de la purificació. Com es partia d'un volum elevat, s'han utilitzat dos tipus de concentradors: el Centriplus YM3 de MWCO 3000 Da (té una capacitat de 10 ml de mostra) i, per a volums petits el Vivaspín 4 de MWCO 5000 Da.

Fraccions dialitzades columna CM-52 Mostra B1	Fraccions dialitzades columna CM-52 Mostra B2
Fraccions 68-69.	Fraccions 67-68.
Fracció 70.	Fracció 69-75.
Fraccions 71-74.	Fraccions 76-80.
Fraccions 75-77.	
Fraccions 78-81.	

*Taula 6.3: Fraccions dialitzades de la columna CM-52 de la mostra B. Es diferencia entre la mostra B1 i la B2.*



Mostra B1



Mostra B2

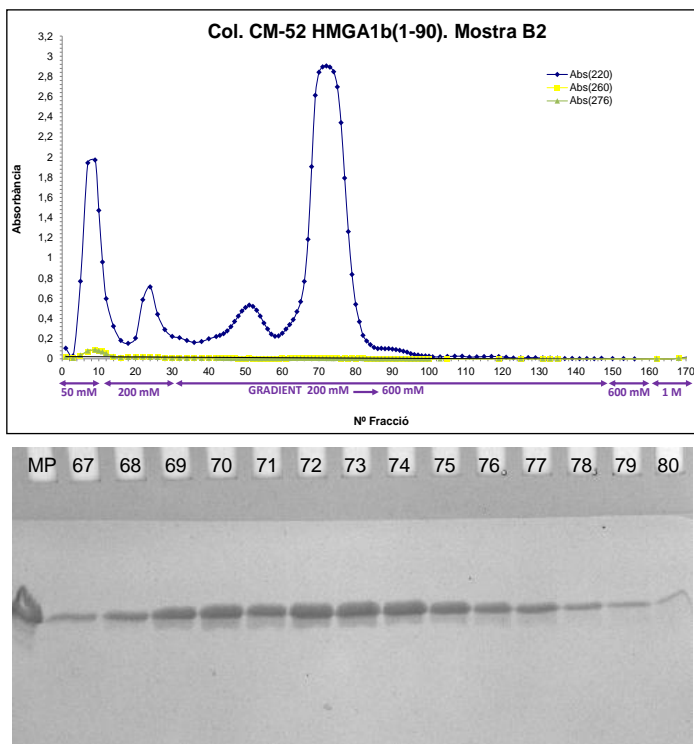
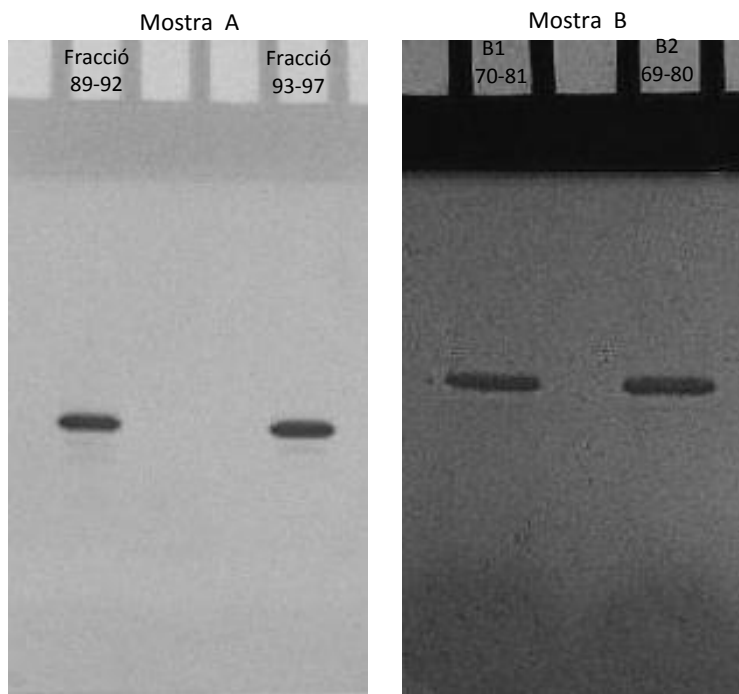


Fig. 6.7: Cromatograma de la columna CM-52 de la mostra B1 i de la B2 i gel electroforètic d'acrilamida-SDS corresponent a les fraccions que formen el pic principal MP, mostra de partida; ND, no dissolt; la numeració de la resta de carrils es correspon amb la de les fraccions recollides a la columna (v. més detalls al text).



A modus de resum, la figura 6.8 mostra el gel obtingut en analitzar electroforèticament les mostres procedents de les columnes CM-52 un cop dialitzades i concentrades, just abans de procedir a la seva repurificació amb la cromatografia de gel-filtració.



*Fig. 6.8: Gels electroforètics d'acrilamida-SDS de les fraccions dialitzades i concentrades de les columnes CM-52 de la mostra A i de la mostra B.*

S'observa que les fraccions seleccionades són ja d'elevada puresa. Tot i així, apareixen unes bandes molt subtils a sota de la banda de proteïna HMGA1b(1-90). Per tal d'eliminar aquestes bandes es continua amb la purificació cromatogràfica, en aquest cas mitjançant la cromatografia de gel-filtració.



### 6.3.2 Cromatografia de gel-filtració

Per a l'últim pas de la purificació cromatogràfica de la proteïna s'ha utilitzat la cromatografia de gel-filtració. Per tal de dur-la a terme, s'ha utilitzat un sistema FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*). La columna utilitzada és la Superdex 75 10/300 GE de Healthcare amb un rang de separació de proteïnes de 3.000 - 70.000 Da i un volum empaquetat de 24 ml. L'equip utilitzat és l'AKTA Purifier 10 GE de Healthcare.

L'esquema d'aquesta columna és molt més senzill que l'anterior ja que el tampó d'equilibrat i el d'elució són el mateix:

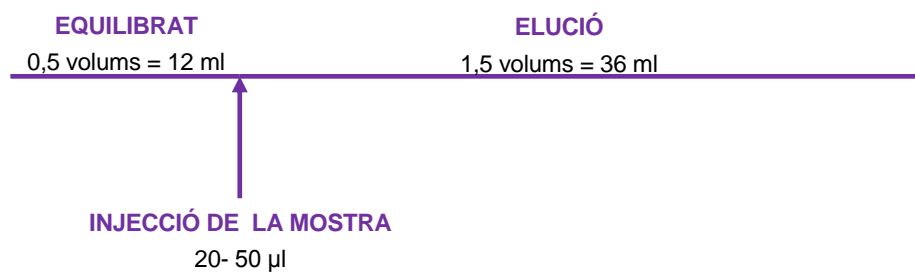


Fig. 6.9: Esquema de la cromatografia de gel-filtració.

Abans d'injectar la mostra, també cal centrifugar-la per eliminar possibles insolubles.

El volum injectat de mostra depèn de quina concentració tingui cada fracció. En aquest treball s'ha carregat de l'ordre de 20 a 50 µl.

#### a) Mostra A

Amb la proteïna purificada i concentrada de la mostra A, s'han provat diferents tampons d'elució, a fi de trobar el més adequat per a eluir la proteïna. Concretament, s'han provat els tampons:

- 100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH=7,5.
- 50 mM NaCl, 10 mM Tris, pH=7,5.
- 0,005% Tween, 10 mM Tris, pH=7,5.



El tampó corresponent s'ha fet passar per la columna amb un flux constant de 0,5 ml/min, i s'han recollit les mostres en fraccions de 0,5 ml. S'ha mesurat l'absorbància de les fraccions a 220 nm, 260 nm i 280 nm i, posteriorment, s'han analitzat electroforèticament aquelles mostres que formaven part del pic d'absorbància a 220 nm.

Les figures 6.10 i 6.11 mostren un exemple representatiu dels cromatogrames obtinguts per a la purificació de la mostra A amb cadascun dels tampons mencionats anteriorment. No s'aprecien diferències significatives entre columnes que s'han realitzat amb el mateix tampó.

A la figura 6.10 es pot observar que les mostres presenten un comportament molt similar en l'elució tant en 50 mM com en 100 mM de NaCl. També s'aprecia que la fracció 89-92 dóna un pic amb molta simetria, tret d'una petita cua a la banda dreta. La fracció 93-97, en canvi, mostra un pic més asimètric (té una cua una mica més pronunciada). Aquesta cua podria ser la corresponent a la banda amb major mobilitat electroforètica que s'observava al gel de la columna CM-52.

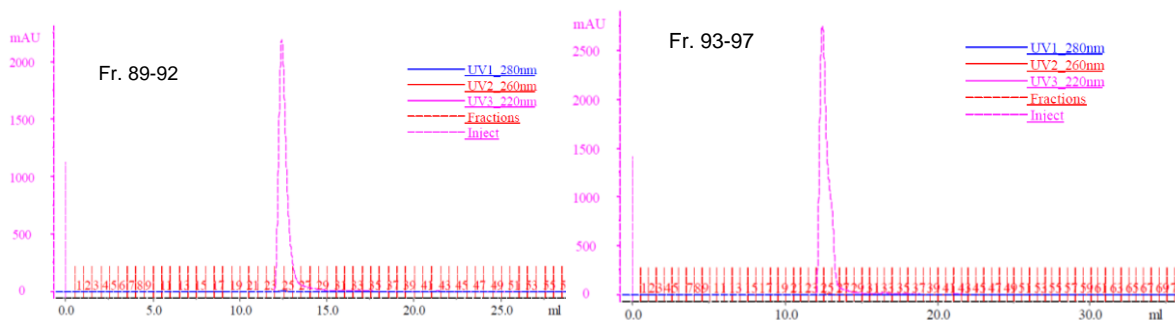
Considerant aquestes observacions, es seleccionen les mostres del principi del pic, descartant les que formen part de la cua del pic ja que interessa que la fracció utilitzada per a cristal·lografia sigui el més pura possible.

D'altra banda, a la figura 6.11 s'observa que amb el tampó amb Tween no hi ha elució de la proteïna. Podria ser que s'hagin format agregats i es quedi retinguda a la columna. Al passar després 100 mM de NaCl es recupera la proteïna.

Tenint en compte aquests resultats, es decideix continuar treballant amb 100 mM NaCl.



Tampó 50 mM NaCl, 10 mM Tris, pH=7,5



Tampó 100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH=7,5

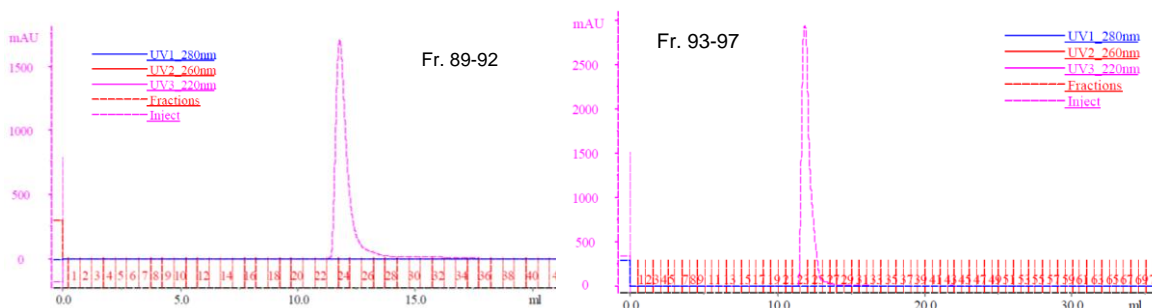


Fig. 6.10: Cromatogrames de les columnes FPLC Mostra A. Tampó 50 mM, 10 mM Tris, pH=7,5 (a dalt) i tampó 100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH=7,5 (abaix).

Tampó 0,005% Tween, 10 mM Tris, pH=7,5

RENTAT 100 Mm NaCl, 10 mM Tris, pH=7,5

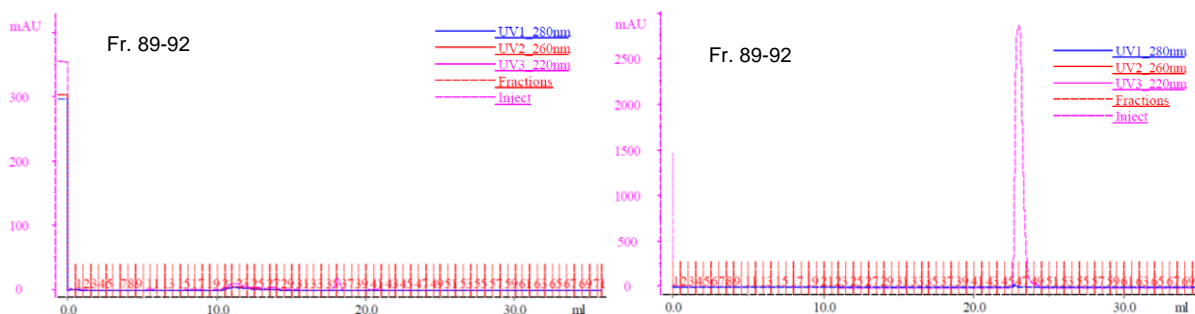


Fig. 6.11: Cromatogrames de les columnes FPLC Mostra A. Tampó 0,005% Tween, 10 mM Tris, pH=7,5 (esquerra) i rentat amb 100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH=7,5 (dreta) de la mateixa mostra.





A continuació es presenta una taula resum de les diferents FPLCs realitzades a partir de la mostra A i de les mostres que s'han guardat de cadascuna.

FPLC	PROTEÏNA (Mostra A)	TAMPÓ	FRACCIONS CONSERVADES
1	HMGA1b(1-90) Fr. 93-97	100 mM NaCl 10 mM Tris, pH=7,5	Fr. 10-11
2	HMGA1b(1-90) Fr. 89-92	100 mM NaCl 10 mM Tris, pH=7,5	Fr. 23-24
3	HMGA1b(1-90) Fr. 93-97	50 mM NaCl 10 mM Tris, pH=7,5	Fr. 24-25
4	HMGA1b(1-90) Fr. 89-92	50 mM NaCl 10 mM Tris, pH=7,5	Fr. 24-25
5	HMGA1b(1-90) Fr. 89-92	0,005% Tween 10 mM Tris, pH=7,5	--
	HMGA1b(1-90) Fr. 89-92	RENTAT amb 100 mM NaCl 10 mM Tris, pH=7,5	Fr. 46-47
6	HMGA1b(1-90) Fr. 93-97	100 mM NaCl 10 mM Tris, pH=7,5	Fr. 23-24

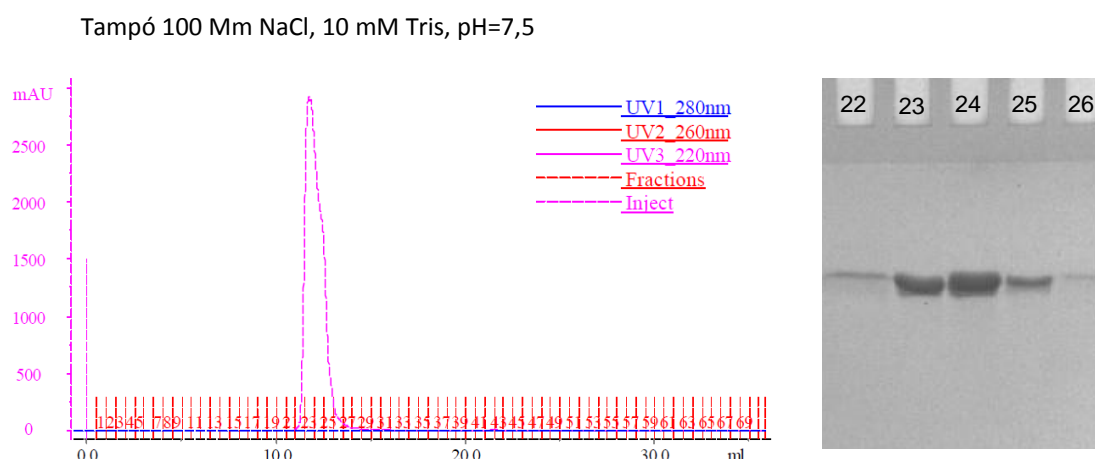
*Taula 6.4: Resum de les cromatografies gel-filtració realitzades per a purificar la Mostra A, especificant quin tampó s'ha utilitzat en cada cas i quines fraccions s'han conservat de cadascuna.*



### b) Mostra B

Amb la mostra B, i tenint en compte els resultats previs amb la mostra A, s'ha utilitzat el tampó 100 mM NaCl, 25 mM Tris, pH=7,5 per a eluir la proteïna. També s'ha decidit introduir, després de cada columna, un rentat amb 500 mM NaCl, 25 mM Tris, pH=7,5 però en cap cas s'han trobat restes de proteïna després d'aquest rentat.

Cal comentar que de la mostra B tan sols s'ha purificat la fracció B2, reservant la fracció B1 per a usos futurs. Tot i així, degut al volum inicial de la mostra, s'han realitzat 5 columnes a partir de la mostra B2. Des del punt de vista dels cromatogrames i dels gels electroforètics, s'han obtingut resultats molt similars en les 5 columnes. Es mostra a continuació un dels cromatogrames de les columnes i el gel corresponent al pic d'elució de la proteïna (v. figura 6.12).



*Fig. 6.12: Cromatograma de la columna FPLC Mostra B2 (tampó 100 mM NaCl, 25 mM Tris, pH=7,5), i gel electroforètic d'acrilamida-SDS corresponent a les fraccions que formen el pic principal de la columna. Els carrils es corresponen amb les fraccions que formen el pic de la FPLC (v. més detalls al text).*

Observant el cromatograma de la figura 6.12, es pot veure un pic molt pronunciat que comença a la fracció 22 i acaba a la fracció 25. En aquest cas, també es pot comprovar que el pic no és del tot simètric. Per aquesta raó s'han conservat per una banda les fraccions inicials del pic i per altra banda les fraccions finals.



La taula 6.5 mostra un resum de les diferents FPLCs realitzades de la mostra B2, així com les fraccions que s'han conservat de cadascuna per a la seva concentració.

FPLC Nº	Fraccions conservades del principi del pic	Fraccions conservades del final del pic
1	23	24-25
2	23	24-25
3	22-23	24
4	22-23	24-25
5	22-23	24-25

*Taula 6.5: Resum de les cromatografies gel-filtració realitzades per a purificar la Mostra B2, especificant quines fraccions s'han conservat de cadascuna. Totes les mostres es troben en tampó 100 mM NaCl, 25 mM Tris, pH=7,5 (v. més detalls al text).*

## 6.4 Concentració final de la proteïna

Tal com s'ha comentat en apartats anteriors, la proteïna ha de ser com més pura i més concentrada millor per a poder realitzar els assajos cristal·logràfics. Ara que s'ha aconseguit un estoc prou pur de cadascuna de les mostres de proteïna HMGA1b(1-90), cal procedir a concentrar-la.

### a) Mostra A

Cal recordar que les fraccions conservades de la mostra A no es troben totes en el mateix tampó: algunes estan dissoltes en 100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH=7,5 i d'altres en 50 mM NaCl, 10 mM Tris, pH=7,5. Per partir d'un estoc en les mateixes condicions i tenint en compte que per als assajos cristal·logràfics és més recomanable que el contingut salí no sigui tan elevat, s'han diluït les fraccions amb més concentració de sal per a aconseguir que totes les mostres quedin amb el tampó 50 mM NaCl, 10 mM Tris, pH=7,5. Això s'aconsegueix diluint-les amb un volum de 10 mM Tris, pH=7,5.

Tot seguit s'ajunten les diferents fraccions i es concentren amb un Vivaspín 4 de MWCO 5000.



## b) Mostra B2

S'han reunit d'una banda totes les fraccions conservades del principi del pic, i de l'altra totes les fraccions conservades del final del pic (v. taula 6.5). Aquests dos estocs de proteïna es concentren en paral·lel.

Anàlogament a com s'ha procedit amb la mostra A, es dilueixen els dos estocs amb tampó 25 mM Tris, pH=7,5 fins a assolir una concentració de 50 mM de NaCl. Tot seguit, es concentren utilitzant el concentrador Vivaspın 6 MWCO 3000.

Per tal de calcular la concentració de les mostres concentrades de proteïna, s'utilitza la llei de Lambert-Beer (v. apartat 5.4.6), utilitzant el factor d'extinció de la proteïna HMGA1b, que és  $\epsilon_{220\text{ nm}} = 6,37 \text{ ml/mg}\cdot\text{cm}$ . Per tant, l'expressió de Lambert-Beer (Eq. 5.1) queda:

$$[HMGA1b(1-90)] = \frac{A_{220\text{ nm}}}{\epsilon_{220\text{ nm}} \cdot l} = \frac{A_{220\text{ nm}}}{\left(6,37 \text{ ml/mg}\cdot\text{cm}\right) \cdot 1 \text{ cm}} = \frac{A_{220\text{ nm}}}{\left(6,37 \text{ ml/mg}\right)}$$

Per evitar perdre gaire volum de proteïna durant el càlcul de la seva concentració, s'ha diluït 1  $\mu\text{l}$  de mostra en 800  $\mu\text{l}$  del seu tampó corresponent i s'ha llegit l'absorbància. Tot seguit, s'ha afegit un altre microlitre i s'ha tornat a llegir l'absorbància. A continuació, s'ha calculat la concentració de la mostra de partida tenint en compte el factor de dilució aplicat a cada cas. Per últim, s'ha calculat la mitjana d'ambdós valors.

A modus de resum, es mostra a la figura 6.13 els gels electroforètics d'acrilamida-SDS corresponents a les fraccions finals concentrades. En aquests gels es pot comprovar que les fraccions obtingudes són molt pures (no s'observen traces d'altres proteïnes). Igualment, a la taula 6.6 es mostra un resum del volum i concentracions de cada una de les fraccions.



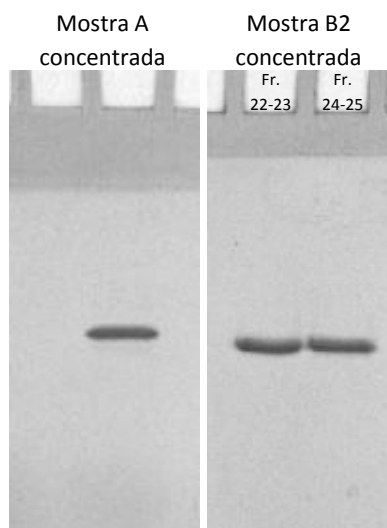


Fig. 6.13: Gels electroforètics d'acrilamida-SDS de les mostres de proteïna que s'utilitzaran als assajos cristal·logràfics. S'observa l'estoc de mostra A i els dos estocs disponibles de la mostra B2.

MOSTRA	TAMPÓ	VOLUM MOSTRA	CONCENTRACIÓ
A:HMGA1b (1-90) (Fr. 89-97)	50 mM NaCl 10 mM Tris, pH=7,5	78 $\mu$ l	18,84 mg/ml (2,16 mM)
B2: HMGA1b (1-90) (Fr. 22-23 FPLC)	50 mM NaCl 25 mM Tris, pH=7,5	100 $\mu$ l	15,35 mg/ml (1,77 mM)
B2: HMGA1b (1-90) (Fr. 24-25 FPLC)	50 mM NaCl 25 mM Tris, pH=7,5	100 $\mu$ l	24,95 mg/ml (2,87 mM)

Taula 6.6: Resum de les fraccions finals de proteïna obtingudes per als assajos cristal·logràfics.

Per als assajos cristal·logràfics s'han utilitzat finalment en aquest treball la mostra A i l'estoc de les fraccions 22-23 (el de les fraccions del principi del pic) de la mostra B2, tot i que l'altre estoc es conserva congelat.



## 6.5 Assajos cristal·logràfics

Un cop obtinguda una fracció prou pura de proteïna, es poden fer els assajos cristal·logràfics. L'objectiu perseguit és aconseguir cristal·litzar un complex de proteïna amb un oligonucleòtid ric en ATs. S'ha treballat amb la proteïna HMGA1b(1-90) i dos oligonucleòtids rics en ATs: l' $A_2TA_2T_2AT_2$  i el  $G_3A_3T_3C_3$ . D'altra banda, també s'ha intentat obtenir cristalls d'un pèptid sintètic que té la seqüència corresponent al tercer *AT-hook* de la proteïna d'interès (RKPRGRPCK) amb l'oligonucleòtid  $A_2TA_2T_2AT_2$ .

Com a comentari general cal dir que, majoritàriament, s'han utilitzat tampons de la casa Hampton Research (Natrix HR2-116) (v. annex A.4) que han donat bons resultats en estudis anteriors, tot i que també s'han utilitzat altres tampons "adaptats" d'elaboració pròpia (per tal d'optimitzar resultats, sempre tenint en compte estudis anteriors) (veure annex A.4). La majoria de tampons presenten concentracions baixes de sals, per tal d'evitar la competència d'aquestes sals amb els grups positius de la proteïna en la unió amb l'oligonucleòtid. D'altra banda, també es pretén evitar la formació de cristalls de sal.

Els pHs de treball es troben entre 6 i 7,5 amb la finalitat de treballar en unes condicions pròximes a les fisiològiques.

La temperatura de treball en tots els casos ha estat de 4°C, ja que l'oligonucleòtid  $A_2TA_2T_2AT_2$  és especialment sensible a la temperatura.

Els precipitants utilitzats han estat el PEG, l'MPD i l'isopropanol, modificant la seva concentració progressivament al pou, o variant el tipus de precipitant en alguns casos (per afavorir la cristal·lització).

A continuació es mostren més detalladament les condicions aplicades als assajos cristal·logràfics, així com els resultats obtinguts.

### 6.5.1 Oligonucleòtid $A_2TA_2T_2AT_2$ amb proteïna HMGA1b(1-90)

S'han fet un total de 3 sèries de gotes amb el complex d'HMGA1b(1-90) i  $A_2TA_2T_2AT_2$ . Cal comentar que el complex ha tingut una incubació *over night* per a facilitar la seva formació. La taula 6.7 mostra un resum de les relacions molars i concentracions de cada component, així com de les sals i precipitant utilitzats. Per a més informació dels tampons i major detall de cada gota, veure annex B.1.



GOTES	RELACIÓ MOLAR P/O (CONC. P / CONC. O)	SALS UTILITZADES	PRECIPITANTS UTILITZATS
M1 → M30	1/3 (0,35 mM / 1 mM)	MgCl <sub>2</sub> , MgSO <sub>4</sub> , MgAc, KCl, CaCl <sub>2</sub> , (NH <sub>4</sub> )Ac	MPD, MPD+IP, PEG.
M59 → M70	3/1 (0,3 mM / 0,1 mM)	MgCl <sub>2</sub> , (NH <sub>4</sub> )Ac, CaCl <sub>2</sub> , NaCl, proves sense sal	MPD, MPD+IP.
M71 → M82	2/1 (0,4 mM / 0,2 mM)	MgCl <sub>2</sub> , (NH <sub>4</sub> )Ac, CaCl <sub>2</sub> , NaCl, proves sense sal	MPD, MPD+IP.

*Taula 6.7: Relacions molars P/O (proteïna/oligonucleòtid), concentració molar a la gota, sals utilitzades als experiments i precipitants utilitzats als pous de les càpsules, per a cada sèrie de gotes.*

*La temperatura de treball ha estat 4°C en tots els casos, i els rangs de pH varien entre 6 i 7,5. Ac, acetat; PEG, polietilenglicol; IP, isopropanol.*

#### **Gotes M1 → M30**

S'han obtingut cristalls líquids a cinc gotes, totes elles amb la sal MgCl<sub>2</sub>. Els cristalls líquids que estaven una mica més definits eren de les gotes que tenien una concentració de 20 mM d'aquesta sal. Tres de les gotes amb cristall líquid eren a pH=7, mentre que les altres dues es trobaven a pH=6,5 i 7,5. En tots els casos, el tampó de la gota era un dels adaptats que s'observen a l'annex A.4. Els cristalls no eren prou bons per a ser difractats, per tant no se n'ha pescat cap.

#### **Gotes M59 → M70**

Ha aparegut una separació de fases en totes les gotes, però no s'han observat millores.

#### **Gotes M71 → M82**

En aquesta sèrie de gotes també s'ha pogut observar una separació de fases en totes les gotes. Igualment, la seva evolució no ha estat satisfactòria.



### 6.5.2 Oligonucleòtid G<sub>3</sub>A<sub>3</sub>T<sub>3</sub>C<sub>3</sub> amb proteïna HMGA1b(1-90)

S'han fet un total de 2 sèries de gotes amb el complex d'HMGA1b(1-90) i G<sub>3</sub>A<sub>3</sub>T<sub>3</sub>C<sub>3</sub>. Com en el cas anterior s'ha incubat *over night* per facilitar la formació del complex. La taula 6.8 mostra un resum de les relacions molars i concentracions de cada component, així com de les sals i precipitant utilitzats. Per a una informació més detallada sobre les condicions de cada gota, veure annex B.1.

GOTES	RELACIÓ MOLAR P/O (CONC. P / CONC. O)	SALS UTILITZADES	PRECIPITANTS UTILITZATS
M31 → M58	3/1 (0,6 mM / 0,2 mM)	MgCl <sub>2</sub> , MgSO <sub>4</sub> , MgAc, KCl, CaCl <sub>2</sub> , (NH <sub>4</sub> )Ac	MPD, MPD+IP, PEG.
M83 → M94	2/1 (0,4 mM / 0,2 mM)	MgCl <sub>2</sub> , (NH <sub>4</sub> )Ac, CaCl <sub>2</sub> , NaCl, proves sense sal	MPD, MPD+IP.

*Taula 6.8: Relacions molars P/O (proteïna/oligonucleòtid), concentració molar a la gota, sals utilitzades als experiments i precipitants utilitzats als pous de les càpsules, per a cada sèrie de gotes.*

*La temperatura de treball ha estat 4°C en tots els casos, i els rangs de pH varien entre 6 i 7,5. Cal comentar que a la gota hi ha una concentració de 2,5 mM de NiCl<sub>2</sub>, que ajuda a estabilitzar el DNA, ja que interactua amb les guanines [28]. Ac, acetat; PEG, polietilenglicol; IP, isopropanol.*

#### Gotes M31 → M58

S'han obtingut esferulites (molt petites) a un parell de gotes, a la M50 i a la M51. Ambdues gotes tenien pH=7 i la sal MgCl<sub>2</sub>, una amb una concentració 10 mM i l'altra amb una concentració de 20 mM. Tot i així, no han evolucionat favorablement i no ha sorgit cap cristall a partir d'elles. A la resta de gotes s'ha format una separació de fases amb molta tendència a donar precipitat.

#### Gotes M83 → M94

També s'han obtingut esferulites a dues de les gotes (M90 i M91): la primera té 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH= 7 i l'altra té 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH= 6. La seva evolució no ha estat favorable i no s'ha pogut pescar cap cristall. A la resta de gotes d'aquesta sèrie ha aparegut separació de fases amb molta tendència a precipitar.





### 6.5.3 Oligonucleòtid A<sub>2</sub>TA<sub>2</sub>T<sub>2</sub>AT<sub>2</sub> amb el pèptid RKPRGRPCK

S'han fet un total de 2 sèries de gotes amb el complex de RKPRGRPCK i A<sub>2</sub>TA<sub>2</sub>T<sub>2</sub>AT<sub>2</sub>. Observant els resultats obtinguts en les primeres gotes, s'ha donat prioritat als tampons que contenen MgCl<sub>2</sub> per a fer les gotes, tot i que també s'ha utilitzat altres sals com el CaCl<sub>2</sub> i el MgAc.

La taula 6.9 mostra un resum de les relacions molars i concentracions de cada component, així com de les sals i precipitant utilitzats. Per a més informació dels tampons i major detall de cada gota, veure annex B.1.

GOTES	RELACIÓ MOLAR P/O (CONC. P / CONC. O)	SALS UTILITZADES	PRECIPITANTS UTILITZATS
M95 → M103	4/1 (0,8 mM / 0,2 mM)	MgCl <sub>2</sub> , MgAc, CaCl <sub>2</sub> , (NH <sub>4</sub> )Ac	MPD. <i>En alguns casos s'ha afegit IP o NaCl al pou</i>
M104	4/1 (0,72 mM / 0,18 mM)	MgCl <sub>2</sub>	MPD
M105 → M110	2/1 (0,4 mM / 0,2 mM)	MgCl <sub>2</sub> , MgAc, (NH <sub>4</sub> )Ac, CaCl <sub>2</sub>	MPD. <i>En alguns casos s'ha afegit IP o NaCl al pou</i>

Taula 6.9: Relacions molars P/O (pèptid/oligonucleòtid), concentració molar a la gota, sals utilitzades als experiments i precipitants utilitzats als pous de les càpsules, per a cada sèrie de gotes. La temperatura de treball ha estat 4°C en tots els casos, i els rangs de pH varien entre 6 i 7,5. M104: la concentració molar és diferent perquè es va acabar l'estoc de partida de pèptid i es va utilitzar un altre estoc amb diferent concentració, tot i així, la relació molar és la mateixa que a la resta de la sèrie.

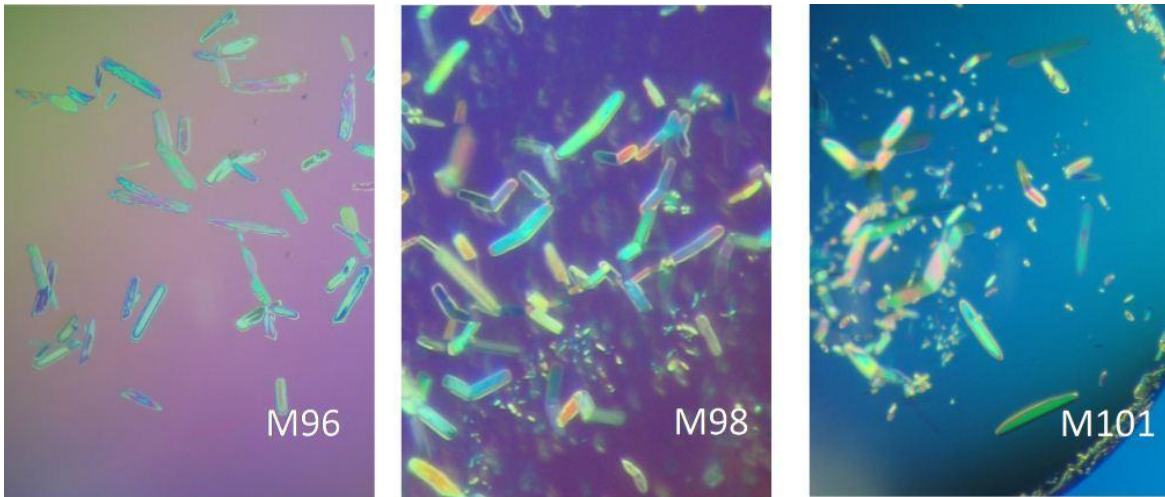
#### Gotes M95 → M103 i M104

Amb aquestes condicions s'han aconseguit obtenir nombrosos cristalls amb diferents morfologies. Malauradament, no s'ha pescat cap cristall degut a que no eren prou bons per a la difracció (v. figura 6.14). A continuació es presenta un resum dels resultats més destacats obtinguts amb aquestes gotes:

- M95: petits cristalls en formació. Es van fondre i van aparèixer esferulites.
- M96: varetes no prou bones com per a ser pescades. Es van fondre.
- M98, M99, M101: agulles.



- M100: Separació de fases molt brillant.
- M102: varetes mal formades.

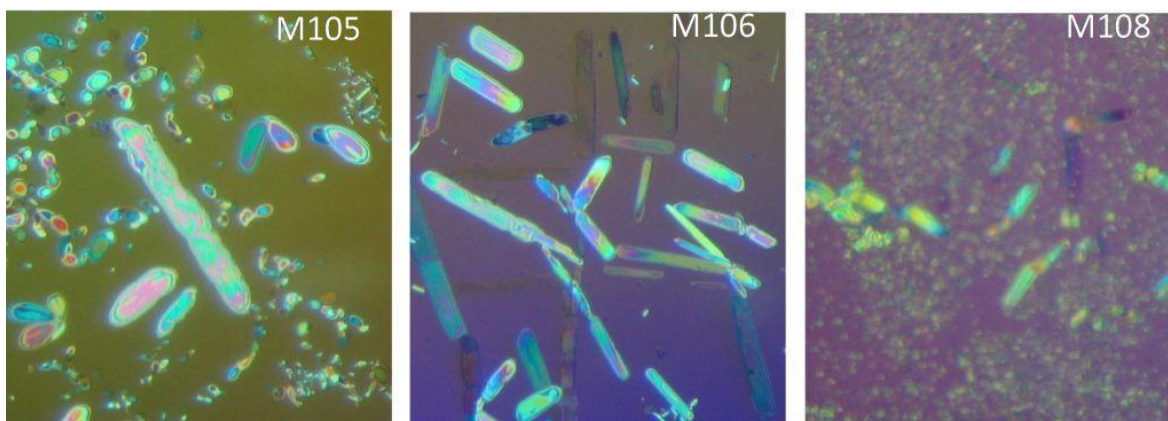


*Fig. 6.14: Fotografies de 3 de les gotes que van donar cristalls de la sèrie de gotes M95→M104. S'observen les imperfeccions: laterals no rectes, puntes arrodonides...*

### **Gotes M105 → M110**

Finalment, també s'han aconseguit cristalls a partir de la sèrie de gotes M105→M110. A la figura 6.15 se'n mostren algunes imatges. En molts casos, aquests cristalls han estat en forma de vareta, però també s'han obtingut algunes agulles. La majoria no eren prou bons com per a ser difractats. No obstant això, en el cas de la gota M107 sí que van aparèixer varetes de més qualitat. Així, de la gota M107 s'ha pescat una vareta, que s'ha portat a difractar a la Plataforma Cristal·logràfica del Parc Científic de Barcelona. Les condicions de la gota M107 es poden observar a la taula 6.10.





*Fig. 6.15: Fotografies d'algunes de les gotes que han donat cristalls de la sèrie M105→M110. S'observen les seves imperfeccions: puntes rodones, laterals no rectes, diferents colors a un mateix cristall (indica que no té un gruix uniforme)... També s'observa un cristall gran degradat (M105) i precipitat cristal·lí (brillant, M108).*

CÀPSULA M107			
INICI GOTA	13/01/12	OLIGONUCLEÒTID	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,2 mM
TEMPERATURA	4°C	PÈPTID	RKPRGRPCK 0,4 mM
PRECIPITANT AL POU (MPD)	INICIAL: 22% AL PESCAR: 52,1%	SALS / TAMPÓ / PRECIPITANT A LA GOTA	20 mM MgAc, 25 mM NaCac, pH=6 15% MPD (Natrix nº 16)

*Taula 6.10: Condicions de la gota M107.*

En el següent apartat s'expliquen els resultats obtinguts a partir de la difracció de la vareta de la gota M107.



## 6.6 Anàlisi dels resultats de difracció

De les 110 gotes realitzades durant el projecte, només s'ha aconseguit pescar un únic cristall, que s'ha portat a difractar a la Plataforma Cristal·logràfica del Parc Científic de Barcelona. La vareta congelada i difractada s'ha obtingut de la gota M107 (v. taula 6.10).

### Condicions de difracció

Tal com s'ha vist a l'apartat 5.6.2., hi ha tot un seguit de variables que es poden modificar per a portar a terme la difracció de raigs X. En aquest cas, els valors utilitzats són:

- Temps de la recollida: 90 min (recollida curta).
- Número d'imatges que es recullen: 15.
- L'angle d'oscil·lació o angle que gira el goniòmetre durant la captura de cada imatge:  $12^\circ$ .
- Angle total girat pel goniòmetre:  $180^\circ$ .
- La distància entre el cristall i el detector: 300 mm.
- La longitud d'ona del raig: constant i igual a  $1,5418 \text{ \AA}$ .

La figura següent mostra una imatge del cristall dins del *crio*loop realitzada durant la difracció.



Fig. 6.16: Fotografia del cristall pescat de la gota M107. Imatge captada mentre es centrava el cristall per a efectuar la difracció. Es senyala el cristall amb una fletxa.



La figura 6.17 mostra alguns dels diagrames de difracció obtinguts.

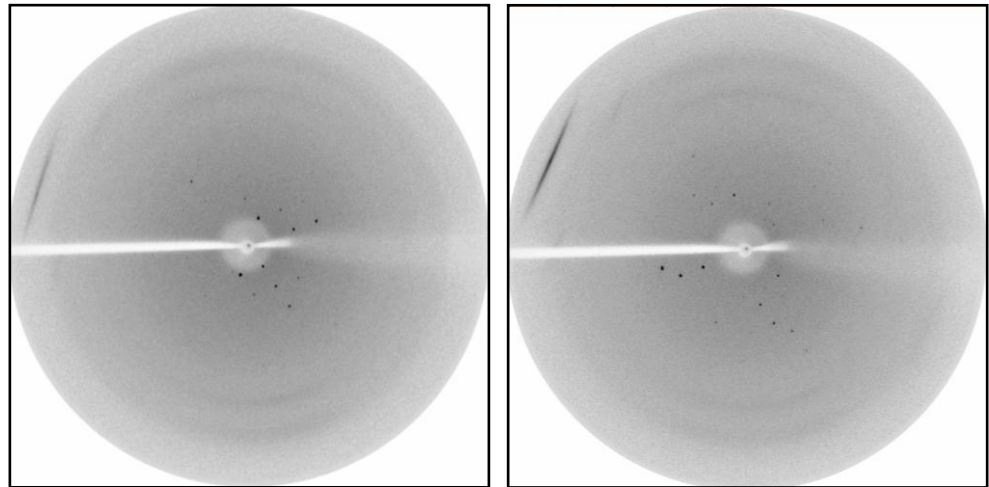


Fig. 6.17: Diagrames de difracció del cristall pescat de la gota M107.

Tal com s'observa, apareixen poques taques (reflexions) als diagrames. El número de reflexions és proporcional a l'ordre del cristall, per tant, es pot concloure que el cristall no estava massa ordenat. Les reflexions que s'acosten al centre del diagrama de difracció corresponen a les distàncies més grans dins de la cel·la cristal·lina, com ara la distància del radi de la molècula de DNA (20 Å). Per contra, les difraccions que estan a la perifèria indiquen les distàncies més curtes, com podria ser la distància entre les bases (3,3 - 3,4 Å). Així, com més lluny arribin les taques, més resolució tindrà un cristall. Per tant, el cristall pescat no té gaire resolució. És per això que només s'ha pogut determinar la cel·la unitària i el grup espacial.

***Determinació de la cel·la i del grup espacial: RKPRGRPCK-A<sub>2</sub>TA<sub>2</sub>T<sub>2</sub>AT<sub>2</sub>***

Les dades de difracció s'han indexat i processat amb el programa *Denzo* [27] i tot seguit s'ha fet l'escalat amb el programa *Scalepack* [27].

Després del primer indexat, el programa mostra els paràmetres de cel·les que correspondrien a aquestes dades per a cada xarxa de Bravais i un error percentual respecte a la cel·la de menor simetria (la xarxa triclinica, que sempre té un error igual a zero) (v. figura 6.18)



Lattice	Metric tensor distortion index	Best cell (symmetrized) Best cell (without symmetry restrains)						
primitive cubic	22.11%	70.25 51.61	42.57 51.61	41.99 51.61	116.93 90.00	70.69 90.00	109.19 90.00	
I centred cubic	19.74%	44.23 64.44	70.25 64.44	78.83 64.44	57.48 90.00	89.32 90.00	90.15 90.00	
F centred cubic	17.97%	78.83 81.62	83.11 81.62	82.92 81.62	64.39 90.00	117.50 90.00	116.62 90.00	
primitive rhombohedral	1.89%	70.25 69.44 42.28	69.15 69.44 42.28	68.91 69.44 194.58	37.37 36.01 90.00	35.11 36.01 90.00	35.55 36.01 120.00	
primitive hexagonal	8.57%	42.57 42.28	41.99 42.28	68.91 68.91	105.80 90.00	93.39 90.00	116.93 120.00	
primitive tetragonal	15.04%	41.99 42.28	42.57 42.28	70.25 70.25	109.19 90.00	109.31 90.00	63.07 90.00	
I centred tetragonal	12.34%	42.57 42.28	41.99 42.28	130.78 130.78	96.51 90.00	83.24 90.00	116.93 90.00	
primitive orthorhombic	15.03%	41.99 41.99	42.57 42.57	70.25 70.25	109.19 90.00	109.31 90.00	63.07 90.00	
C centred orthorhombic	8.52%	41.99 41.99	75.99 75.99	68.91 68.91	102.52 90.00	74.20 90.00	92.58 90.00	
I centred orthorhombic	12.34%	41.99 41.99	42.57 42.57	130.78 130.78	83.24 90.00	83.49 90.00	63.07 90.00	
F centred orthorhombic	3.25%	44.23 44.23	72.08 72.08	130.78 130.78	82.21 90.00	90.33 90.00	90.88 90.00	
primitive monoclinic	8.54%	41.99 41.99	68.91 68.91	42.57 42.57	93.39 90.00	116.93 116.93	105.80 90.00	
C centred monoclinic	0.37%	72.08 72.08	44.23 44.23	70.25 70.25	90.15 90.00	112.76 112.76	89.12 90.00	
primitive triclinic	0.00%	41.99	42.57	68.91	93.39	105.80	116.93	
autoindex unit cell		41.99	42.57	68.91	93.39	105.80	116.93	
crystal rotx, roty, rotz		-4.656	-9.131	152.835				
Autoindex Xbeam, Ybeam		173.44	172.89					
position	20 chi**2 x	4.80	y	1.10	pred. decrease:	0.000 *	20 = 0	
partiality	20 chi**2			0.58	pred. decrease:	0.000 *	20 = 0	

Fig. 6.18: Dades obtingudes amb el programa Denzo després d'un primer indexat.

En aquest cas, s'observa que la xarxa amb menys error és la monoclinica centrada en una cara (C2), tot i que la trigonal també dona un error relativament acceptable.

S'ha imposat al programa la simetria C2, i al diagrama de difracció apareixen tot un seguit de punts de diferents colors (v. figura 6.19). Aquests punts són les prediccions, i idealment haurien de coincidir amb les reflexions.



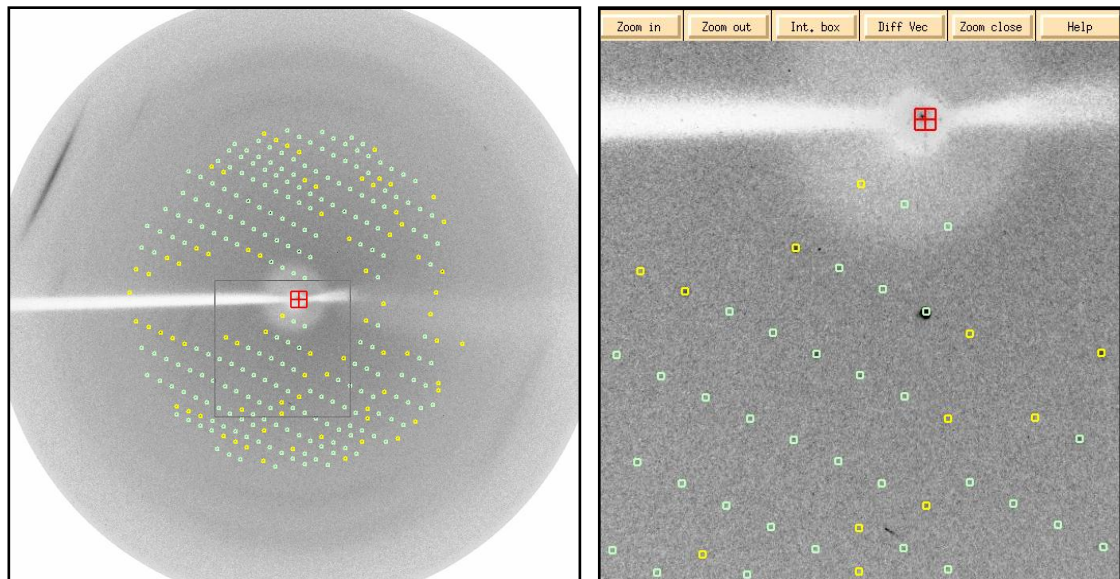


Fig. 6.19: Diagrama de difracció del cristall pescat de la gota M107, amb les prediccions per al grup espacial C2.

Hi ha diferents paràmetres que es poden modificar per millorar els resultats obtinguts. Es pot escollir manualment les reflexions que es desitja que el programa tingui en compte (per millorar la integració de les dades), i també variar la mida de les caixes d'integració, el radi de les taques, el *background* i la mosaicitat (tot això són paràmetres del programa *Denzo*).

A continuació es realitza l'escalat de totes les imatges. A la figura 6.20 s'observen els resultats obtinguts. Cal comentar que els paràmetres de la taula apareixen segons els diferents rangs de resolució. Les dades de les columnes que s'observen es corresponen amb paràmetres com la intensitat i altres paràmetres estadístics que només informen de com s'ajusta de bé (o no) el model a la realitat. El valor de  $\chi^2$  (Chi\*\*2) hauria de ser proper a 1, mentre que el valor del paràmetre  $R_{merge}$  hauria de ser inferior al 25%. Tot i que la mitjana de les dades no s'ajusta del tot als valors teòrics, ja que el cristall no tenia prou resolució i no estava massa ordenat. Tot i així, els resultats es consideren acceptables, ja que la majoria de les reflexions es troben amb una resolució entre 50 i 13,91 Å (primera fila), i els valors d'aquest estrat sí que són prou bons.



Summary of reflections intensities and R-factors by shells  
 $R_{\text{linear}} = \text{SUM} ( \text{ABS}(I - \langle I \rangle) ) / \text{SUM} (I)$   
 $R_{\text{square}} = \text{SUM} ( (I - \langle I \rangle) ** 2) / \text{SUM} (I ** 2)$   
 $\text{Chi}^{**2} = \text{SUM} ( (I - \langle I \rangle) ** 2) / (\text{Error} ** 2 * N / (N-1) )$   
 In all sums single measurements are excluded

Shell limit	Lower Angstrom	Upper Angstrom	Average I	Average error	Average stat.	Norm. Chi**2	Linear R-fac	Square R-fac
50.00	13.91		876.6	253.0	172.6	0.940	0.187	0.182
	13.91	11.08	608.1	201.7	155.2	0.529	0.269	0.316
	11.08	9.69	99.9	186.3	179.7	0.224	0.689	0.512
	9.69	8.81	617.1	234.1	192.6	0.213	0.282	0.206
	8.81	8.18	390.0	237.6	197.5	0.245	0.242	0.252
	8.18	7.70	40.7	273.0	238.2	0.147	0.942	0.861
	7.70	7.32	420.2	752.7	602.4	0.160	0.806	0.516
	7.32	7.00	517.5	667.7	248.9	0.201	0.000	0.000
	7.00	6.73	130.9	444.8	378.1	0.167	0.000	0.986
	6.73	6.50	83.8	365.6	304.5	0.141	0.000	0.000
All reflections			374.7	361.2	270.2	0.307	0.339	0.309

Fig. 6.20: Dades del processat del cristall pescat de la gota M107 pel grup espacial C2. Per a cada rang de distàncies (Å) s'observa la intensitat (I), el valor de  $\chi^2$  (Chi\*\*2), el de  $R_{\text{merge}}$  (Linear R-fac) i el de  $R_{\text{quadrat}}$ .

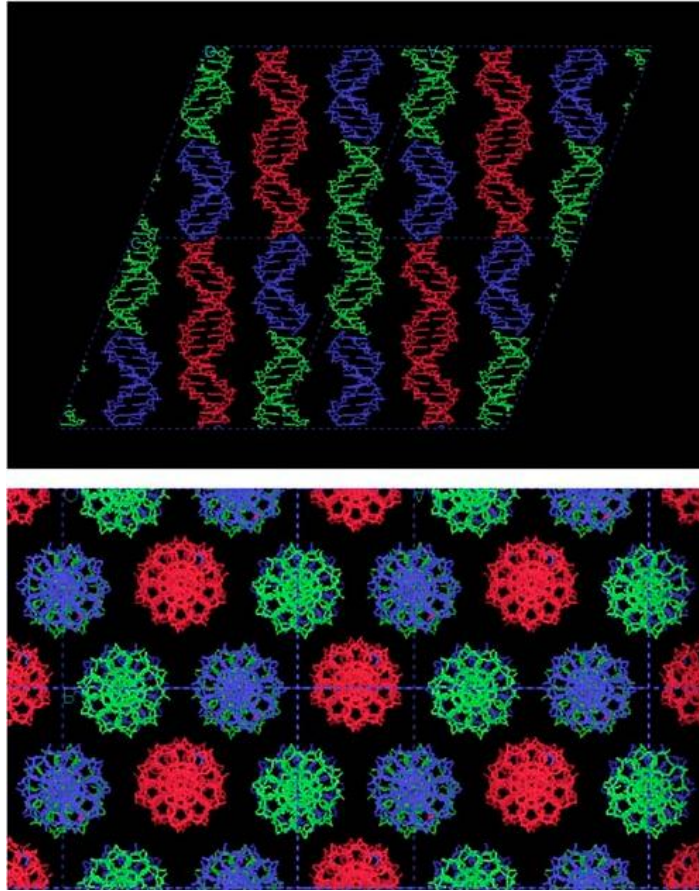
Cristall M107-1			
Paràmetres de cel·la	a= 77,49	b= 43,97	c= 70,23
	$\alpha= 90^\circ$	$\beta= 111,41$	$\gamma= 90^\circ$
Grup espacial	C2		
Núm. de reflexions obs.	2216		
Resolució	6,5 Å		
$R_{\text{merge}}$	0,339		
$\chi^2$	0,307		

Taula 6.11: Dades del processat del cristall M107-1 pel grup espacial C2.

Tal com s'ha comentat, el cristall no ha donat dades prou bones com per a continuar amb el processat. Tot i així, els resultats aconseguits són coherents als que es van obtenir per membres del laboratori anteriorment, ja que la cel·la obtinguda en ambdós casos és semblant. A la figura 6.21 es veu un model de l'empaquetament de l'oligonucleòtid  $A_2TA_2T_2AT_2$  en el grup espacial C2 [16].







*Fig. 6.21: Estructura de la seqüència  $A_2TA_2T_2AT_2$  en el grup espacial  $C2$ . La unitat asimètrica està formada per tres dúplex, que es mostren en diferents colors. La part superior de la imatge és una vista frontal de 4 cel·les. La part inferior de la imatge és una vista en projecció del pla  $ab$ .*

Una última cosa a comentar és que les molècules d'aquest cristall prenen una organització HASO (*Helical Arrangement of Stacked Oligonucleotides*). És un tipus d'organització en forma de columnes independents dins les cel·les hexagonals i amb aparellament Watson-Crick. Les bases terminals dels diferents dúplex interaccionen, definint una pseudohèlix continua (les bases defineixen un esglaó virtual on els fosfats són absents). Aquestes estructures HASO s'han trobat en seqüències riques en ATs.





## Conclusions

Un cop finalitzat aquest projecte se'n poden extreure diverses conclusions, tant de la part de l'obtenció del mutant HMGA1b(1-90) com de la realització dels estudis cristal·logràfics.

El primer que cal comentar és que la tècnica del DNA recombinant és un bon mètode per aconseguir que un cultiu del bacteri *Escherichia coli* sintetitzi aquesta proteïna, un cop se li ha introduït un vector que conté el gen que la codifica. També s'ha de remarcar que el procés utilitzat per a fer el tractament del sediment bacterià s'ha mostrat molt eficaç com a primer pas de la purificació de la mostra, ja que permet obtenir un extracte molt enriquit en la proteïna d'interès.

D'altra banda, la purificació cromatogràfica de la mostra proteica obtinguda ha estat realitzada amb èxit. La combinació de cromatografia de bescanvi catiònic i gel-filtració ha permès obtenir fraccions d'elevada puresa per a portar a terme els assajos cristal·logràfics.

Durant la cromatografia de bescanvi catiònic, l'HMGA1b(1-90) elueix aproximadament entre 350 mM i 400 mM NaCl. Respecte a la cromatografia de gel-filtració realitzada amb el sistema FPLC, els resultats obtinguts desaconsellen totalment l'ús de Tween/Tris com a tampó d'elució, essent el més recomanable utilitzar tampons de NaCl/Tris amb una concentració salina de 100 mM.

Als assajos cristal·logràfics amb proteïna HMGA1b(1-90) i els oligonucleòtids  $A_2TA_2T_2AT_2$  (decàmer) i  $G_3A_3T_3C_3$  (dodecàmer) s'han obtingut cristalls líquids i algunes esferulites. No s'han obtingut cristalls prou bons com per a ser pescats i difractats. Tot i així s'ha pogut observar que els millors resultats s'han aconseguit majoritàriament amb la sal  $MgCl_2$ .

D'altra banda, als assajos amb el pèptid sintètic RKPRGRPCK i l'oligonucleòtid  $A_2TA_2T_2AT_2$  sí que s'han aconseguit cristalls. S'han obtingut majoritàriament cristalls en forma de varetes petites o agulles, tot i que no eren d'una gran qualitat. S'ha triat una de les varetes de més qualitat per a la seva difracció. El cristall difractat en aquest projecte procedia de la gota M107, que contenia inicialment 10mM MgAc, 25 mM NaCac, pH=6 i 15 %MPD.

Els diagrames de difracció obtinguts del cristall mostren poques reflexions i una resolució força baixa. Tot i així, s'ha arribat a trobar la cel·la unitària i el grup espacial del complex, i s'ha vist que les dades obtingudes són coherents amb estudis anteriors realitzats al nostre grup. S'ha observat que l'oligonucleòtid cristal·litza en el grup espacial C2, i la cel·la trobada és:  $a=77,49$ ;  $b=43,97$ ;  $c=70,23$ ;  $\alpha=90^\circ$ ;  $\beta=111,41^\circ$ ;  $\gamma=90^\circ$ .





## Agraïments

En primer lloc voldria donar les gràcies a les meves directores del projecte. A la Dra. Núria Saperas, gràcies per haver-me introduït al grup MACROM, per haver-me ajudat tant (no només a nivell acadèmic, sinó també a nivell personal), per la paciència demostrada i per l'entusiasme transmès durant tot aquest temps. Voldria donar les gràcies a la Dra. Lourdes Campos per totes les estones passades al laboratori mirant gotes (i animant-les a que donin bons cristalls), pels consells, per la paciència, pels ànims, per les pipes de carbassa, etc.

També vull agrair-li al Dr. Juan A. Subirana les recomanacions, els consells i tot el que ens ha ensenyat.

Al Paco, per les bones estones que hem passat. A l'Elsa, perquè la seva espontaneïtat i les seves anècdotes han alegrat molt els dies, pels atacs de riure i per tots els coneixements que m'ha transmès. A la Matu, amb la qual he tingut el plaer de compartir moltes situacions de tots els colors i quasi totes han acabat amb un somriure. Som i serem un gran equip (cps!). I sobretot, a la Raquel. Totes les hores passades tant al laboratori com fora d'ell, les experiències viscudes, la seva paciència i diplomàcia, els debats transcendents i els moments més amens. Per tot, moltes gràcies.

M'agradaria també donar les gràcies a tot el Departament d'Enginyeria Química, pel bon tracte rebut i les bones estones a l'hora de dinar.

A la meva família: pares, germans, cunyades i molt especialment als meus nebots. En moments en què falten les forces, només cal mirar-los i tenir ganes de tirar endavant.

Al Josep, amb qui he passat moments molt bons i m'ha ajudat a superar altres no tan bons. Per respectar-me i estimar-me de forma única i irrepetible.

Als meus amics, que han tingut una santa paciència increïble. Alguns d'ells em coneixen molt bé i saben què han de dir i en quin moment. M'han escoltat explicar el meu projecte en repetides ocasions, així com les "batalletes" del laboratori i les meves penes i alegries amb les gotes. Vull agrair-li el seu suport molt especialment a la "MartaFossas", al David, al Javi i l'Olga, a la Lucía Blas i a la Lucía Poza. I, com no, a l'Amadeu, al Lànguiz, al Rubio, al Pablo, a l'Alba, a la Maria, a la Silvia, a l'Àlícia, a l'Esther, a la Mònica, a l'Àuria, a la Laura, a l'Ivan i a l'Arnau.

A tothom, moltes gràcies.





## Bibliografia

### Referències bibliogràfiques (per ordre d'aparició al text)

- [1] CATEZ, F., HOCK, R. *Binding and interplay of HMG proteins on chromatin: Lessons from live cell imaging. Biochimica et Biophysica Acta* 1799, 2010, p. 15-27.
- [2] REEVES, R. *Nuclear functions of the HMG proteins. Biochimica et Biophysica Acta* 1799, 2010, p. 3-14.
- [3] CATEZ, F., [et al.]. *Competition between histone H1 and HMGN proteins for chromatin binding sites. EMBO Rep.* 3, 2002, p. 760-766.
- [4] SGARRA, R., [et al.]. *HMGA molecular network: From transcriptional regulation to chromatin remodeling. Biochimica et Biophysica Acta* 1799, 2010, p. 37-47.
- [5] FUSCO, A., FEDELE, M. *Roles of HMGA proteins in cancer. Nature Reviews Cancer* 7, 2007, p. 899-910.
- [6] CLEYNEN, I., VAN DEN VEN, W.J.M. *The HMGA proteins: A myriad of functions (Review). International Journal of Oncology* 32, 2008, p. 289-305.
- [7] SGARRA, R., [et al.]. *Nuclear phosphoproteins HMGA and their relationship with chromatin structure and cancer. FEBS letters* 574, 2004, p.1-8.
- [8] GEIERSTRANGER, B.H., [et al.]. *Short peptide fragments derived from HMG-I/Y proteins bind specifically to the minor groove of DNA. Biochemistry* 33, 1994, p. 5347-5355.
- [9] HUTH, J.R. [et al.]. *The solution structure of an HMG-I(Y)-DNA complex defines a new architectural minor groove binding motif. Nat. Struct. Biol.* 4, 1997, p. 657-665.
- [10] BUSTIN, M. *Regulation of DNA-Dependent Activities by the Functional Motifs of the High-Mobility-Group Chromosomal Proteins. Molecular and Cellular Biology*, Vol.19 (8), 1999, p.5237-5246.
- [11] FONFRÍA-SUBIRÓS, E. [et al.]. *Crystal Structure of a Complex of DNA with One AT-Hook of HMGA1. PLOS One* Vol. 7 (5), 2012, e37120.



- [12] FEDELE, M., FUSCO, A. *HMGA and Cancer. Biochimica et Biophysica Acta* 1799, 2010, p. 48-54.
- [13] BUSTIN, M., REEVES, R. *High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. Prog. in Nucleic Acid Res. & Mol. Biol.* 54,1996, p. 35-100.
- [14] TALLINI, G., DAL CIN, P. *HMGI(Y) and HMGI-C dysregulation: a common occurrence in human tumors. Adv. Anat. Pathol.* 6, 1999, p. 237-246.
- [15] REEVES, R., BECKERBAUER, L. *HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. Biochimica et Biophysica Acta* 1519, 2001, p.13-29.
- [16] CAMPOS, L., [et al.]. *Overview of the Structure of All-AT Oligonucleotides: Organization in Helices and Packing Interactions. Biophysical Journal*, Vol. 91, 2006, p.892-903.
- [17] EICHINGER, L. [et al.]. *The genome of the social amoeba Dictyostelium discoideum. Nature* 435, 2005, p. 43-57.
- [18] LESLIE, A.G.W., [et al.]. *Polymorphism of DNA Double Helices. Journal of Molecular Biology* 143, 1980, p. 49-72.
- [19] ZUO, E.T., [et al.]. *Effect of base-pair sequence on the conformations and thermally induced transitions in oligodeoxyribonucleotides containing only AT base pairs. Biochemistry* 29, 1990, p. 446-4456.
- [20] ABRESCIA, N.G., [et al.]. *X-ray and NMR studies of the DNA oligomer d(ATATAT): Hoogsteen base pairing in duplex DNA. Biochemistry* 43, 2004, p. 4092-4100.
- [21] CANTOR, C.R., [et al.]. *Oligonucleotide interactions. III. Circular dichroism studies of the conformation of deoxyoligonucleotides. Biopolymers* 9, 1970, p. 1059-1077.
- [22] REEVES, R., NISSEN, M.S. *Purification and assays for high mobility group HMG-I(Y) protein function. Methods in Enzymol.* Vol. 304, 1999, p.155-188.
- [23] LAEMMLI, U.K. *Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature* 277, 1970, p.680-688.
- [24] PANYIM, S., CHALKLEY, R. *High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. Arch. Biochem. Biophys.* 230, 1969, p.337-346.





- [25] JANCARIK, J., KIM, S.H. *Sparse matrix sampling: a creening method for crystallization of proteins*. *Journal of Applied Crystallography*, 24, 1991, p. 409-411.
- [26] INTERNATIONAL UNION OF CRYSTALLOGRAPHY. *International Tables for X-Ray Crystallography*. Vol. 1, 3<sup>rd</sup> Edition, Kynoch Press, Birmingham England, 1969.
- [27] OTWINOSKI, Z, MINOR, W. *Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode*, *Methods in Enzymology*, Vol. 276: *Macromolecular Crystallography 60, part A*, 1997, p.307-326.
- [28] ABRESCIA, N.G., [et. al.]. *Stacking Interaction of Guanine with Netropsin in the Minor Groove of d(CGTATATACG)<sub>2</sub>*. *Journal of Molecular Biology*, 294, 1999, p. 657-666.
- [29] UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA. *Consideraciones ambientales para los PFC*. [[http://www.etseib.upc.edu/docs/-\\_Informaci\\_Acadmica/-\\_Portal\\_de\\_documento/Projectes\\_i\\_Treballs/Guies/Consideracions\\_ambientals.pdf](http://www.etseib.upc.edu/docs/-_Informaci_Acadmica/-_Portal_de_documento/Projectes_i_Treballs/Guies/Consideracions_ambientals.pdf), Juliol 2012].



## Bibliografia complementària

### *Libres consultats i altres articles (per autor)*

- ALBERTS, B., BRAY, D., HOPKIN, K., JOHNSON, H., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. *Introducción a la biología celular. Ed. Médica Panamericana, Madrid, 2006.*
- BARRACO I SERRA, M., [et al.]. *Guia de continguts ambientals dels projectes de fi de carrera: pla de medi ambient de la UPC: Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona (ETSEIB). Servei d'Informació, Imatge i Publicacions de la UPC, Barcelona, 2000, p. 4-10.*
- BARROSO, S., IBÁÑEZ, J., *Introducción al conocimiento de materiales. Universidad Nacional de Educación a Distancia, Madrid, 2002, p. 46-54.*
- FREIFELDER, D. *Técnicas de bioquímica y biología molecular. Ed. Reverté, Barcelona, 1981.*
- GÓMEZ-MORENO, C., SANCHO, J. *Estructura de proteínas. Ed. Ariel, Barcelona, 2003.*
- MANABE, T., [et al.]. *HMGA1a recognition candidate DNA sequences in Humans. PLOS One, Vol. 4 (11), 2009, e08004.*
- McPHERSON, A., *Crystallization of biological macromolecules. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1999.*
- PERETÓ, J., SENDRA, R., PAMBLANCO, M., BAÑÓ, C. *Fonaments de bioquímica. València, 1996.*
- PFLUGRATH, J.W. *Macromolecular crystallography-methods for cooling and mounting protein crystals at cryogenic temperatures. Methods, 34, 2004, p. 415-423.*
- REEVES, R. *Molecular biology of HMGA proteins: hub of nuclear function. Gene, 277, 2001, p. 63-81.*
- SANDS, D.E., *Introducción a la cristalografía. Reverté, Barcelona, 1971.*
- SINDEN, R.R. *DNA Structure and Function. Academic Press, London, 1994.*



- VALCÀRCEL CASES, M., GÓMEZ HENS, A. *Técnicas analíticas de separación. Ed. Reverté, Barcelona, 1988.*
- ZHANG, Q., WANG, Y. *HMG modifications and nuclear function. Biochimica et Biophysica Acta, 1799, 2010, p. 28-36.*

### **Projectes i tesis consultats (per autor)**

- ALECHAGA, E. *Determinación de la estructura de secuencias de ADN del tipo A(AT)nT. Barcelona, ETSEIB, 2007.*
- PORREDON, J. *Cristal·lografia de raigs X de les seqüències de DNA del tipus CCGCGG i de la seqüència CGCTCTAGAGCG. Barcelona, ETSEIB, 2007.*
- SÁNCHEZ, R.(Treball Final de Màster). *Estudis estructurals dels complexos de les proteïnes HMGA1 i de pèptids sintètics amb oligonucleòtids rics en ATs. Barcelona, ETSEIB, 2010.*
- VALLS, N.(Tesi Doctoral). *Estudi estructural d'oligonucleòtids en presència de fàrmacs intercalants i metalls de transició, Barcelona, ETSEIB, 2004.*

### **Pàgines web**

- BIO-RAD LABORATORIES [<http://www.bio-rad.com/>, juny-juliol 2012].
- CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC). *Cristalografía de Rayos X* [<http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/>, maig-juliol 2012].
- HAMPTON RESEARCH [<http://hamptonresearch.com/>, maig-juliol 2012].
- MILLIPORE BIOMANUFACTURING AND LIFE SCIENCE RESEARCH [<http://www.millipore.com/>, abril-juny 2012].
- PANREAC QUIMICA S.A.U [<http://www.panreac.es/>, juny 2012].



- SIGMA-ALDRICH [<http://www.sigmaaldrich.com/spain.html>, juny-juliol 2012].
- UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA. *El Pla UPC Sostenible* [<http://www.upc.edu/sostenible2015/ambits/la-gestio-interna/residus/gestio-de-residus-de-laboratori>, juliol 2012]



## ANNEX A: MATERIALS I MÈTODES

### A.1 Obtenció de cèl·lules competents

Tal com s'ha comentat, s'ha d'introduir el plasmidi dins d'una cèl·lula hoste competent. Amb el protocol que es detalla a continuació es pot aconseguir fer competents les cèl·lules Rosetta(DE3)pLysS.

*Observació: aquest mètode, tot i ser el més comú, no és l'únic que es pot seguir per a aconseguir fer cèl·lules competents.*

Atenció: cal treballar en condicions d'asèpsia (a prop de la flama i amb material i solucions estèrils).

#### **Dia 1:**

1. Es prepara una placa de medi LB + antibiòtic al qual sigui resistent la soca. En aquest cas, s'utilitza el cloramfenicol, amb una concentració de 25 µg/ml.

*Observació: el plasmidi pLysS porta un gen de resistència al cloramfenicol.*

2. S'agafa el cooler i es treu una alíquota de cèl·lules del congelador de -80°C. Amb una nansa de Kolle (platí) se'n rasca una mica i es fa una sembra en escocès a la placa de LB + antibiòtic.
3. Es posa la placa a l'estufa a 37°C i es deixa O.N.

#### **Dia 2:**

1. Picar una sola colònia de la placa O.N. en un tub que contingui 4 ml de LB + antibiòtic cloramfenicol (25 µg/ml).
2. Deixar créixer els bacteris O.N. a 37 °C amb agitació 250 rpm.

#### **Dia 3:**

1. Inocular 0,8 ml del cultiu O.N. en 50 ml del mateix medi (en un erlenmeyer de 250 ml) i deixar créixer fins a obtenir una D.O = 0,7 a 600 nm.



*Observació: a mida que els bacteris creixent es va enterbolint el cultiu. De tant en tant es pipeteja un petit volum en condicions d'asèpsia per a mesurar l'absorbància a 600 nm, fins que aquest valor sigui 0,7.*

2. Congelar 1 tub de bacteris: 900 µl + 300 µl de **Glicerol al 60%**.
3. Centrifugar el cultiu a 4.000 g (rotor GSA a 5.000 rpm, Sorvall) durant 5 min a 4 °C.
4. Descartar el sobrenadant.
5. Resuspendre el pellet en 10 ml de **100 mM MgCl<sub>2</sub>** (4 °C).
6. Pasar-ho a un tub de 50 ml amb tap.
7. Deixar en gel durant 30 min.
8. Centrifugar a 4.000 g durant 5 min a 4°C (rotor SS34 entre 5.500 i 6.000 rpm, Sorvall).
9. Descartar el sobrenadant.
10. Resuspendre el pellet en 2 ml de **100 mM de CaCl<sub>2</sub>** (4°C).
11. Deixar en gel entre 30 i 90 min.
12. Centrifugar a 4.000g durant 5 min a 4°C (rotor SS34 entre 5.500 i 6.000 rpm, Sorvall).
13. Descartar el sobrenadant.
14. Resuspendre el pellet en 4 ml de 85 mM de CaCl<sub>2</sub> -15% Glicerol.

Es prepara al moment: 3 ml de 100 mM CaCl<sub>2</sub> + 1 ml Glicerol al 60%

*Observació: el glicerol és un anticongelant. Evita que es formin cristalls de gel quan es congelin les mostres a -80°C.*

15. Fer alíquotes de 300 µl i 200 µl. Congelar ràpidament a -80°C.

*Observació: els medis de cultiu LB utilitzats en aquest protocol són els que es recullen a l'annex A.3.*



## A.2 Inducció amb IPTG

L'enzim T7 RNA polimerasa és l'encarregat d'iniciar la síntesi de la proteïna d'interès, però generalment es troba inhibït per una molècula repressora, el lac repressor. D'altra banda, el lac repressor també inhibeix la formació de l'enzim T7 RNA polimerasa.

Quan s'afegeix l'isopropil- $\beta$ -tiogalactopiranosid (IPTG), que és un anàleg sintètic de la lactosa, aquest s'uneix al lac repressor i permet, d'una banda la síntesi de l'enzim T7 RNA polimerasa i de l'altra, que s'iniciï la síntesi de la proteïna HMGA1b(1-90) (v. figura A.1).

Amb aquest mecanisme es pretén que se sintetitzi la proteïna de forma més controlada, ja que hi ha algunes proteïnes que podrien ser tòxiques (en concentracions excessives) per a la pròpia cèl·lula hoste.

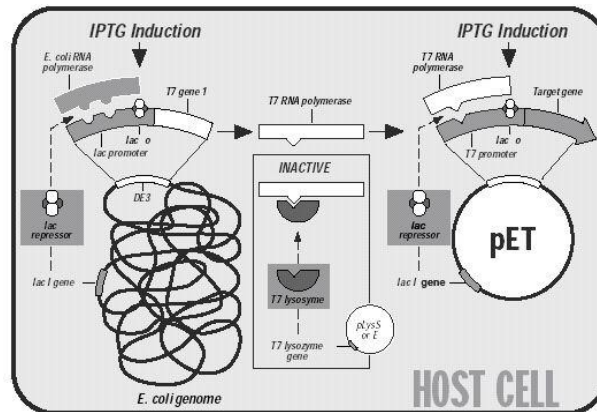


Fig. A.1: Mecanisme d'acció de l'inductor IPTG

## A.3 Medis de cultiu

En aquest projecte s'han utilitzat dos medis de cultiu: LB i LB amb agar. La seva composició és la següent:

Medi LB (1 litre de cultiu)	Medi LB+agar (500 ml de cultiu) (40 plaques)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 g Triptona</li> <li>• 5 g Extracte de llevat</li> <li>• 10 g NaCl</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 g Triptona</li> <li>• 25 g Extracte de llevat</li> <li>• 5 g NaCl</li> <li>• 7,5 g Agar</li> </ul>

Taula A.1: Composició dels medis de cultius utilitzats.



## A.4 Tampons Natrìx HR2-116 i tampons adaptats

A continuació es mostra la composició dels tampons Natrìx HR2-116 de la marca comercial Hampton Research utilitzats per a la realització de les gotes, així com la dels 18 tampons adaptats.

### Tampons Natrìx HR2-116

TAMPONS NATRÌX HR2-116	
Nº Tampó	Composició
1	10 mM Mg Chloride, 50 mM MES, pH= 5.6, 2 M Lithium Sulfate
2	10 mM Mg Acetate, 50 mM MES, pH= 5.6, 2,5 M Ammonium Sulfate
3	100 mM Mg Acetate, 50 mM MES, pH= 5.6, 20% MPD
4	200 mM K Chloride, 10 mM Mg Sulfate, 50 mM MES, pH= 5.6, 10% PEG 400
5	200 mM K Chloride, 10 mM Mg Chloride, 50 mM MES, pH= 5.6, 5% PEG 8000
6	100 mM Ammonium Sulfate, 10 mM Mg Chloride, 50 mM MES, pH= 5.6, 20% PEG 8000
7	20 mM Mg Chloride, 50 mM MES, pH= 6, 15% iso-Propanol
8	5 mM Mg Sulfate, 100 mM Ammonium Acetate, 50 mM MES, pH= 6, 600 mM NaCl
9	100 mM K Chloride, 10 mM Mg Chloride, 50 mM MES, pH= 6, 10% PEG 400
10	5 mM Mg Sulfate, 50 mM MES, pH= 6, 5% PEG 4000
11	10 mM Mg Chloride, 50 mM Na Cacodylate, pH= 6, 1 M Lithium Sulfate
12	10 mM Mg Sulfate, 50 mM Na Cacodylate, pH= 6, 1.8 M Lithium Sulfate
13	15 mM Mg Acetate, 50 mM Na Cacodylate, pH= 6, 1.7 M Ammonium Sulfate
14	100 mM K Chloride, 25 mM Mg Chloride, 50 mM Na Cacodylate, pH= 6, 15% iso-Propanol
15	40 mM Mg Chloride, 50 mM Na Cacodylate, pH= 6, 5% MPD
16	40 mM Mg Acetate, 50 mM Na Cacodylate, pH= 6, 30% MPD
17	200 mM K Chloride, 10 mM Ca Chloride, 50 mM Na Cacodylate, pH= 6, 10% PEG 4000
18	10 mM Mg Acetate, 50 mM Na Cacodylate, pH= 6.5, 1.3 M Lithium Sulfate
19	10 mM Mg Sulfate, 50 mM Na Cacodylate, pH= 6.5, 2 M Ammonium Sulfate
20	100 mM Ammonium Acetate, 15 mM Mg Acetate, 50 mM Na Cacodylate, pH= 6.5, 10% iso-Propanol
21	200 mM K Chloride, 5 mM Mg Chloride, 50 mM Na Cacodylate, pH= 6.5, 10% 1.6 Hexanediol
22	80 mM Mg Acetate, 50 mM Na Cacodylate, pH= 6.5, 15% PEG 400
23	200 mM K Chloride, 10 mM Mg Chloride, 50 mM Na Cacodylate, pH= 6.5, 10% PEG 4000
24	200 mM Ammonium Acetate, 10 mM Ca Chloride, 50 mM Na Cacodylate, pH= 6.5, 10% PEG 4000
25	80 mM Mg Acetate, 50 mM Na Cacodylate, pH= 6.5, 30% PEG 4000
26	200 mM K Chloride, 100 mM Mg Acetate, 50 mM Na Cacodylate, pH= 6.5, 10% PEG 8000
27	200 mM Ammonium Acetate, 10 mM Mg Acetate, 50 mM Na Cacodylate, pH= 6.5, 30% PEG 8000
28	50 mM Mg Sulfate, 50 mM HEPES-Na, pH= 7, 1.6 M Lithium Sulfate
29	10 mM Mg Chloride, 50 mM HEPES-Na, pH= 7, 4 M Lithium Chloride
30	10 mM Mg Chloride, 50 mM HEPES-Na, pH= 7, 1.6 Ammonium Sulfate
31	5 mM Mg Chloride, 50 mM HEPES-Na, pH= 7, 25% PEG Monomethyl Ether 550
32	200 mM K Chloride, 10 mM Mg Chloride, 50 mM HEPES-Na, pH= 7, 20% 1.6 Hexanediol
33	200 mM Ammonium Chloride, 10 mM Mg Chloride, 50 mM HEPES-Na, pH= 7, 30% 1.6 Hexanediol
34	100 mM K Chloride, 5 mM Mg Sulfate, 50 mM HEPES-Na, pH= 7, 15% MPD
35	100 mM K Chloride, 10 mM Mg Chloride, 50 mM HEPES-Na, pH= 7, 5% PEG 400
36	100 mM K Chloride, 10 mM Ca Chloride, 50 mM HEPES-Na, pH= 7, 10% PEG 400
37	200 mM K Chloride, 25 mM Mg Sulfate, 50 mM HEPES-Na, pH= 7, 20% PEG 200
38	200 mM Ammonium Acetate, 150 mM Mg Acetate, 50 mM HEPES-Na, pH= 7, 5% PEG 4000
39	100 mM Ammonium Acetate, 20 mM Mg Chloride, 50 mM HEPES-Na, pH= 7, 5% PEG 8000
40	10 mM Mg Chloride, 50 mM Tris-HCl, pH=7.5, 1.6 M Ammonium Sulfate
41	100 mM K Chloride, 15 mM Mg Chloride, 50 mM Tris-HCl, pH=7.5, 10% PEG Monomethyl Ether 550
42	10 mM Mg Chloride, 50 mM Tris-HCl, pH=7.5, 5% iso-Propanol
43	10 mM Mg Chloride, 50 mM Ammonium Acetate, 50 mM Tris-HCl, pH=7.5, 10% MPD
44	200 mM K Chloride, 50 mM Mg Chloride, 50 mM Tris-HCl, pH=7.5, 10% PEG 4000
45	25 mM Mg Sulfate, 50 mM Tris-HCl, pH=8.5, 1.8 M Ammonium Sulfate
46	5 mM Mg Sulfate, 50 mM Tris-HCl, pH=8.5, 35% 1.6 M Hexanediol
47	100 mM K Chloride, 10 mM Mg Chloride, 50 mM Tris-HCl, pH=8.5, 30% PEG 400
48	10 mM Ca Chloride, 200 mM Ammonium Chloride, 50 mM Tris-HCl, pH=8.5, 30% PEG 4000

Taula A.2: Composició dels tampons Natrìx HR-116





**Tampons adaptats**

<b>TAMPONS ADAPTATS</b>	
<b>Nom Tampó</b>	<b>Composició</b>
<b>7R</b>	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM NaCac, pH=6
<b>8R</b>	10 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM NaCac, pH=6
<b>9R</b>	20 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM NaCac, pH=6
<b>10R</b>	40 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM NaCac, pH=6
<b>11R</b>	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM NaCac, pH=6,5
<b>12R</b>	10 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM NaCac, pH=6,5
<b>13R</b>	20 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM NaCac, pH=6,5
<b>14R</b>	40 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM NaCac, pH=6,5
<b>15R</b>	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM HEPES, pH=7
<b>16R</b>	10 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM HEPES, pH=7
<b>17R</b>	20 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM HEPES, pH=7
<b>18R</b>	40 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM HEPES, pH=7
<b>19R</b>	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM Tris-HCl, pH=7,5
<b>20R</b>	10 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM Tris-HCl, pH=7,5
<b>21R</b>	20 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM Tris-HCl, pH=7,5
<b>22R</b>	40 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM Tris-HCl, pH=7,5
<b>M1</b>	14 mM CaCl <sub>2</sub> , 50 mM NaCac, pH=6,5
<b>M2</b>	100 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH=7

*Taula A.3: Composició dels tampons adaptats*

## A.5 La unitat cristal·lina

En aquest annex es presenten els sistemes cristal·lins, les xarxes de Bravais i els grups espacials.

En funció dels paràmetres de cel·la, es poden obtenir els 7 sistemes cristal·lins, mentre que les 14 xarxes de Bravais possibles s'obtenen segons la localització dels punts reticulars (v. figura A.2). Finalment, els 65 grups espacials componen el conjunt d'operacions de simetria que s'han d'aplicar a la unitat asimètrica per generar la cel·la unitària (v. figura A.3).

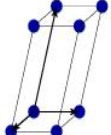
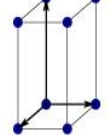
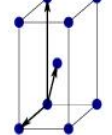
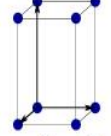
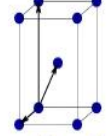
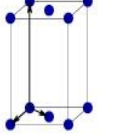
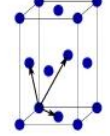
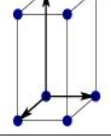
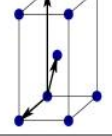
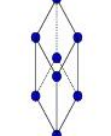
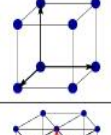
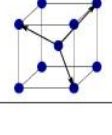
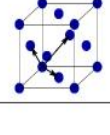
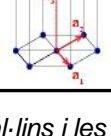
Bravais lattice	Parameters	Simple (P)	Volume centered (I)	Base centered (C)	Face centered (F)
Triclinic	$a_1 \neq a_2 \neq a_3$ $\alpha_{12} \neq \alpha_{23} \neq \alpha_{31}$				
Monoclinic	$a_1 \neq a_2 \neq a_3$ $\alpha_{23} = \alpha_{31} = 90^\circ$ $\alpha_{12} \neq 90^\circ$				
Orthorhombic	$a_1 \neq a_2 \neq a_3$ $\alpha_{12} = \alpha_{23} = \alpha_{31} = 90^\circ$				
Tetragonal	$a_1 = a_2 \neq a_3$ $\alpha_{12} = \alpha_{23} = \alpha_{31} = 90^\circ$				
Trigonal	$a_1 = a_2 = a_3$ $\alpha_{12} = \alpha_{23} = \alpha_{31} < 120^\circ$				
Cubic	$a_1 = a_2 = a_3$ $\alpha_{12} = \alpha_{23} = \alpha_{31} = 90^\circ$				
Hexagonal	$a_1 = a_2 \neq a_3$ $\alpha_{12} = 120^\circ$ $\alpha_{23} = \alpha_{31} = 90^\circ$				

Fig. A.2: Classificació dels sistemes cristal·lins i les xarxes de Bravais. Figura extreta de: <http://uabcivil.blogia.com/2009/082601-comentario-n-1-y-practica-n-2-semester-2-2009.php>



La notació que apareix a la figura fa referència a la posició dels punts reticulars:

- P: Cel·la primitiva. Conté un punt reticular: a cada vèrtex hi ha un octau de punt reticular.
- C: Centrada en una cara. Té 2 punts reticulars: un octau a cada vèrtex, una meitat a una cara i una altra meitat a la cara oposada.
- I: Centrada al cos. Té 2 punts reticulars: un octau a cada vèrtex i un al centre de la cel·la.
- F: Centrada a les cares. Té 4 punts reticulars: un repartit entre els 8 vèrtexs i els altres 3 es reparteixen entre les 6 cares.

Grups Espacials	
Triclinic	P1
Monoclínic	P2,P2 <sub>1</sub> , C2
Orthorhombic	P222, P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> , P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 P222 <sub>1</sub> , C222, C222 <sub>1</sub> , F222 I222, I2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Tetragonal	P4, P4 <sub>1</sub> , P4 <sub>2</sub> , P4 <sub>3</sub> , I4, I4 <sub>1</sub> P422, P4 <sub>2</sub> 2, P4 <sub>1</sub> 22 P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2, P4 <sub>2</sub> 22, P4 <sub>2</sub> 2 <sub>1</sub> 2 P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2, P4 <sub>3</sub> 22, I4 <sub>1</sub> 22, I422
Trigonal and rhombohedral	P3, P3 <sub>1</sub> , P3 <sub>2</sub> , R3 P312, P321, P3 <sub>1</sub> 21, P3 <sub>1</sub> 12 P3 <sub>2</sub> 21, P3 <sub>2</sub> 12, R32
Hexagonal	P6, P6 <sub>s</sub> , P6 <sub>1</sub> , P6 <sub>2</sub> , P6 <sub>3</sub> P6 <sub>2</sub> , P622, P6 <sub>1</sub> 22, P6 <sub>2</sub> 22 P6 <sub>3</sub> 22, P6 <sub>4</sub> 22, P6 <sub>5</sub> 22
Cubic	P23, F23, I23, P2 <sub>1</sub> 3, I2 <sub>1</sub> 3 P432, P4 <sub>1</sub> 32, P4 <sub>2</sub> 32, P4 <sub>3</sub> 32 F432, F4 <sub>1</sub> 32, I432, I4 <sub>1</sub> 32

Fig. A.3: Classificació dels grups espacials [27].





## ANNEX B: RESULTATS

### B.1 Assajos cristal·logràfics

- Sèrie 1: HMGA1b(1-90) + A<sub>2</sub>TA<sub>2</sub>T<sub>2</sub>AT<sub>2</sub> (relació 1:3)

Càpsula	Proteïna	Oligonucleòtid	Relació P:O	Sals, Tampó, pH a la gota	Nº Natrix/ Nom tampó	Precipitant pou	Observacions	
M1	HMGA1b(1-90) 1 mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,3 mM	(1:3)	10 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM MES, pH=6	nº 7	MPD / 5% isoprop.	Amb MPD+IP precipita ràpidament. Es canvia el precipitant per MPD, però es forma SF amb tendència a precipitar també	
M2	HMGA1b(1-90) 1 mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,3 mM	(1:3)	2,5 mM MgSO <sub>4</sub> , 25 mM MES, pH=6	nº 10	PEG 4000	Amb PEG 4000 precipita. Es canvia el precipitant per MPD. Dóna SF que no evoluciona	
M3	HMGA1b(1-90) 1 mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,3 mM	(1:3)	20 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6	nº 15	MPD	SF i excessius nuclis de cristal·lització que no evolucionen satisfactòriament	
M4	HMGA1b(1-90) 1 mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,3 mM	(1:3)	20 mM MgAc, 25 mM NaCac, pH=6	nº 16	MPD	SF i alguns nuclis de cristal·lització. Alguns no evolucionen, altres precipiten.	
M5	HMGA1b(1-90) 1 mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,3 mM	(1:3)	2,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6	Variants nº 15	7R	MPD	SF que va acabar precipitant. Van aparèixer alguns nuclis de cristal·lització que no van evolucionar.
M6	HMGA1b(1-90) 1 mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,3 mM	(1:3)	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6		8R	MPD	SF, precipitat i alguns nuclis de cristal·lització
M7	HMGA1b(1-90) 1 mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,3 mM	(1:3)	10 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6		9R	MPD	SF (la major part precipita) i alguns nuclis de cristal·lització
M8	HMGA1b(1-90) 1 mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,3 mM	(1:3)	20 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6		10R	MPD	SF precipitada i excès de nuclis de cristal·lització
M9	HMGA1b(1-90) 1 mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,3 mM	(1:3)	40 mM MgAc, 25 mM NaCac, pH=6,5	nº 22	PEG 400	SF i excessius nuclis de cristal·lització. Acaba precipitant	
M10	HMGA1b(1-90) 1 mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,3 mM	(1:3)	40 mM MgAc, 25 mM NaCac, pH=6,5	nº 25	PEG 4000	Precipita ràpidament. Es canvia el precipitant per PEG 400. Toma a precipitar	
M11	HMGA1b(1-90) 1 mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,3 mM	(1:3)	2,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6,5	Variants nº 15	11R	MPD	SF que precipita. Apareix algun nucli de cristal·lització, però també precipita
M12	HMGA1b(1-90) 1 mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,3 mM	(1:3)	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6,5		12R	MPD	SF que precipita. Apareix algun nucli de cristal·lització, sense evolució
M13	HMGA1b(1-90) 1 mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,3 mM	(1:3)	10 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6,5		13R	MPD	SF i alguns cristalls líquids molt petits amb forma de rombe
M14	HMGA1b(1-90) 1 mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,3 mM	(1:3)	20 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6,5		14R	MPD	SF, precipitat i alguns nuclis de cristal·lització amb forma de mini-vareta
M15	HMGA1b(1-90) 1 mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,3 mM	(1:3)	2,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM HEPES-Na, pH=7	nº 31	PEG 400	SF i precipitat	

Taula B.1: Condicions de les gotes de la sèrie 1 (I). SF, separació de fases; IP, iso-Propanol.



Càpsula	Proteïna	Oligonucleòtid	Relació P:O	Sals, Tampó, pH a la gota	Nº Natrix/ Nom	Precipitant pou	Observacions	
M16	HMGA1b(1-90) 1 mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,3 mM	(1:3)	50 mM KCl, 2,5 mM MgSO <sub>4</sub> , 25 mM HEPES-Na, pH=7	nº 34	MPD	SF i precipitat. Van aparèixer agulles però es van fondre ràpidament	
M17	HMGA1b(1-90) 1 mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,3 mM	(1:3)	50 mM KCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM HEPES-Na, pH=7	nº 35	PEG 400	Van aparèixer unes varetes minúscules que es van fondre ràpidament. Acaba precipitant	
M18	HMGA1b(1-90) 1 mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,3 mM	(1:3)	50 mM KCl, 5 mM CaCl <sub>2</sub> , 25 mM HEPES-Na, pH=7	nº 36	PEG 400	SF que precipita. Es fon el precipitat i queda només la SF invariable	
M19	HMGA1b(1-90) 1 mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,3 mM	(1:3)	2,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM HEPES-Na, pH=7	Variants nº 15	15R	MPD	SF, la major part de la gota acaba precipitant
M20	HMGA1b(1-90) 1 mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,3 mM	(1:3)	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM HEPES-Na, pH=7		16R	MPD	SF i cristalls líquids. Sense evolució satisfactòria
M21	HMGA1b(1-90) 1 mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,3 mM	(1:3)	10 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM HEPES-Na, pH=7		17R	MPD	SF, precipitat i petits cristalls líquids
M22	HMGA1b(1-90) 1 mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,3 mM	(1:3)	20 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM HEPES-Na, pH=7		18R	MPD	Cristalls líquids petits amb forma de rombe
M23	HMGA1b(1-90) 1 mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,3 mM	(1:3)	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM Tris- HCl, pH=7,5	nº 42	MPD / 5% isoprop.	SF que acaba precipitant. Apareixen algunes agulles que desapareixen molt ràpid	
M24	HMGA1b(1-90) 1 mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,3 mM	(1:3)	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM (NH <sub>4</sub> )Ac, 25 mM Tris-HCl, pH= 7,5	nº 43	MPD	SF que acaba precipitant. Apareixen algunes agulles i varetes minúscules que es fonen molt ràpid	
M25	HMGA1b(1-90) 1 mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,3 mM	(1:3)	2,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM Tris- HCl, pH= 7,5	Variants nº 15	19R	MPD	SF que acaba precipitant
M26	HMGA1b(1-90) 1 mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,3 mM	(1:3)	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM Tris- HCl, pH= 7,5		20R	MPD	SF. Aquesta gota es va fer malbé en un accident.
M27	HMGA1b(1-90) 1 mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,3 mM	(1:3)	10 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM Tris- HCl, pH= 7,5		21R	MPD	Gota accidentada. Apareixen diferents gotes petites, algunes amb SF que acaba precipitant
M28	HMGA1b(1-90) 1 mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,3 mM	(1:3)	20 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM Tris- HCl, pH= 7,5		22R	MPD	Nuclis de cristal·lització que es van fondre en un accident. Després van aparèixer petites varetes de cristall líquid, però no van evolucionar satisfactòriament
M29	HMGA1b(1-90) 1 mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,3 mM	(1:3)	40 mM MgAc, 25 mM NaCac, pH=6,5	nº 22	PEG 400	Es van obtenir cristalls petits i no homogenis. Per accident es van perdre i van reparèixer nuclis de cristal·lització i molt precipitat.	
M30	HMGA1b(1-90) 1 mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,3 mM	(1:3)	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM Tris- HCl, pH=7,5	nº 43	MPD	SF que acaba precipitant.	

Taula B.2: Condicions de les gotes de la sèrie 1 (II). SF, separació de fases.

Observacions:

- La temperatura a la qual s'han conservat totes les gotes és 4°C.
- L'estoc de partida de la mostra de proteïna d'aquesta sèrie és: HMGA1b(1-90) Fr.89-97, 2.16 mM en 50 mM NaCl, 10 mM Tris, pH= 7.5 (prové de la mostra A).
- Les concentracions finals dels pous oscil·len entre el 39-69% de precipitant.



- **Sèrie 2: HMGA1b(1-90) +G<sub>3</sub>A<sub>3</sub>T<sub>3</sub>C<sub>3</sub> (relació 3:1)**

Càpsula	Proteïna	Oligonucleòtid	Relació P:O	Sals, Tampó, pH a la gota	Nº Natrx/Nom tampó	Precipitant pou	Observacions	
M31	HMGA1b(1-90) 0,6 mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2 mM	(3:1)	10 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM MES, pH=6	nº 7	MPD / 5% isoprop.	SF que acaba precipitant	
M32	HMGA1b(1-90) 0,6 mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2 mM	(3:1)	2,5 mM MgSO <sub>4</sub> , 25 mM MES, pH=6	nº 10	PEG 4000	Es va canviar de precipitant a PEG 400 perquè no s'observaven canvis. Acaba apareixent un precipitat amorf	
M33	HMGA1b(1-90) 0,6 mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2 mM	(3:1)	20 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6	nº 15	MPD	Precipitat cristal·lí amb traces de SF	
M34	HMGA1b(1-90) 0,6 mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2 mM	(3:1)	20 mM MgAc, 25 mM NaCac, pH=6	nº 16	MPD	A elevades concentracions de precipitant apareix una SF que no evoluciona	
M35	HMGA1b(1-90) 0,6 mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2 mM	(3:1)	2,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6	Variants nº15	7R	MPD	SF en excès a la gota, que no evoluciona favorablement
M36	HMGA1b(1-90) 0,6 mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2 mM	(3:1)	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6		8R	MPD	SF que acaba precipitant
M37	HMGA1b(1-90) 0,6 mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2 mM	(3:1)	10 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6		9R	MPD	Excessiva formació de SF en forma de mini-varetes que no evoluciona favorablement
M38	HMGA1b(1-90) 0,6 mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2 mM	(3:1)	20 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6		10R	MPD	Excessiva formació de SF
M39	HMGA1b(1-90) 0,6 mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2 mM	(3:1)	40 mM MgAc, 25 mM NaCac, pH=6,5	nº 22	PEG 400	Excessiva formació de SF que acaba precipitant	
M40	HMGA1b(1-90) 0,6 mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2 mM	(3:1)	40 mM MgAc, 25 mM NaCac, pH=6,5	nº 25	PEG 4000	Apareix SF invariant. Es canvia el precipitant per PEG 400. La SF no varia	
M41	HMGA1b(1-90) 0,6 mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2 mM	(3:1)	2,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6,5	Variants nº15	11R	MPD	SF que acaba precipitant
M42	HMGA1b(1-90) 0,6 mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2 mM	(3:1)	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6,5		12R	MPD	Excessiva SF que no evoluciona favorablement
M43	HMGA1b(1-90) 0,6 mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2 mM	(3:1)	10 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6,5		13R	MPD	SF, la majoria acaba precipitant
M44	HMGA1b(1-90) 0,6 mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2 mM	(3:1)	20 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6,5		14R	MPD	Excessiva SF que no evoluciona favorablement

Taula B.3: Condicions de les gotes de la sèrie 2 (I). SF, separació de fases.



Càpsula	Proteïna	Oligonucleòtid	Relació P:O	Sals, Tampó, pH a la gota	Nº Natrx/ Nom tampó	Precipitant pou	Observacions	
M45	HMGA1b(1-90) 0,6 mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2 mM	(3:1)	2,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM HEPES-Na, pH=7	nº 31	PEG 400	SF que no evoluciona favorablement	
M46	HMGA1b(1-90) 0,6 mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2 mM	(3:1)	50 mM KCl, 2,5 mM MgSO <sub>4</sub> , 25 mM HEPES-Na, pH=7	nº 34	MPD	SF que acaba precipitant	
M47	HMGA1b(1-90) 0,6 mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2 mM	(3:1)	50 mM KCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM HEPES-Na, pH=7	nº 35	PEG 400	SF amb una evolució no satisfactòria	
M48	HMGA1b(1-90) 0,6 mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2 mM	(3:1)	50 mM KCl, 5 mM CaCl <sub>2</sub> , 25 mM HEPES-Na, pH=7	nº 36	PEG 400	Gota turbia fins al 69% PEG 400	
M49	HMGA1b(1-90) 0,6 mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2 mM	(3:1)	2,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM HEPES-Na, pH=7	Variants nº 15	15R	MPD	SF que semblen esferulites. Acaba sent SF clara
M50	HMGA1b(1-90) 0,6 mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2 mM	(3:1)	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM HEPES-Na, pH=7		16R	MPD	Esferulites petites en una pla de la gota, que no presenten evolució. En una altra pla, SF precipitada
M51	HMGA1b(1-90) 0,6 mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2 mM	(3:1)	10 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM HEPES-Na, pH=7		17R	MPD	Esferulites molt petites. No s'observa una evolució satisfactòria
M52	HMGA1b(1-90) 0,6 mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2 mM	(3:1)	20 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM HEPES-Na, pH=7		18R	MPD	Excessiva formació de SF que acaba precipitant
M53	HMGA1b(1-90) 0,6 mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2 mM	(3:1)	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM Tris-HCl, pH=7,5	nº 42	MPD / 5% isoprop.	SF en excés a la gota	
M54	HMGA1b(1-90) 0,6 mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2 mM	(3:1)	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM (NH <sub>4</sub> )Ac, 25 mM Tris-HCl, pH=7,5	nº 43	MPD	Gota turbia amb una lleugera formació de SF al cap del temps, però no hi ha més canvis	
M55	HMGA1b(1-90) 0,6 mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2 mM	(3:1)	2,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM Tris-HCl, pH=7,5	Variants nº 15	19R	MPD	Excessiva SF que acaba precipitant
M56	HMGA1b(1-90) 0,6 mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2 mM	(3:1)	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM Tris-HCl, pH=7,5		20R	MPD	Excessiva SF que acaba precipitant
M57	HMGA1b(1-90) 0,6 mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2 mM	(3:1)	10 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM Tris-HCl, pH=7,5		21R	MPD	Excessiva SF en forma de petites agulles que no evoluciona favorablement
M58	HMGA1b(1-90) 0,6 mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2 mM	(3:1)	20 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM Tris-HCl, pH=7,5		22R	MPD	Excessiva SF

Taula B.4: Condicions de les gotes de la sèrie 2 (II). SF, separació de fases.

Observacions:

- La temperatura a la qual s'han conservat totes les gotes és 4°C.
- L'estoc de partida de la mostra de proteïna d'aquesta sèrie és: HMGA1b(1-90) Fr.89-97, 2.16 mM en 50 mM NaCl, 10 mM Tris, pH= 7.5 (prové de la mostra A).
- Les concentracions finals dels pous oscil·len entre el 39-69% de precipitant.





- **Sèrie 3: HMGA1b(1-90) + A<sub>2</sub>TA<sub>2</sub>T<sub>2</sub>AT<sub>2</sub> (relació 3:1)**

Càpsula	Proteïna	Oligo	Relació P:O	Sals, Tampó, pH a la gota	Nº Matrix/ Nom tampó	Precipitant pou	Observacions	
M59	HMGA1b(1-90) 0,3mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,1mM	(3:1)	(-), 25 mM NaCac, pH=6	(-)	MPD	SF que no evoluciona	
M60	HMGA1b(1-90) 0,3mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,1mM	(3:1)	(-), 25 mM NaCac, pH=6,5	(-)	MPD	SF que no evoluciona	
M61	HMGA1b(1-90) 0,3mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,1mM	(3:1)	(-), 25 mM HEPES-Na, pH=7	(-)	MPD	2 plans de SF	
M62	HMGA1b(1-90) 0,3mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,1mM	(3:1)	(-), 25 mM Tris-HCl, pH=7,5	(-)	MPD	2 plans de SF	
M63	HMGA1b(1-90) 0,3mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,1mM	(3:1)	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM Tris-HCl, pH=7,5	nº 42	MPD / 5% isoprop.	SF que no evoluciona	
M64	HMGA1b(1-90) 0,3mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,1mM	(3:1)	5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 25 mM (NH <sub>4</sub> )Ac, 25 mM Tris-HCl, pH= 7,5	nº43	MPD	SF que no evoluciona	
M65	HMGA1b(1-90) 0,3mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,1mM	(3:1)	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6	Variants nº 15	8R	MPD	SF que no evoluciona
M66	HMGA1b(1-90) 0,3mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,1mM	(3:1)	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM HEPES-Na, pH=7		16R	MPD	SF que no evoluciona
M67	HMGA1b(1-90) 0,3mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,1mM	(3:1)	10 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6		9R	MPD	SF que no evoluciona
M68	HMGA1b(1-90) 0,3mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,1mM	(3:1)	10 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM HEPES-Na, pH=7		17R	MPD	SF que no evoluciona
M69	HMGA1b(1-90) 0,3mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,1mM	(3:1)	7 mM CaCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6,5	M1	MPD	SF minúscula	
M70	HMGA1b(1-90) 0,3mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,1mM	(3:1)	50 mM NaCl, 25 mM HEPES-Na, pH=7	M2	MPD	SF que no evoluciona	

*Taula B.5: Condicions de les gotes de la sèrie 3. SF, separació de fases. Les gotes M59-M63 són proves sense sal afegida a la gota (només la procedent de l'estoc de proteïna).*

**Observacions:**

- La temperatura a la qual s'han conservat totes les gotes és 4°C.
- L'estoc de partida de la mostra de proteïna d'aquesta sèrie és: HMGA1b(1-90) Fr.22-23, 1.77 mM en 50 mM NaCl, 25 mM Tris, pH= 7.5 (prové de la mostra B).
- Les concentracions finals dels pous oscil·len entre el 45-51% de precipitant



• **Sèrie 4: HMGA1b(1-90) + A<sub>2</sub>TA<sub>2</sub>T<sub>2</sub>AT<sub>2</sub> (relació 2:1)**

Càpsula	Proteïna	Oligo	Relació P:O	Sals, Tampó, pH a la gota	Nº Natrix/ Nom tampó	Precipitant pou	Observacions	
M71	HMGA1b(1-90) 0,4mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,2mM	(2:1)	(-), 25 mM NaCac, pH=6	(-)	MPD	SF que no evoluciona	
M72	HMGA1b(1-90) 0,4mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,2mM	(2:1)	(-), 25 mM NaCac, pH=6,5	(-)	MPD	SF en un racó de la gota	
M73	HMGA1b(1-90) 0,4mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,2mM	(2:1)	(-), 25 mM HEPES-Na, pH=7	(-)	MPD	SF que no evoluciona	
M74	HMGA1b(1-90) 0,4mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,2mM	(2:1)	(-), 25 mM Tris-HCl, pH=7,5	(-)	MPD	SF que no evoluciona	
M75	HMGA1b(1-90) 0,4mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,2mM	(2:1)	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM Tris-HCl, pH=7,5	nº 42	MPD / 5% isoprop.	SF que no evoluciona	
M76	HMGA1b(1-90) 0,4mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,2mM	(2:1)	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM (NH <sub>4</sub> )Ac, 25 mM Tris-HCl, pH= 7,5	nº43	MPD	SF que no evoluciona	
M77	HMGA1b(1-90) 0,4mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,2mM	(2:1)	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6	Variants nº 15	8R	MPD	SF en un racó de la gota
M78	HMGA1b(1-90) 0,4mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,2mM	(2:1)	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM HEPES-Na, pH=7		16R	MPD	SF en un racó de la gota
M79	HMGA1b(1-90) 0,4mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,2mM	(2:1)	10 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6		9R	MPD	SF que no evoluciona
M80	HMGA1b(1-90) 0,4mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,2mM	(2:1)	10 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM HEPES-Na, pH=7		17R	MPD	SF que no evoluciona
M81	HMGA1b(1-90) 0,4mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,2mM	(2:1)	7 mM CaCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6,5	M1	MPD	SF que no evoluciona	
M82	HMGA1b(1-90) 0,4mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,2mM	(2:1)	50 mM NaCl, 25 mM HEPES-Na, pH=7	M2	MPD	SF que no evoluciona	

*Taula B.6: Condicions de les gotes de la sèrie 4. SF, separació de fases. Les gotes M71-M74 són proves sense sal afegida a la gota (només la procedent de l'estoc de proteïna i del tampó).*

Observacions:

- La temperatura a la qual s'han conservat totes les gotes és 4°C.
- L'estoc de partida de la mostra de proteïna d'aquesta sèrie és: HMGA1b(1-90) Fr.22-23, 1.77 mM en 50 mM NaCl, 25 mM Tris, pH= 7.5 (prové de la mostra B).
- Les concentracions finals dels pous oscil·len entre el 41-50% de precipitant



• **Sèrie 5: HMGA1b(1-90) +G<sub>3</sub>A<sub>3</sub>T<sub>3</sub>C<sub>3</sub> (relació 2:1)**

Càpsula	Proteïna	Oligo	Relació P/O	Sals,Tampó, pH a la gota	Nº Natrix / Nom tampó	Precipitant pou	Observacions	
M83	HMGA1b(1-90) 0,4mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2mM	(2:1)	(-), 25 mM NaCac, pH=6	(-)	MPD	SF que acaba precipitant	
M84	HMGA1b(1-90) 0,4mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2mM	(2:1)	(-), 25 mM NaCac, pH=6,5	(-)	MPD	SF que acaba precipitant	
M85	HMGA1b(1-90) 0,4mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2mM	(2:1)	(-), 25 mM HEPES-Na, pH=7	(-)	MPD	SF. Sembla que precipita	
M86	HMGA1b(1-90) 0,4mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2mM	(2:1)	(-), 25 mM Tris-HCl, pH=7,5	(-)	MPD	SF. Sembla que precipita	
M87	HMGA1b(1-90) 0,4mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2mM	(2:1)	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM Tris-HCl, pH=7,5	nº 42	MPD / 5% isoprop.	2 plans de SF	
M88	HMGA1b(1-90) 0,4mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2mM	(2:1)	5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 25 mM (NH <sub>4</sub> )Ac, 25 mM Tris-HCl, pH= 7,5	nº43	MPD	2 plans de SF	
M89	HMGA1b(1-90) 0,4mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2mM	(2:1)	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6	Variants nº 15	8R	MPD	2 plans de SF. Un d'ells acaba precipitant
M90	HMGA1b(1-90) 0,4mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2mM	(2:1)	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM HEPES-Na, pH=7		16R	MPD	Esferulites petites
M91	HMGA1b(1-90) 0,4mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2mM	(2:1)	10 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6		9R	MPD	En un pla de la gota precipitat, en l'altre esferulites petites
M92	HMGA1b(1-90) 0,4mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2mM	(2:1)	10 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM HEPES-Na, pH=7		17R	MPD	SF amb forma d'agulles que no evoluciona
M93	HMGA1b(1-90) 0,4mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2mM	(2:1)	7 mM CaCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6,5	M1	MPD	2 plans de SF	
M94	HMGA1b(1-90) 0,4mM	G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> C <sub>3</sub> 0,2mM	(2:1)	50 mM NaCl, 25 mM HEPES-Na, pH=7	M2	MPD	Gota totalment precipitada	

*Taula B.7: Condicions de les gotes de la sèrie 5. SF, separació de fases. Les gotes M83-M86 són proves sense sal afegida a la gota (només la procedent de l'estoc de proteïna i del tampó).*

**Observacions:**

- La temperatura a la qual s'han conservat totes les gotes és 4°C.
- L'estoc de partida de la mostra de proteïna d'aquesta sèrie és: HMGA1b(1-90) Fr.22-23, 1.77 mM en 50 mM NaCl, 25 mM Tris, pH= 7.5 (prové de la mostra B).
- Les concentracions finals dels pous oscil·len entre el 31-44% de precipitant.



• **Sèrie 6: RKPRGRPCK + A<sub>2</sub>TA<sub>2</sub>T<sub>2</sub>AT<sub>2</sub> (relació 4:1)**

Càpsula	Pèptid	Oligo	Relació P/O	Sals, tampó, pH a la gota	Nº Matrix / Nom tampó	Precipitant pou	Observacions	
M95	III/9b 0,8mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,2mM	(4:1)	10 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM MES, pH=6	nº 7	MPD	Apareixen cristalls líquids que no evolucionen. Es va afegir a la gota un volum suficient de NaCl per acabar amb una concentració extra de 10 mM. Apareixen uns cristalls que s'han de fondre. Després es formen petites esferulites	
M96	III/9b 0,8mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,2mM	(4:1)	20 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6	nº 15	MPD	Es van formar unes varetes no prou bones com per a ser pescades. Es van fondre i van sortir nous cristalls petits i tampoc prou bons com per a ser pescats. S'afegeix NaCl al pou com a precipitant, però no s'observen millores (v.fig 6.14)	
M97	III/9b 0,8mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,2mM	(4:1)	20 mM MgAc, 25 mM NaCac, pH=6	nº 16	MPD	Esferulites que no presenten cap evolució	
M98	III/9b 0,8mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,2mM	(4:1)	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM Tris-HCl, pH=7,5	nº 42	MPD	Agulles petites que no creixen prou com per a ser pescades. Es prova d'afegir al pou NaCl (com a precipitant), tot i així no millora (v.fig 6.14)	
M99	III/9b 0,8mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,2mM	(4:1)	5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 25 mM (NH <sub>4</sub> )Ac, 25 mM Tris-HCl, pH=7,5	nº 43	MPD	Agulles molt brillants però petites, no es poden pescar. També apareixen dues varetes petites.	
M100	III/9b 0,8mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,2mM	(4:1)	7 mM CaCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6,5	M1	MPD	SF molt brillant al principi, i posterior aparició d'esferulites molt petites	
M101	III/9b 0,8mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,2mM	(4:1)	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6	Variants nº 15	8R	MPD	Agulles que creixen a poc a poc. Algunes varetes, amb costats no rectes i puntes rodones (v.fig 6.14)
M102	III/9b 0,8mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,2mM	(4:1)	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM HEPES-Na, pH=7		16R	MPD	Varetes amb molts defectes
M103	III/9b 0,8mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,2mM	(4:1)	10 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6		9R	MPD	SF molt brillant al principi, que s'acaba degradant
M104	III/9b 0,72mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,18mM	(4:1)	9,1 mM MgCl <sub>2</sub> , 22,7 mM HEPES-Na, pH=7		17R	MPD	Apareixen uns petits cristalls líquids que es degraden ràpidament

Taula B.8: Condicions de les gotes de la sèrie 6. SF, separació de fases.

Observacions:

- La temperatura a la qual s'han conservat totes les gotes és 4°C.
- El pèptid III/9b es correspon amb el tercer AT-hook de la proteïna HMGA1b(1-90), és a dir RKPRGRPCK
- Gota M104 té una concentració diferent de la resta de la sèrie pels estocs de pèptid de partida.
- Concentracions finals dels pous oscil·len entre el 43-69% de precipitant. Les que contenen NaCl al pou tenen entre 200 mM i 600 mM.



- **Sèrie 7: RKPRGRPCK + A<sub>2</sub>TA<sub>2</sub>T<sub>2</sub>AT<sub>2</sub> (relació 2:1)**

Càpsula	Pèptid	Oligo	Relació P/O	Sals, Tampó, pH a la gota	Nº Natrx / Nom tampó	Precipitant pou	Observacions
M105	III/9b 0,4mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,2mM	(2:1)	10 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM MES, pH=6	nº 7	MPD	S'obtenen varetes de mala qualitat que es fonen. Apareixen algunes varetes millors, però encara presenten defectes (v.fig 6.15)
M106	III/9b 0,4mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,2mM	(2:1)	20 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6	nº 15	MPD	S'obtenen agulles de mala qualitat que es fonen. Tomen a aparèixer algunes agulles i alguna vareta, però amb força defectes (v.fig 6.15)
M107	III/9b 0,4mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,2mM	(2:1)	20 mM MgAc, 25 mM NaCac, pH=6	nº 16	MPD	Apareixen força varetes molt fines, que semblen agulles. Creixen una mica. Una d'elles brilla prou com per a ser pescada. Es <b>congela i difracta un cristall</b> d'aquesta gota (52% MPD al pou)
M108	III/9b 0,4mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,2mM	(2:1)	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM Tris-HCl, pH=7,5	nº 42	MPD	Apareixen unes varetes bones que es fonen espontàniament. Reapareixen algunes varetes amb molts defectes com per a ser pescades (v.fig 6.15)
M109	III/9b 0,4mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,2mM	(2:1)	5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 25 mM (NH <sub>4</sub> )Ac, 25 mM Tris-HCl, pH= 7,5	nº 43	MPD	Apareixen alguns cristalls petits que brillen poc i amb puntes arrodonides. S'afegeix NaCl al pou però no s'observen millores
M110	III/9b 0,4mM	A <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> T <sub>2</sub> AT <sub>2</sub> 0,2mM	(2:1)	7 mM CaCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCac, pH=6,5	M1	MPD	Apareixen unes varetes molt petites que s'acaben degradant i s'observa l'aparició de SF. S'afegeix NaCl al pou però no s'observen millores

- *Taula B.9: Condicions de les gotes de la sèrie 7. SF, separació de fases.*

## Observacions:

- La temperatura a la qual s'han conservat totes les gotes és 4°C.
- El pèptid III/9b es correspon amb el tercer *AT-hook* de la proteïna HMGA1b(1-90), és a dir RKPRGRPCK
- Concentracions finals dels pous oscil·len entre el 30-56% de precipitant. Les que contenen NaCl al pou tenen entre 544 mM i 560 mM.





## ANNEX C: ESTUDI ECONÒMIC DEL PROJECTE

Per a realitzar l'estudi econòmic d'aquest projecte, s'ha tingut en compte diferents aspectes:

- a) Cost associat als **productes** químics. Entre ells, es troben els oligonucleòtids i el pèptid sintètic. Cal comentar que, normalment, no s'ha utilitzat la totalitat del lot comprat. En aquests casos, s'aplica un factor d'ús que es correspon amb el percentatge gastat de cada lot.
- b) Cost associat als **materials**. Entre ells es troben els eppendorfs, càpsules, concentradors, etc. Es considera el preu unitari de cadascun i el número total d'unitats utilitzades.
- c) Cost associat al **personal** del laboratori. En aquesta part, es té en compte les hores dedicades per part de la investigadora (2000 h) així com de les directores (100h).
- d) Cost associat als **equips**. Es tenen en compte tots els equips utilitzats durant el projecte. S'ha suposat un període d'amortització de 10 anys per a cada aparell, s'ha tingut en compte el temps que ha durat el projecte (15 mesos) i les persones que han utilitzat l'aparell.
- e) Cost associat a **despeses generals**. Aquestes despeses serien l'electricitat, l'aigua, material bàsic de laboratori i d'oficina, etc. S'ha pres un valor del 10% de la suma dels costos anteriors.

Observació: els costos associats a productes, materials i equips s'han dividit en les dues parts diferenciades d'aquest projecte. Una es correspon amb la d'obtenció de la proteïna, i l'altra part és la de cristal·lografia.

A continuació, apareixen les taules amb el desglossament de tots els productes, materials i equips utilitzats, així com el cost associat a cadascun d'ells.



Productes	Quantitat lot	Preu lot (€)	Factor d'ús	Cost (€)	
<b>Expressió i purificació</b>					
Plasmidi amb gen HMGA1b(1-90)*				0,00	
Soca Rosetta(DE3)pLysS d'Escherichia coli*				0,00	
Ampicil·lina	1 g	0,91	0,0055	0,01	
Medi LB	Triptona	500 g	48,15	0,1	4,82
	Extracte de llevat	500 g	24,00	0,05	1,20
	NaCl	500g	30,60	0,1	3,06
Agar	500 g	54,00	0,004	0,22	
IPTG	1 g	91,80	1,5	137,70	
Reactius tractament sediment bacterià	Tritó X-100	100 ml	37,20	0,025	0,93
	HClO <sub>4</sub>	500 ml	58,30	0,08	4,66
	TCA	100 g	29,50	1	29,50
	Acetona	1000 ml	18,31	0,6	10,99
	HCl	1000 ml	29,92	0,0005	0,01
Resina per columna CM52	500 g	322,00	0,004	1,29	
Columna Spdx 75 30/100	24 ml	1474,00	1	1474	
Reactius per columna	Tris	1000 g	65,48	0,01	0,65
	NaCl	1000 g	17,00	0,04	0,68
Reactius per a gels	acrilamida	500 g	157,00	0,4	62,80
	bisacrilamida	100 g	89,42	0,054	4,83
	Tris	1000 g	65,48	0,07	4,58
	SDS	100 g	82,80	0,016	1,32
	TEMED	100 ml	25,63	0,009	0,23
	PSA	5 g	12,21	0,25	3,05
Reactius per tampó cubeta	Tris	1000 g	65,48	0,15	9,82
	Glicina	1000 g	84,20	0,72	60,62
	SDS	100 g	82,80	0,25	20,70
Reactius per tampó de mostres	Tris	1000 g	65,48	0,0006	0,04
	Glicerina	1000 ml	26,89	0,006	0,16
	SDS	100 g	82,80	0,012	0,99
	Mercaptoetanol	100 ml	35,70	0,03	1,07
	Blau de bromofenol	5 g	37,80	0,012	0,45
Reactius per solució tenyidora	Isopropanol	1 l	19,90	0,2	3,98
	Ac. Acètic	1l	14,20	0,2	2,84
	Blau coomassie	100 g	135,50	0,05	6,78
Reactius per a solució destenyidora	Isopropanol	1 l	19,90	0,2	3,98
	Ac. Acètic	1l	23,90	0,2	4,78
Reactius per a diàlisi (Tris)	1000 g	65,48	0,005	0,33	
<b>SUBTOTAL</b>				<b>1863,08</b>	
<b>Cristal·lografia</b>					
Oligo GGGAAATTTCCC	2 mg	300,00	0,75	225,00	
Oligo AATAATTATT	3,3 mg	200,00	0,60	120,00	
Pèptid RKPRGRPKK	7 mg	1500,00	0,01	15,00	
Isopropanol	1000 ml	19,90	0,05	1,00	
MPD	500 ml	44,30	2,00	88,60	
PEG 400	1000 ml	30,74	0,40	12,30	
PEG 4000	250 g	15,50	0,05	0,78	
Tampons Natrix H2-116	0,5 ml /tampó	140,00	0,02	2,80	
Altres sals per fer gotes	-	1,00	1,00	1,00	
Nitrogen líquid	1 l	0,72	5,00	3,60	
<b>SUBTOTAL</b>				<b>470,07</b>	
<b>TOTAL</b>				<b>2333,15</b>	

Taula C.1: Cost total dels productes, dividit en les dues parts del projecte. \*cedit pel Dr. Reeves (Washington State University).





Materials	Preu unitat	Unitats	Cost (€)
<b>Expressió i purificació</b>			
Carcassa columna gran	154,00	1	154,00
Vivaspin 6	7,31	2	14,62
Vivaspin 4	4,57	4	18,29
Centriplus YM3	7,67	2	15,33
Bosses per a diàlisi (preu/m)	15,00	0,8	12,00
Eppendorfs (preu/bossa)	69,30	1,5	103,95
Puntes pipetes blaves (preu/bossa)	21,66	2	43,32
Puntes pipetes grogues (preu/bossa)	13,68	2	27,36
Puntes pipetes blanques (preu/bossa)	11,80	1	11,80
Cubetes plàstic per cultius	0,10	8	0,80
		<b>SUBTOTAL</b>	<b>401,47</b>
<b>Cristal·lografia</b>			
Càpsules	0,12	110	13,20
Crioloops	7,5	1	7,50
Eppendorfs (preu/bossa)	69,3	1	69,30
Puntes pipetes blaves (preu/bossa)	21,66	1	21,66
Puntes pipetes grogues (preu/bossa)	13,68	1	13,68
Puntes pipetes blanques (preu/bossa)	11,8	0,5	5,90
Cubetes quars per a espectrofotòmetre	90	2	180,00
Altres (pots estèrils, xeringues, filtres...)	15	1	15,00
		<b>SUBTOTAL</b>	<b>326,24</b>
<b>TOTAL</b>			<b>727,71</b>

Taula C.2: Cost total dels materials, dividit en les dues parts del projecte.

Personal	Preu/h	Hores	Cost (€)
Investigadora	15	2000	30000
Directores	32	100	3200
<b>TOTAL</b>			<b>33200</b>

Taula C.3: Cost total del personal del laboratori.



Equip de laboratori	Preu	Amortització (anys)	Nº persones	Cost (€)
<b>Part obtenció de la proteïna</b>				
Congelador -80°C		10	15	0,00
Congelador -20°C	600	10	5	15,00
Nevera 4°C (laboratori)	500	10	5	12,50
Estufa 37°C		10	5	0,00
Bany 37°C		10	5	0,00
Incubadora/agitador 37°C + accessoris	8900	10	5	222,50
Bunsen		10	5	0,00
Espectrofotòmetre UV		10	6	0,00
Rentaplats material laboratori	4840	10	10	60,50
Autoclau		10	5	0,00
Purificador aigua	6300	10	8	98,44
Cromatògraf BioRad + col·lector mostres Gilson		10	5	0,00
Escàner de gels Gel Doc XR (Bio-Rad)	10579	10	5	264,48
Akta Purifier GE Healthcare	38330,8	10	5	958,27
Armari refrigerat per Akta Purifier	3751,22	10	5	93,78
Pipeta Hamilton	57,55	10	5	1,44
Font electrica per electroforesi	720	10	5	18,00
Cubetes per electroforesi gran + accessoris	850	10	5	21,25
Cubetes per electroforesi petita + accessoris	470	10	5	11,75
Micròfuga	1000	10	5	25,00
Mini-centrífuga	160	10	5	4,00
Centrífuga	26750	10	20	167,19
Rotors GSA	8500	10	20	53,13
Rotor SS34	5200	10	20	32,50
Vortex		10	5	0,00
pHmetre	1500	10	20	9,38
Balança	1000	10	20	6,25
Agitador magnètic	200	10	5	5,00
Micropipetes	1356	10	5	33,90
Material de laboratori (erlenmeyers, provetes, gots...)	200	10	5	5,00
			<b>TOTAL</b>	<b>2119,24</b>
<b>Part cristal·lografia</b>				
Microscopi òptic	20000	10	8	312,50
Balança de precisió	1300	10	15	10,83
Nevera 4°C (cambra freda)	500	10	10	6,25
Material per a la congelació (recipients, eines...)		10	10	0,00
Càmera digital per microscopi	400	10	10	5,00
Equips Parc Científic Barcelona	700	1	5	175,00
Ordinadors per al processament de dades	903,48	5	7	32,27
Llicència programes <i>Denzo</i> i <i>Scalepack</i>		5	7	0,00
			<b>TOTAL</b>	<b>541,85</b>
<b>TOTAL</b>				<b>2661,09</b>

Taula C.4: Cost total associat als equips del laboratori, dividit en les dues parts del projecte. Hi ha alguns equips amb cost nul perquè es consideren ja amortitzats.



A continuació, es mostra el cost total del projecte, desglossat en els factors mencionats anteriorment.

Concepte		Cost
Productes	Expressió i purificació	1.863,1 €
	Cristal·lografia	470,1 €
Materials	Expressió i purificació	401,5 €
	Cristal·lografia	326,2 €
Equips	Expressió i purificació	2.119,2 €
	Cristal·lografia	541,9 €
Personal	Directores	3.200 €
	Investigadora	30.000 €
Despeses generals (10%)		3.892 €
<b>TOTAL</b>		<b>42.814,1 €</b>

*Taula C.5: Cost total desglossat del projecte.*

Es pot observar que el cost total del projecte és d'uns 43.000 €.

Aproximadament un 70% d'aquest cost ve associat al sou de l'investigador. Tot i que hi ha molts equips, el pressupost d'aquest apartat no és tan elevat degut al període d'amortització escollit de 10 anys, tret de casos especials.





## ANNEX D: ESTUDI DE L'IMPACTE AMBIENTAL

En aquest apartat es farà una referència a l'impacte que pot ocasionar el projecte a l'entorn. Seguint la guia "Consideraciones ambientales para los PFC" [29], s'entén com entorn el conjunt de persones, ecosistemes, béns, cultura, estructura socioeconòmica, etc. que conformen el nostre marc d'actuacions.

Cal tenir en compte que el treball realitzat s'emmarca dins d'una fase prèvia d'investigació al laboratori. En aquest sentit s'ha volgut considerar també l'impacte ambiental durant l'etapa d'experimentació al laboratori.

### ***a) Avaluació de l'impacte ambiental***

El present projecte es basa en un estudi d'investigació que, en aquest cas, no és aplicable a escala industrial. Tant les purificacions com els assajos cristal·logràfics realitzats en aquest projecte són experiments previs necessaris per a poder arribar a conèixer l'estructura tridimensional dels complexos proteïna-DNA estudiats. I és aquest coneixement el que pot resultar útil per desenvolupar nous fàrmacs. Per tant, no és possible avaluar l'impacte ambiental de la possible aplicació futura dels resultats obtinguts en aquest treball. No obstant això, sí que es pot afirmar que tindrien un potencial impacte social positiu. Les proteïnes HMGA estan involucrades en molts processos cel·lulars normals, però també tenen una influència en processos patològics com ara el càncer. Un coneixement exhaustiu de l'estructura que assoleix un complex d'aquesta proteïna amb el DNA podria ser molt positiu en la lluita contra el càncer.

### ***b) Avaluació de l'impacte ambiental de l'experimentació***

Els aspectes que poden crear una alteració més important tant al medi ambient com a la salut personal són, majorment, els productes químics que es manipulen en aquest projecte. D'acord amb les bones pràctiques de laboratori, s'han seguit sempre les precaucions necessàries per la seva manipulació i recollida dels residus.

A continuació, es presenta un breu llistat dels processos als quals s'utilitzen els productes amb un impacte ambiental potencialment major:



- Cultius de bacteris: les restes dels cultius líquids i les plaques d'agar es desinfecten amb lleixiu per a evitar la proliferació de bacteris abans de descartar-los.
- Tractament del sediment bacterià: aquest procediment es porta a terme utilitzant àcid perclòric ( $\text{HClO}_4$ ) i tritó-100. Ambdós productes són irritants i nocius, tot i que s'utilitzen en concentracions prou baixes com per a que no comporti un risc significatiu. També es treballa amb TCA, que és corrosiu i perillós pel medi ambient.
- Preparació de les mostres per electroforesi: un dels components és el mercaptoetanol, que conté un grup sulfhidril. Per manipular aquest compost a més de fer servir mascareta, ulleres de protecció i guants, cal treballar a la campana per evitar dispersió de males olors. Tot i així es treballa amb concentracions força diluïdes.
- Preparació dels gels electroforètics: per a polimeritzar els gels s'utilitzen solucions d'acrilamida, que s'han preparat dissolent acrilamida en pols. Aquest producte és inflamable, pot produir gasos tòxics i irritar els ulls, la pell i el tracte respiratori. És una substància neurotòxica, que pot provocar problemes greus si s'està exposat prolongadament. Per tot això, és imprescindible manipular-la amb molta cura mentre es prepara la dissolució, utilitzant guants, bata, màscara i ulleres. Per a minimitzar la manipulació d'acrilamida en pols, es prepara un estoc relativament gran de la dissolució, i es conserva a la nevera. Quan l'acrilamida polimeritza deixa de ser perillosa.
- Congelació i difracció de cristalls: durant aquestes etapes s'utilitza nitrogen líquid, per a la conservació dels cristalls. El nitrogen líquid produeix gasos inerts que, a altes concentracions, podrien ocasionar riscos d'asfíxia. Per això s'ha treballat en una sala dotada d'un extractor de gasos per a dispersar els gasos inerts, evitant arribar a concentracions perilloses.

Els residus han estat gestionats per l'empresa EcoCat. Les pautes seguides per a la separació de residus, així com per a la seva classificació es poden trobar a: <http://www.upc.edu/sostenible2015/ambits/la-gestio-interna/residus/gestio-de-residus-de-laboratori>.

